

**ROBERTA MARCONDES MACHADOFIGUEIREDO**

**Efeito dos ácidos graxos saturados, poli-insaturados  
e *trans* no desenvolvimento de aterosclerose e esteatose  
hepática em camundongos com ablação gênica do  
receptor de LDL**

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

**Programa de: Endocrinologia**

**Orientadora: Dra. Ana Maria Pita Lottenberg**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**SÃO PAULO**

**2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Figueiredo, Roberta Marcondes Machado

Efeito dos ácidos graxos saturados, poli-insaturados e *trans* no desenvolvimento de aterosclerose e esteatose hepática em camundongos com ablação gênica do receptor de LDL / Roberta Marcondes Machado Figueiredo. -- São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Ana Maria Pita Lottenberg.

Descritores: 1.Dieta hiperlipídica 2.Ácidos graxos *trans* 3.Ácidos graxos saturados 4.Ácidos graxos insaturados 5.Aterosclerose 6.Colesterol 7.Transportadores de cassetes de ligação de ATP 8.Esteatose hepática 9.Camundongos Knockout

USP/FM/DBD-241/12

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM 10) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este projeto foi desenvolvido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 06/55516-8) e Bolsa de Doutorado Direto (CAPES).

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Beatriz Junqueira Lobato Marcondes Machado, pelo “milagre da minha vida”; por todo amor e pelos ensinamentos que me deram a base que tenho e me tornaram a pessoa que sou; por ter me moldado com espírito forte, para que eu pudesse trilhar meu caminho com coragem e determinação.

Aos meus filhos, Lucas, Rafael e Pedro, que me permitiram sentir o mais profundo amor e viver a experiência mais gratificante da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Ana Maria Pita Lottenberg, minha eterna gratidão por ter me aberto às portas para a realização deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos proporcionados, por toda a dedicação, por todo cuidado e carinho ao longo destes anos. Como aluna, me sinto honrada por ter sido orientada por você, exemplo de pessoa, profissional e pesquisadora.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, obrigada pela ajuda, suporte e orientação ao longo deste trabalho, pelas fundamentais colocações ao longo do estudo e por todo auxílio acadêmico e técnico.

Ao Dr. Eder Quintão, obrigada por dividir comigo seu conhecimento e suas ideias, o Sr. é sempre uma grande fonte de inspiração para nós, os alunos do Laboratório de Lípidos, foi uma grande honra trabalhar ao seu lado.

À Dra. Marisa Passarelli, obrigada por tantas explicações e esclarecimentos, aprendi muito com você ao longo destes anos.

À Dra Patrícia M. Cazita, obrigada pelo apoio, carinho e amizade. Minha sincera gratidão por toda confiança que você sempre depositou em mim, pela parceria e por toda força todo este tempo.

Ao Dr. Sergio Catanozi, obrigada pelo apoio e auxílio técnico. Sem sua expertise e paciência, jamais aprenderia a extrair a artéria aorta de um camundongo!

À Dra. Valéria Sutti Nunes, obrigada pela incansável ajuda em todos os momentos, obrigada pelo carinho, pelo cuidado e apoio. Como ninguém, você consegue transmitir uma “energia positiva”, mesmo em horas difíceis!

À Dra. Monica Neves, muito obrigada pelas ideias e participações. Suas colocações nas “reuniões de sexta-feira” são sempre inspiradoras.

À Fabiana Dias Ferreira, obrigada por me acompanhar ao longo desses anos. Obrigada pela parceria, companheirismo e otimismo, e claro, pela paciência. Sua determinação, confiança e “pique”, sempre me trouxeram muita força.

À Dra. Adriana Machado Saldiba de Lima, pela amizade, carinho, parceria, apoio e compreensão, sempre. Obrigada pelos papos e por nossas sessões terapêuticas, pelas risadas e pela descontração.

À Renata P. A. Bombo, obrigada pela amizade e apoio, pelas conversas e desabafos e pelo ombro sempre amigo. Obrigada pela força, pela confiança e pela parceria. A agrônoma mais “nutri” do Brasil, que bom que você resolveu vir para o Lab!

À Maria Silvia Lavrador e Milessa S. Afonso, obrigada pelas incansáveis ajudas, experimentais e intelectuais, pelas risadas e pelo

apoio em todos os momentos. Vocês vieram abrilhantar o grupo das “nutris”. Espero que vocês já tenham superado o episódio do “Tissue-Tek”!!!

À Tatiana Martins Venâncio, obrigada pela paciência, amizade e dedicação. Foi sempre muito bom trabalhar ao seu lado. Seu espírito jovem, sua alegria e delicadeza, deixam sempre o ambiente mais leve e agradável.

À Dra Gabriela Castilho, obrigada pelos conselhos, conversas, discussões e risadas. Tenho ótimas lembranças das nossas conversas, com temas que iam desde protocolos experimentais, passando por obras e reformas, e terminavam em casamentos, pais e filhos.

À Ângela Ilha, pelo apoio, auxílio, carinho e pela amizade, dentro e fora do Lab. Obrigada pela força e pelas risadas.

À Vivian Buonocorso, obrigada pela amizade. Obrigada pelas primeiras lições de pipetagem, pelas conversas pelo apoio e incentivo.

À Dra. Camila Canteiro Leança, obrigada por todas as dicas e orientações metodológicas, tão precisas e acertadas, impecáveis na verdade! Para mim, foi impossível alcançar tamanha precisão nos “RNAs”, mas seu exemplo trouxe uma meta inspiradora!!!

Ao Dr. Rodrigo Tallada Iborra e ao Dr. Raphael de Souza Pinto, muito obrigada por toda ajuda que me deram ao longo deste caminho.

À Dra. Ligia Shimabukuro Okuda e Dra. Débora Rocco, obrigada pelo auxílio e companheirismo de bancada. Cada uma a seu modo, me ensinaram muito nesses anos de convívio.

À Juliana, Karoline, Simone, Diego, Fernanda Fusco, Paulinha, a famosa “nova geração”! Obrigada pela ajuda, pela troca de conhecimentos e vivências. É sempre muito bom trocar ideias e com a turma jovem e de cabeça boa! Tudo de bom e boa “velejada” para vocês!

Ao Dr. Heraldo Possolo de Souza e Dr. Francisco Soriano, obrigada por todo auxílio, intelectual e técnico, pelas conversas e brilhantes sugestões ao longo destes anos.

Ao Dr. Francisco R. Laurindo, pelas importantes contribuições no desenho do estudo e ao longo do trabalho.

À Ana Lúcia Garippo, obrigada pela importante contribuição técnica com a microscopia confocal. Obrigada pela paciência e orientação metodológica.

À Dra. Marcia K. Koike, muito obrigada por aceitar colaborar comigo ao longo deste caminho. Foi muito gratificante trabalhar com você, uma pesquisadora tão comprometida, séria e competente!

À Senária Egutti, muito obrigada por todo apoio, força e atenção. É sempre bom ter você por perto, você inspira confiança.

À Claudia, obrigada por todo auxílio com tantas cotações, compras e questões burocráticas. Obrigada pela paciência.

À Jussara, muito obrigada por todo apoio técnico ao longo destes anos.

À Rosibel, muito obrigada por todo apoio, sem você, nada seria possível!

Aos amigos do LIM 07, Dra. Claudia P. M. S Oliveira, Dr José Tadeu Stefano e Dra Vicência M. R. de Lima, pela colaboração e auxílio na determinação do mRNA do fígado e gradação da doença hepática.

À minha família escolhida com o coração, Helena Marina Ribeiro da Silva, Maria Gabriela de Queiroz Ferreira, Renata Arruda Pinto Lima e Sylvia Verre, por todo amor, carinho e apoio ao longo de toda a vida!

As queridas amigas, Marina Reali, Anna Tereza Siebert Nascimento e Ana Lucia Jerckic, por todo apoio ao longo desses anos.

Aos queridos amigos do Aikido, por todo carinho, por me ajudarem a trabalhar o corpo, a mente e o espírito e pelos ensinamentos de vida: “Não olhe sua vida com ressentimento, esteja preparado para aceitar tudo àquilo que ela lhe oferece; cada dia traz em si a alegria e a fúria, a dor e o prazer, a escuridão e a luz, o crescimento e a decadência. Tudo isso faz parte do ciclo da natureza, portanto, não tente reclamar ou lutar contra a vida. Aceite-a, e ela o aceitará” (Morihei Ueshiba).

**“A verdadeira vitória é a vitória sobre si mesmo”**

**Morihei Ueshiba**

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS

### RESUMO

### SUMMARY

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>  |
| Ácidos graxos alimentares e doença cardiovascular.....  | 1         |
| Gordura alimentar e metabolismo de lipoproteínas.....   | 2         |
| Ácidos graxos saturados .....   | 4         |
| Ácidos graxos poli-insaturados.....   | 9         |
| Ácidos graxos monoinsaturados .....   | 13        |
| Ácidos graxos <i>trans</i> .....  | 14        |
| Lipoproteínas e aterogênese.....  | 17        |
| Receptores envolvidos no transporte reverso do colesterol .....                                 | 20        |
| Dieta e aterosclerose experimental .....  | 26        |
| Ácidos graxos alimentares e doença hepática .....   | 28        |
| <b>JUSTIFICATIVA .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>OBJETIVO.....</b>  | <b>33</b> |
| Objetivos específicos.....  | 33        |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>34</b> |
| Animais e dieta.....  | 34        |
| Análises plasmáticas e perfil de lipoproteínas.....   | 36        |
| Processamento dos tecidos .....   | 37        |
| Determinação da área de lesão aterosclerótica .....   | 38        |
| Determinação do conteúdo de ABCA1 e do infiltrado de macrófagos por<br>Imuno-histoquímica ..... | 39        |
| Colocalização de ABCA1 e macrófagos.....  | 40        |
| Conteúdo de colágeno na lesão aterosclerótica.....  | 41        |
| Análise da expressão de ABCA1 e de genes envolvidos no metabolismo<br>de lípidos.....           | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| Extração do tecido adiposo subcutâneo .....   | 43        |
| Análise histológica e gradação da doença hepática.....  | 44        |
| Análise dos lípidos hepáticos .....   | 44        |
| Marcadores inflamatórios plasmáticos e resposta inflamatória de<br>macrófagos peritoneais ..... | 45        |
| Análise estatística .....   | 46        |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>47</b> |
| Dieta hiperlipídica e doença hepática não alcoólica.....  | 48        |
| Concentração de glicose e insulina plasmática.....  | 51        |
| Lípidos plasmáticos e perfil de lipoproteínas .....   | 51        |
| Dieta hiperlipídica e desenvolvimento de aterosclerose.....                                     | 56        |
| Localização de ABCA1 e macrófago na placa aterosclerótica .....                                 | 60        |
| Citocinas plasmáticas e resposta inflamatória.....  | 61        |
| Vulnerabilidade da placa aterosclerótica.....   | 62        |
| <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>76</b> |
| <b>ANEXOS</b>   |           |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|           |   |
|-----------|---|
| ABCA1     | <i>ATP-binding cassette transporter A1</i>        |
| ABCG1     | <i>ATP-binding cassette transporter G1</i>        |
| ABCG5     | <i>ATP-binding cassette transporter G5</i>        |
| ABCG8     | <i>ATP-binding cassette transporter G8</i>        |
| ACAT      | Acilcolesterol aciltransferase                    |
| ALT       | Alanina aminotransferase                          |
| Apo A-I   | Apolipoproteína A-I                               |
| Apo A-II  | Apolipoproteína A-II                              |
| Apo A-IV  | Apolipoproteína A-IV                              |
| Apo B     | Apolipoproteína B                                 |
| Apo C-III | Apolipoproteína C-III                             |
| Apo E     | Apolipoproteína E                                 |
| AST       | Aspartato aminotransferase                        |
| AVC       | Acidente vascular cerebral                        |
| BSA       | <i>Bovine serum albumin</i>                       |
| CD36      | <i>Cluster differentiation 36</i>                 |
| CE        | Colesterol éster                                  |
| CETP      | Proteína transferidora de colesterol esterificado |
| CL        | Colesterol livre                                  |
| CML       | Célula muscular lisa                              |
| CPT-1     | Palmitoilcarnitina aciltransferase-1              |

|                    |   |
|--------------------|---|
| CT                 | Colesterol total  |
| DCV                | Doença cardiovascular   |
| DM2                | Diabetes mellitus tipo 2  |
| DT                 | Doença de Tangier   |
| FL                 | Fosfolípidos  |
| FPLC               | Cromatografia em gel de filtração                                       |
| FVC                | Fração do volume de colágeno  |
| Grp78              | Proteína regulada pela glicose de 78 KDa                                |
| HDL                | Lipoproteínas de alta densidade   |
| HOMA <sub>IR</sub> | <i>Homeostasis model assessment of insulin resistance</i>               |
| ICAM               | Molécula de adesão intercelular   |
| IL-10              | Interleucina-10   |
| IL-6               | Interleucina-6  |
| Insig              | Gene induzido pela insulina   |
| LDL-c              | Lipoproteínas de baixa densidade  |
| LDLr-KO            | Ablação gênica para o receptor de LDL                                   |
| LPS                | Lipopolissacarídeo  |
| LXR                | Receptor X hepático ( <i>Liver X receptor</i> )                         |
| MCP-1              | Proteína quimiotática de monócitos-1                                    |
| mRNA               | RNA mensageiro  |
| MTP                | Proteína microsomal de transferência de triglicérides                   |
| NAFLD              | <i>Non-alcoholic fat liver disease</i>                                  |
| NASH               | Esteato-hepatite não alcoólica ( <i>Non-Alcoholic Steatohepatitis</i> ) |
| POLI               | Dieta hiperlipídica enriquecida com ácido graxo poli-insaturado         |

|               |  |
|---------------|--|
| PON           | Paraoxonase  |
| PPAR          | Receptor ativado por proliferadores de peroxisoma<br>( <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> ) |
| RI            | Resistência insulínica   |
| RXR           | Receptor X retinóico ( <i>retinoid X receptor</i> )  |
| SAT           | Dieta hiperlipídica enriquecida com ácidos graxos saturados  |
| S1P           | <i>Site-1</i> protease   |
| S2P           | <i>Site-2</i> protease   |
| SM            | Síndrome metabólica  |
| SCAP          | Proteína ativadora da clivagem do SREBP  |
| SCD1          | Esteroil-CoA dessaturase 1   |
| SRA           | <i>Scavenger Receptors Classe A</i>  |
| SR-BI         | <i>Scavenger receptors</i> classe B tipo I   |
| SRE           | Elemento responsivo a esteróide  |
| SREBP         | Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróide   |
| TG            | Triglicérides  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral- $\alpha$   |
| TRANS         | Dieta hiperlipídica enriquecida com ácidos graxos <i>trans</i>   |
| TRC           | Transporte reverso do colesterol   |
| VCAM          | Molécula de adesão celular vascular  |
| VCT           | Valor calórico total   |
| VLDL          | Lipoproteínas de muito baixa densidade   |

## RESUMO

Figueiredo RMM. **Efeito dos ácidos graxos saturados, poli-insaturados e *trans* no desenvolvimento de aterosclerose e esteatose hepática em camundongos com ablação gênica do receptor de LDL.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

**Introdução:** A quantidade e o tipo de gordura alimentar exercem importante influência no desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) e podem contribuir para o desenvolvimento de esteatose hepática. Os ácidos graxos saturados e *trans* são consensualmente apontados como aterogênicos; já os poli-insaturados parecem exercer ação antiaterogênica. Com relação a esteatose hepática, sabe-se que os ácidos graxos saturados estão associados com o seu desenvolvimento; porém, a ação dos ácidos graxos *trans* na gênese e no desenvolvimento de esteatose hepática não está totalmente elucidada. Neste estudo, avaliou-se o efeito do consumo de dietas enriquecidas com ácidos graxos saturados (SAT), poli-insaturados (POLI) ou *trans* (TRANS) sobre componentes envolvidos na indução e na progressão da placa aterosclerótica, bem como sobre o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica. **Métodos:** Camundongos com ablação gênica para o receptor de LDL (LDLr-KO) foram alimentados com dietas hiperlipídicas (40% do valor calórico total sob a forma de gordura), enriquecidas com ácidos graxos SAT, POLI ou TRANS por 16 semanas e ao final submetidos a: 1) análises plasmáticas: colesterol total (CT), triglicérides (TG), insulina, glicose, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e perfil de lipoproteínas; 2) determinação da lesão aterosclerótica: área de lesão (Oil Red-O), conteúdo de ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) e infiltrado de macrófagos (imuno-histoquímica), colocalização de ABCA1 e macrófagos (microscopia confocal) e conteúdo de colágeno (Picrosirius-Red) na raiz aórtica; 3) conteúdo de CT, colesterol éster (CE) e colesterol livre (CL) na aorta total; 4) macrófagos peritoneais foram tratados

com lipopolissacarídeo (LPS), e IL-6, TNF- $\alpha$  e interleucina-10 (IL-10) medidas no meio de cultura; 5) no fígado: grau da doença hepática gordurosa não alcoólica, concentração de CT e TG e expressão de RNA mensageiro (mRNA) de PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, MTP, CPT-1 e ABCA1 por RT-qPCR; 6) determinação do conteúdo de tecido adiposo visceral e subcutâneo na carcaça. **Resultados:** O consumo de dieta não diferiu entre os grupos; comparado à dieta POLI, TRANS induziu menor ganho de peso refletido por menor conteúdo de tecido adiposo. TRANS induziu hepatomegalia, desenvolvimento de esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e piora da sensibilidade insulínica (evidenciada pelo índice HOMA<sub>IR</sub>). As concentrações de AST e ALT não diferiram entre os grupos. A dieta TRANS elevou a expressão de mRNA de genes relacionados à lipogênese hepática (PPAR- $\gamma$  e SREBP-1c) comparada à SAT e POLI e reduziu a expressão de MTP comparada à dieta POLI. Não houve diferença entre os grupos com relação à expressão de genes envolvidos na oxidação hepática de lípidos (PPAR- $\alpha$  e CPT-1). As concentrações plasmáticas de CT e TG foram maiores no grupo TRANS comparado a SAT e POLI. POLI apresentou menor área de lesão, infiltrado de macrófagos e conteúdo de ABCA1 comparados a SAT e TRANS. Macrófagos e ABCA1 não se colocalizaram na área de lesão. O conteúdo de CT na parede arterial foi menor no grupo POLI comparado a TRANS; CL foi menor no grupo POLI comparado a SAT e TRANS; CE não diferiu entre os grupos. Comparado a POLI, SAT e TRANS apresentaram maior conteúdo de colágeno e núcleos necróticos na placa aterosclerótica. A concentração plasmática de IL-6 não diferiu entre os grupos; já a concentração de TNF- $\alpha$  foi maior nos grupos POLI e TRANS em comparação a SAT. Em relação à resposta inflamatória de macrófagos ao LPS, POLI e TRANS apresentaram maiores concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  comparadas a SAT. POLI apresentou menores concentrações de IL-10 em comparação aos demais grupos. A expressão hepática de ABCA1 não diferiu entre os grupos. **Conclusão:** O consumo de dieta TRANS induziu perfil lipídico proaterogênico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e severo

desenvolvimento de aterosclerose, além de hepatomegalia, maior acúmulo hepático de lípidos e desenvolvimento de NASH. Por outro lado, POLI preveniu o desenvolvimento de aterosclerose, independentemente de sua ação inflamatória.

**Descritores:** 1. Dieta hiperlipídica; 2. Ácidos graxos *trans*; 3. Ácidos graxos saturados; 4. Ácidos graxos insaturados; 5. Aterosclerose; 6. Colesterol; 7. Transportadores de cassetes de ligação de ATP; 8. Esteatose hepática; 9. Camundongos knockout.

## SUMMARY

Figueiredo RMM. **Effect of saturated, polyunsaturated and *trans* fatty acids on the development of atherosclerosis and hepatic steatosis of mice with ablation of the LDL receptor gene.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

**Introduction:** The amount and type of dietary fat play important roles on the development of cardiovascular disease (CVD) and on the development of hepatic steatosis. Saturated (SAT) and *trans* (TRANS) fatty acids are known as pro-atherogenic, while the polyunsaturated (POLY) fats seem to exert an antiatherogenic action. Regarding hepatic steatosis, it is known that SAT are associated with its development, however, the role of TRANS in the genesis and development of hepatic steatosis is not fully understood. This study evaluated the effect of the intake of diets enriched with SAT, POLY or TRANS on the parameters involved in the progression of the atherosclerotic plaque and also on the development of the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** LDL receptor knock-out (LDLR-KO) male mice were fed for 16 weeks a high fat diet (40% of calories as fat) enriched with SAT, POLY or TRANS, for 16 weeks. The following parameters were measured: 1) plasma: total cholesterol (TC), triglyceride (TG), insulin, glucose, aspartate aminotransferase (AST) and alanine amino transferase (ALT), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and lipoprotein profile; 2) atherosclerotic lesion - lesion area (Oil Red-O), ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) content and macrophage infiltration (immunohistochemistry), co-localization of ABCA1 and macrophages (confocal microscopy) and collagen content (Picrosirius-Red); 3) TC, cholesteryl ester (CE) and free cholesterol (FC) content of the total aorta; 4) interleukin-6 and 10 (IL-6 and IL-10) and TNF- $\alpha$  in the culture medium of peritoneal macrophages after treatment with lipopolysaccharide (LPS); 5) liver: degree of fat liver disease, concentration of TC and TG and mRNA expression (RT-qPCR) of PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, MTP, ABCA1 and

CPT-1; 6) visceral and subcutaneous adipose tissue contents in the carcass of the animals. **Results:** Food intake did not differ amongst the groups, however, compared to POLY, TRANS induced less weight gain, due to lower adipose tissue content. TRANS induced hepatomegaly, nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and worsening of insulin sensitivity, as evidenced by the index  $HOMA_{IR}$ . The concentrations of ALT and AST did not differ among groups. TRANS increased the mRNA expression of the hepatic lipogenic genes (PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c) compared to the SAT and POLY and reduced the mRNA expression of MTP compared to POLY. There was no difference among the groups regarding the mRNA expression of genes involved in hepatic lipid oxidation (PPAR- $\alpha$  and CPT-1). Plasma concentrations of TC and TG were higher in TRANS compared to SAT and POLY. POLY showed lower arterial lesion area, macrophage infiltration and ABCA1 content compared to SAT and TRANS. ABCA1 and macrophages did not colocalize in the lesion area. The TC content in the arterial wall was lower on POLY compared to TRANS; FC was lower on POLY compared to SAT and TRANS; CE did not differ among groups. Compared to POLY, SAT and TRANS showed higher collagen content and necrotic core in atherosclerotic plaques. The plasma concentration of IL-6 did not differ among groups, however, TNF- $\alpha$  plasma concentration was higher in POLY and TRANS compared to SAT. Regarding the macrophage inflammatory response to LPS, POLY and TRANS showed higher concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  compared to SAT. Moreover, POLY had the lowest concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The hepatic expression of ABCA1 did not differ amongst the groups. **Conclusion:** TRANS induced pro-atherogenic lipid profile, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperglycemia, and severe atherosclerosis, and in addition, elicited hepatomegaly, increased hepatic lipid accumulation and NASH. On the other hand, POLY prevented the development of atherosclerosis, independently of their pro-inflammatory activity.

**Descriptors:** 1. Diet, high fat; 2. *Trans* fatty acids; 3. Fatty acids, saturated; 4. Fatty acids, unsaturated; 5. Atherosclerosis; 6. Cholesterol; 7. ATP-Binding Cassette Transporter; 8. Fatty liver; 9. Mice, knockout.

## INTRODUÇÃO

### Ácidos graxos alimentares e doença cardiovascular

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte nos Estados Unidos (Knopp et al., 1999). No Brasil, as DCV continuam sendo as mais frequentes causas de óbito, apesar de seu declínio de 31% entre 1996 e 2007. Dentre as DCV, o acidente vascular cerebral (AVC) e o infarto agudo do miocárdio (IAM) são os que ocorrem com maior frequência (Schmidt et al., 2011). É importante ressaltar que as quatro doenças crônicas de maior impacto na mortalidade, no Brasil e no mundo (doenças do aparelho circulatório, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas), têm quatro fatores de risco em comum: tabagismo, inatividade física/ ou sedentarismo/ ou falta de atividade física, alimentação inadequada e o consumo excessivo de álcool (Schmidt et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde reiterou que o consumo de dietas inadequadas e o sedentarismo estão entre os dez principais fatores de risco para mortalidade (WHO, 2004).

A importância da dieta na prevenção das DCV tem sido amplamente descrita na literatura. Na segunda metade do século XX, o *Seven Countries Study* demonstrou correlação positiva entre o consumo de gordura saturada e a mortalidade por doença coronariana (Menotti et al., 1989). Neste mesmo estudo evidenciou-se que o consumo de vegetais foi inversamente correlacionado com a taxa de mortalidade. Os mesmos resultados foram

obtidos após 20 anos de acompanhamento (Menotti et al., 1999). Já o estudo INTERHEART (Iqbal et al., 2008) identificou aumento de risco para IAM em aproximadamente 30% da população com o consumo de dieta ocidental (rica em gordura, especialmente saturada e *trans*). Associação inversa foi obtida com o consumo de dieta denominada prudente (rica em frutas e hortaliças e com quantidade adequada de gordura).

### **Gordura alimentar e metabolismo de lipoproteínas**

Diversos estudos têm demonstrado que intervenções alimentares adequadas podem diminuir ou prevenir significativamente o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis. Neste contexto, o papel da dieta vem sendo exaustivamente avaliado em estudos clínicos e epidemiológicos. A quantidade e o tipo de gordura alimentar exercem influência direta sobre a concentração de lípides e de lipoproteínas plasmáticas, resistência à insulina e risco cardiovascular (Nicolosi, 1998; Bray et al., 2002; Haag et al., 2005). Isto ocorre em função do tipo de ácido graxo presente na gordura, o qual é capaz de modular, diferentemente, diversos mecanismos regulatórios em nível celular (Manco et al., 2004).

Vários estudos em animais mostraram aumento da colesterolemia e, conseqüentemente, aterosclerose com o consumo de dieta rica em colesterol (McGill et al., 1981; Rudel et al., 1985; Grundy et Denke, 1990). Embora estudos mostrem aumento da colesterolemia em populações com maior ingestão de colesterol (Grundy et Denke, 1990), sabe-se que os ácidos graxos saturados provenientes da dieta têm papel preponderante na

elevação da colesterolemia quando comparados ao colesterol alimentar (Ascherio et al., 2002; Grundy et Denke, 1990). Isso se dá porque o organismo humano possui mecanismos compensatórios, os quais reduzem a síntese e aumentam a excreção de colesterol em resposta ao aumento do seu consumo na dieta (Quintão et al., 1971).

Além disso, há grande variabilidade na resposta da colesterolemia ao consumo do colesterol (Katan et al., 1986; Glatz et al., 1993), provavelmente em razão dos diferentes fenótipos de apolipoproteína E (apo E) (Miettinen et al., 1994; Gylling et al., 1997; Tammi et al., 2001; Lottenberg et al., 2002) e de polimorfismos de diversas proteínas envolvidas na absorção intestinal de colesterol, como apolipoproteína A-IV (apo A-IV), apolipoproteína C-III (apo C-III), proteína transferidora de colesterol éster (CETP), *ATP-binding cassette transporter G5* (ABCG5) e *ATP-binding cassette transporter G8* (ABCG8) (Ye et al., 2000; Rantala et al., 2000; Weggemans et al., 2001; Lammert et al., 2005).

Os ácidos graxos saturados (Nicolosi et al., 1990) e os ácidos graxos *trans* são consensualmente apontados como aterogênicos (Mensink et al., 2003; Warensjö et al., 2008). Por outro lado, diversas investigações apontam para uma ação protetora da gordura poli-insaturada sobre o desenvolvimento das DCV (Hu et al., 1997). Recentemente, o Comitê de Nutrição da *American Heart Association* revendo as evidências sobre ácidos graxos poli-insaturados e risco cardiovascular, reforçou que o seu consumo deve ser estimulado (Harris et al., 2009).

Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, quando comparados ao consumo de gordura saturada, o ácido oleico reduz a concentração plasmática de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) (Reaven et al., 1994). Entretanto, alguns autores não observaram papel cardioprotetor dos ácidos graxos monoinsaturados em modelos animais (Rudel et al., 1995; 1998; Merkel et al., 2001). Todavia, já se encontra bem documentado que populações do Mediterrâneo, reconhecidas pelo alto consumo de ácido oleico, apresentam menor prevalência de obesidade, síndrome metabólica (SM), diabetes tipo 2 e eventos cardiovasculares (De Lorgeril et al., 2006).

### **Ácidos graxos saturados**

Os ácidos graxos saturados estão naturalmente presentes na dieta, principalmente na forma de ácido palmítico (16:0) e, em menor quantidade, ácido mirístico (14:0) e ácido esteárico (18:0). Por apresentarem cadeia retilínea de carbono, os ácidos graxos saturados empacotam-se linearmente no núcleo das lipoproteínas, permitindo que estas transportem maior quantidade de colesterol éster (Spritz et Mishkel, 1969).

A dieta rica em gordura saturada aumenta o CT e diminui a remoção das partículas de LDL mediada por seu receptor de alta especificidade (LDLr) (Spady et al., 1985; Nicolosi et al., 1990). Além disso, quando associada ao colesterol, esta gordura é capaz de reduzir a expressão de mRNA de LDLr (Fox et al., 1987; Bennet et al., 1995; Srivastava et al., 1995), bem como a atividade do LDLr de forma dose-dependente, quando

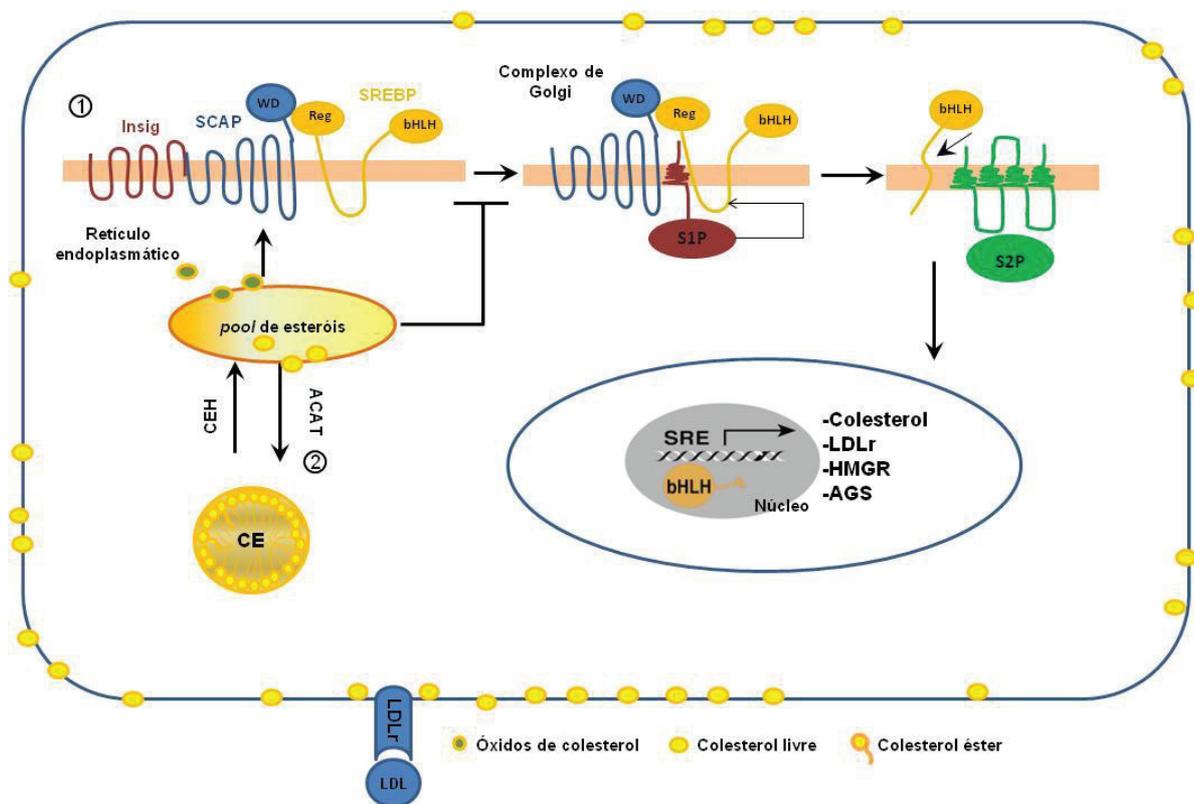
ingerida juntamente com dieta enriquecida com colesterol (Woollett et al., 1992; Spady et al., 1985; Mustad et al., 1996). Entretanto, demonstrou-se que, isoladamente, o palmitato não foi capaz de reduzir a expressão de mRNA de LDLr ou o conteúdo de proteína de LDLr, mas diminuiu em cerca de 30% a atividade deste receptor (Srivastava et al., 1995).

A regulação da expressão do mRNA de LDLr é modulada especialmente pelas concentrações intracelulares de colesterol e resulta de mecanismos que envolvem: 1) a proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide (SREBP), que se encontra ligada à proteína ativadora da clivagem do SREBP (SCAP) no retículo endoplasmático, a qual encontra-se ancorada a proteína Insig (gene induzido pela insulina). A SCAP apresenta domínios sensíveis ao colesterol enquanto que a Insig liga-se a óxidos de colesterol (Radhakrishnan et al., 2007). Desta forma, a presença de colesterol e óxidos de colesterol faz com que SCAP-SREBP permaneçam ancoradas no retículo endoplasmático. Em baixas concentrações de esteróides intracelular, a SCAP se desliga da Insig e escolta o SREBP para o complexo de Golgi, onde duas proteases residentes, *Site-1* protease (S1P) e *Site-2* protease (S2P), clivam o SREBP, liberando a porção NH<sub>2</sub>-terminal. Esta transloca para o núcleo, ligando-se ao elemento responsivo a esteroide (SRE), localizado na região promotora dos genes alvo, entre eles o do LDLr, ativando então sua transcrição (Brown et al., 1997; Horton et al., 2002); 2) redistribuição dos *pools* de colesterol intracelular (livre e éster), os quais dependem da ação da enzima acilcolesterol aciltransferase (ACAT) (Daumerie et al., 1992). Dentre os ácidos graxos, o ácido oleico apresenta maior afinidade pela ACAT e

induz aumento de sua atividade (Rumsey et al., 1995). Desta forma, a atividade da ACAT pode modular a distribuição do colesterol intracelular disponível para regulação da via do SREBP (Daumerie et al., 1992; Rumsey et al., 1995).

Em relação à modulação da atividade do LDLr pelos ácidos graxos saturados, Srivastava et al. (1995) sugerem que esta pode estar envolvida com a alteração da fluidez de membrana devido à incorporação de fosfolípidos (FL) contendo ácido graxo saturado. Estes podem alterar as características físico-químicas da membrana, comprometendo a atividade do LDLr (Srivastava et al., 1995).

Os mecanismos acima descritos encontram-se ilustrados na **Figura 1**.



**Figura 1 - Regulação do conteúdo de LDLr. (1)** O complexo Insig-SCAP-SREBP encontra-se inserido na membrana do retículo endoplasmático. O colesterol e óxidos de colesterol promovem a ligação da SCAP a Insig, inibindo o processamento do SREBP. Com a diminuição do *pool* intracelular de colesterol, o SREBP é transportado para o complexo de Golgi pela SCAP onde duas proteases, S1P e S2P, atuam sequencialmente liberando o domínio NH<sub>2</sub>-terminal do SREBP, que transloca para o núcleo e se liga ao SRE na região promotora dos genes-alvo, como LDLr, ativando sua transcrição. **(2)** O *pool* intracelular de colesterol é, em parte, modulado pela ação da enzima ACAT. CEH – Colesterol Ester Hidrolase; ACAT – acilcolesterol aciltransferase; Insig - gene induzido pela insulina; CE – colesterol éster (Horton et al., 2002; Radhakrishnan et al., 2007)

Ainda com relação à ação hiperlipidêmica dos ácidos graxos saturados, foi descrito que estes são capazes de induzir a expressão hepática de PGC-1 $\beta$ , o qual induz a expressão de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo hepático de lípidos, SREBP1c e receptor X

hepático (LXR). Com isso, eleva a síntese hepática de lípidos e a produção e secreção de VLDL ricas em colesterol e TG, culminando com o aumento da trigliceridemia e colesterolemia (Lin et al., 2005).

Já se demonstrou que lipoproteínas ricas em ácidos graxos saturados induzem redução da captação de LDL e aumentam a expressão de mRNA de SREBP-1c em células de linhagem imortalizadas derivadas de carcinoma hepático humano (Hep G2) (Jackson et al., 2006).

Um estudo em animais submetidos à dieta enriquecida com ácidos graxos saturados demonstrou que estes são capazes de aumentar a captação de CE das LDL na parede dos vasos de camundongos selvagens (C57BL/6) e de camundongos deficientes para apo E (apo E-KO). Além disso, aumentaram o conteúdo e a atividade de lipoproteína lipase (LPL) na parede das artérias (Seo et al., 2005). Já se demonstrou que a LPL é capaz de estimular a captação de CE das LDL por vias independentes do SR-BI, contribuindo assim para o avanço da lesão (Seo et al., 2000).

Com relação à ação inflamatória desses ácidos graxos, sabe-se que os ácidos palmítico e esteárico são capazes de ativar a resposta inflamatória de macrófagos J774 induzindo aumento da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  já na primeira hora de tratamento, bem como elevação das concentrações dessa citocina no meio de cultura (de Lima-Salgado et al., 2011).

Os ácidos graxos saturados podem induzir a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2), Interleucina 1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) por meio da

interação com o receptor *Toll-Like 4* (TLR 4) (Lee et al., 2001). Demonstrou-se também que o ácido graxo saturado induz a maturação de células dendríticas (CD), aumentando a expressão de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras; além disso, induz à secreção de citocinas próinflamatórias (IL-12p70 e IL-6) pelas CD, o que leva à ativação de células T *naive*. Essa regulação é, em parte, modulada por TLR 4 e inibida por ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (Weatherill et al., 2005).

### **Ácidos graxos poli-insaturados**

Os ácidos graxos poli-insaturados apresentam angulações na cadeia carbônica, ocupando maior espaço dentro das partículas de LDL, diminuindo, portanto, a capacidade desta lipoproteína transportar colesterol (Spritz et Mishkel, 1969).

Os ácidos graxos poli-insaturados são capazes de reduzir o colesterol plasmático (Goodnight et al., 1982) e TG (Shepherd et al., 1980) reduzindo com isto o risco de doença cardiovascular (Mozaffarian et al., 2010) quando usados em substituição aos ácidos graxos saturados. Porém, quando consumidos em quantidade superior a 35% do valor calórico total, podem reduzir as concentrações de apolipoproteína A-I (apo A-I) e de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) (Rudel et al., 1990; Mattson et al., 1985; Montoya et al., 2002). Vale ressaltar que, nesses estudos, a redução de colesterol nos grupos que consumiram dieta rica em poli-insaturados se deu em todas as frações e, desta forma, o percentual de

colesterol transportado nas HDL não está diminuído quando comparado ao grupo que consumiu dieta rica em ácidos graxos saturados.

A capacidade hipocolesterolemizante dos ácidos graxos poli-insaturados pode ser atribuída à redução da síntese das partículas ricas em apolipoproteína B (apo B) (Chan et al., 2003; Ouguerram et al., 2006) associada ao aumento do catabolismo de LDL. Este último pode estar envolvido com o aumento da atividade do LDLr (Woollett et al., 1992) e da fluidez da partícula conferida pelo conteúdo de colesterol e TG, o que pode afetar propriedades de sua superfície, influenciando o catabolismo da partícula. Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados são capazes de aumentar a excreção de esteroides neutros e ácidos biliares (Nestel et al., 1975).

Outra ação dos ácidos graxos poli-insaturados está envolvida com a transcrição do SREBP, que é dependente de LXR. Este, após formar heterodímeros com o receptor X retinóico (RXR), se liga ao elemento responsivo, ativando a transcrição de seus genes-alvo. Para que ocorra a formação dos heterodímeros, os fatores de transcrição nuclear, LXR e RXR, precisam ser ativados por seus ligantes (óxidos de colesterol e 9-*cis*-ácido retinoico, respectivamente). Os ácidos graxos poli-insaturados atuam como antagonistas de LXR impedindo sua ativação e, conseqüentemente, a transcrição do SREBP (Ou et al., 2001).

A incorporação de ácidos graxos poli-insaturados em FL da membrana do retículo endoplasmático é capaz de modular a ação dos óxidos de colesterol, interferindo na compartimentalização da membrana e

reduzindo o processamento do SREBP e sua translocação para o núcleo. Desta forma, os ácidos graxos poli-insaturados modulam a transcrição dos genes-alvos do SREBP (Gale et al., 2009). Por outro lado, ácidos graxos saturados exercem papel contrário, ativando o processamento e a translocação do SREBP para o núcleo, induzindo a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de lípidos (Gale et al., 2009). Neste trabalho, os autores propõem um mecanismo adicional pelo qual esses ácidos graxos modulam o metabolismo lipídico.

Por outro lado, as insaturações na cadeia carbônica dos ácidos graxos poli-insaturados os tornam menos estáveis e mais suscetíveis à peroxidação (Mazière et al., 1998). O conteúdo de ácidos graxos das LDL reflete o tipo de gordura proveniente da dieta (Callow et al., 2002). Desta forma, dieta rica em poli-insaturados pode aumentar a suscetibilidade das LDL à oxidação (Večeřa et al., 2003). Essas partículas, quando oxidadas, são captadas por receptores *scavengers* de macrófagos, o que pode agravar o processo aterosclerótico (Steinberg et al., 1989; Parthasarathy et al., 1992; Mazière et al., 1998). Entretanto, efeitos contrários têm sido demonstrados e sugerem que a suplementação com doses crescentes (200 a 800 mg/dia) de ácido docosaenoico pode conferir efeito protetor e antioxidante às LDL (Calzada et al., 2010).

Além disso, sabe-se que a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série  $\omega$ -3, contidos na gordura de peixes de águas frias, docosahexaenoico (DHA) (22:6n-3) e eicosapentaenoico (EPA) (20:5n-3), está relacionada com redução da mortalidade por DCV

(Skeaff e Miller, 2009; Mozaffarian e Wu, 2011). Diversos mecanismos relacionados às ações destes ácidos graxos são citados para explicar seus efeitos no desfecho cardiovascular, como: 1) redução da trigliceridemia (Harris e Bulchandani, 2006); 2) melhora da função endotelial (Dangardt et al., 2010); 3) ação anti-inflamatória, reduzindo biomarcadores inflamatórios, como interleucina 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Dangardt et al., 2010); 4) ação anti-trombótica; 5) efeito anti-arrítmico demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*; resultados sugerem que os ácidos graxos da série  $\omega$ -3 influenciam diretamente a eletrofisiologia de miócitos atriais e ventriculares, fato que parece justificar a redução de episódios de arritmia (McLennan, 2001). Apesar de bem estabelecida na literatura as ações fisiológicas destes ácidos graxos sobre diversos parâmetros relacionados à doença cardiovascular, estudos recentes mostram que a sua suplementação não traz benefícios tanto na prevenção primária quanto na secundária (Yokoyama et al., 2007; Kromhout et al., 2010; Galan et al., 2010 ).

O ácido graxo alfa-linolenico (ALA) (18:3n-3), também da série  $\omega$ -3, é encontrado principalmente em oleaginosas e seus óleos. O ALA, assim, como o ácido graxo linoleico (18:2n-6), não pode ser sintetizado pelo organismo humano e, portanto, devem ser providos pela dieta. Endogenamente, o ALA, pode ser convertido a EPA e este a DHA. Entretanto, essa converção é bastante limitada em humanos e desta forma, a maior parte do conteúdo tecidual e circulante de EPA e DHA é determinada pela dieta (Mozaffarian e Wu, 2011). É importante ressaltar, no entanto, que a

suplementação de ALA também não é necessária quando o consumo de óleo de soja e de canola, suas principais fontes, estiver adequado.

### **Ácidos graxos monoinsaturados**

Os ácidos graxos monoinsaturados possuem uma única dupla ligação e seu principal representante na dieta é o ácido oleico (18:1). O conceito de que esses ácidos graxos conferem proteção contra DCV, advém especialmente de estudos realizados em populações de regiões do Mediterrâneo, que apresentam baixa prevalência de DCV e cujo principal componente da gordura da dieta é o azeite de oliva, rico em ácidos graxos monoinsaturados (Menotti et al., 1989; 1999). No entanto, a prevenção dessas doenças não pode ser atribuída exclusivamente ao consumo de azeite de oliva, mas também a outros alimentos utilizados por essa população, como grãos integrais, frutas, peixes e hortaliças (Giugliano e Esposito, 2008). Já se demonstrou que, isoladamente, o consumo de ácidos graxos monoinsaturados não se correlaciona com a diminuição da mortalidade cardiovascular (Oh et al, 2005).

Os ácidos graxos monoinsaturados são capazes de reduzir as concentrações de LDL-c sem diminuir concomitantemente o HDL-c. Desta forma, produzem perfil lipídico mais favorável quando comparado aos ácidos graxos poli-insaturados (Mattson et al., 1985; Hodson et al., 2001).

Entretanto, ainda há controvérsia a esse respeito, uma vez que alguns estudos em animais (Rudel et al., 1995; 1998; Pedersen et al., 2000) e em humanos mostraram resultados deletérios do consumo de dietas

enriquecidas com ácidos graxos monoinsaturados, como a diminuição da remoção de colesterol celular quando comparados aos ácidos graxos poli-insaturados (Montoya et al., 2002). Todavia, outros estudos não corroboraram os achados de Montoya et al (2002), e mostraram não haver diferença no efluxo de colesterol celular após o consumo de dietas enriquecidas com ácidos graxos monoinsaturados, poli-insaturados e saturados (Solà et al., 1997; Gilotte et al., 1998; Blanco-Molina et al., 1998)

Em outro estudo, realizado em humanos, foi demonstrado que o colesterol oleato plasmático está relacionado com maior espessamento da camada íntima dos vasos (Ma et al., 1997). Todavia, nesta mesma população, verificou-se por meio de questionário de frequência alimentar, que o colesterol oleato plasmático não se correlacionou com o consumo de ácidos graxos monoinsaturados, mas sim com o consumo de saturados. A explicação para este fato é a conversão de ácido esteárico (18:0) a oleico (18:1) por meio da ação da enzima esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1) (Bonanome et al., 1988) e também, pelo conteúdo de ácido oleico nas gorduras animais.

### **Ácidos graxos *trans***

Os ácidos graxos *trans* são isômeros geométricos dos ácidos graxos *cis*. Podem ser produzidos por meio da bio-hidrogenação da gordura por ação microbiana em animais ruminantes (Wolff et al., 2001) e, principalmente, pela hidrogenação industrial de óleos vegetais (Block et al.,

1994), sendo o ácido eláidico (*trans*18:1, n-9) a principal fonte dietética de ácidos graxos *trans*.

Os ácidos graxos *trans* possuem ações deletérias e seu consumo elevado induz aumento das concentrações de TG, CT, LDL-c e colesterol das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-c). Além disso, eles reduzem as concentrações de HDL-c ante os ácidos graxos saturados (Mensink et al., 1990; Lichtenstein et al., 1999; Grundy et al., 1990; Schaefer, 2002). Isso pode, em parte, ser explicado: 1) pelo aumento do catabolismo da apo A-I, levando a menor formação de pré- $\beta$ -HDL e HDL (Matthan et al., 2000; 2004); 2) pela diminuição do catabolismo da apo B100, aumentando assim as concentrações plasmáticas de partículas ricas em apo B, como VLDL e LDL (Matthan et al., 2000; 2004); e 3) pelo aumento da atividade da CETP, enriquecendo partículas que contêm apo B com CE, tornando-as mais aterogênicas e enriquecendo partículas de HDL com TG (Khosla et al., 1997). Uma vez enriquecidas com TG, as partículas de HDL são removidas mais rapidamente pelo fígado, o que diminui sua concentração (Vergès et al., 2009).

Estudo em animais demonstrou que dieta enriquecida em ácidos graxos *trans* foi capaz de aumentar a expressão hepática de genes envolvidos na síntese de TG e a produção de VLDL. Verificou-se aumento da expressão da enzima ácido graxo sintase, SREBP, da proteína microssomal de transferência de triglicérides (MTP) e de apo B100. Os resultados desse estudo sugerem ainda alteração dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo decorrente do consumo de dieta *trans*, evidenciada pela redução de

30% das concentrações plasmáticas de vitamina E e aumento de 18% de F2-isoprostano. Além disso, o grupo *trans* apresentou maior expressão de mRNA da proteína regulada pela glicose de 78 KDa (Grp78), chaperona do retículo endoplasmático cuja expressão está aumentada durante o estresse oxidativo (Cassagno et al., 2005).

Outro efeito deletério do aumento do consumo de ácidos graxos *trans* está relacionado ao perfil das lipoproteínas, que tende a se tornar mais aterogênico em função do incremento de partículas de LDL pequenas e densas (Mauger et al., 2003).

A análise dos dados do *Nurses Health Study* concluiu que a substituição dietética dos ácidos graxos saturados e *trans* por monoinsaturados e poli-insaturados é mais eficaz para a prevenção de DCV que a redução do total de gordura da dieta (Hu et al., 1997). Além disso, nessa mesma população, outro estudo analisou a relação entre o consumo de diferentes tipos de gordura e o risco de diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). Mostrou-se que o consumo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados não apresentou associação com o risco de DM2. Por outro lado, o consumo de ácidos graxos *trans* aumentou e o de poli-insaturados reduziu o risco de DM2 (Salmerón, 2001).

Em outro estudo, no qual se avaliou a associação entre o consumo dos diferentes tipos de gordura e o risco de desenvolvimento de hipertensão em mulheres, após análise multivariada com ajuste para fatores relacionados à obesidade, demonstrou-se que apenas o consumo de ácidos

graxos *trans* apresentou associação positiva com aumento do risco de hipertensão arterial (Wang et al., 2010).

Além de elevarem a incidência de doença cardiovascular por ação direta sobre fatores de risco, os ácidos graxos *trans* também o fazem por meio da indução de injúria endotelial. Estudo *in vitro* em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) demonstrou que o ácido elaídico pode provocar morte celular por induzir a ativação da via das caspases (Zapolska-Downar et al., 2005).

Com relação à resposta inflamatória, o consumo de ácidos graxos *trans* é capaz de aumentar a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em humanos (Han et al., 2002). Em indivíduos com DCV estabelecida, os ácidos graxos *trans* foram positivamente associados com inflamação sistêmica, representada pelo aumento das citocinas próinflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (Mozaffarian et al., 2004). Esses estudos demonstram que, além dos efeitos adversos no metabolismo lipídico, o ácido graxo *trans* é capaz de induzir perfil próinflamatório agravando ainda mais suas ações deletérias à saúde.

### **Lipoproteínas e aterogênese**

A DCV tem como base a formação de placas de ateroma na camada íntima da parede das grandes artérias. Nesse processo, a retenção subendotelial de LDL parece ser o passo inicial do desenvolvimento de aterogênese (Skálén et al, 2002).

Diversos estudos clínicos demonstram os benefícios cardiovasculares das terapias que visam à redução das concentrações de colesterol total e LDL-c (De Caterina et al, 2010). O aumento das concentrações plasmáticas de LDL-c facilita seu acúmulo na camada íntima dos vasos, onde podem sofrer diferentes modificações como oxidação, glicação, lipólise e proteólise (Lusis, 2000).

Entre as partículas de LDL, as pequenas e densas entram com maior facilidade na camada íntima, onde são oxidadas, liberando fatores inflamatórios que podem ativar células endoteliais. Estas promovem a expressão de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e moléculas de adesão (molécula de adesão celular vascular – VCAM; molécula de adesão intercelular – ICAM; E-selectina), que medeiam o recrutamento e a ligação de monócitos ao endotélio vascular, permitindo que estes penetrem no vaso (Virella et al.,1995; Lusis, 2000; Earl et al., 1998; Hansson, 2005). Uma vez na íntima dos vasos, ocorre a diferenciação de monócitos em macrófagos que, por expressarem receptores *scavengers* (*scavenger receptors* classe B, tipo I - SR-BI; *scavenger receptors* classe A – SRA; e *cluster differentiation 36* - CD36), captam LDL modificadas, levando à formação de células espumosas e contribuindo com a propagação da lesão.

Os macrófagos contidos no interior da placa são capazes de secretar citocinas proinflamatórias, que estão envolvidas na progressão da lesão (Ross, 1999; Lusis, 2000), bem como fatores de crescimento e metaloproteinases, que induzem a proliferação celular e

degradação da matriz, o que pode alterar a estabilidade da placa aterosclerótica (Barter, 2005).

Por outro lado, está bem demonstrada a relação inversa entre as concentrações plasmáticas de HDL e doença coronariana em estudos populacionais (Abbott, 1988).

O transporte reverso do colesterol (TRC) é um dos meios pelos quais a HDL exerce função ateroprotetora, removendo o colesterol de tecidos periféricos e de macrófagos presentes na íntima dos vasos, e enviando-o ao fígado para ser excretado na bile (Lewis e Rader, 2005). Esse processo é fundamental para a homeostase do colesterol em células da periferia, já que estas não são capazes de degradá-lo. Com relação à sua ação antiaterogênica, as HDL também protegem a LDL da oxidação, efeito que se deve, em parte, à ação da paraoxonase (PON), enzima ligada à HDL. Esta possui ação antioxidante e hidrolisa peróxidos lipídicos, impedindo que estes se acumulem nas LDL. Além disso, as HDL reduzem a expressão de citocinas próinflamatórias que induzem o aumento de moléculas de adesão pelas células do endotélio vascular (Durrington et al., 2001).

A primeira etapa do TRC envolve a transferência de CL e FL da membrana plasmática das células para partículas aceptoras, como apolipoproteínas e HDL (Ho et al., 1980; Hara et al., 1991). Em seguida, o colesterol é esterificado pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e transportado de volta ao fígado. Esse transporte se dá por duas vias: 1) direta, na qual a HDL contendo colesterol retorna ao fígado, é metabolizada

pela lipase hepática, transfere o CE através do receptor SR-BI e retorna ao plasma como HDL<sub>3</sub>; 2) indireta, por meio da transferência do CE das partículas de HDL para lipoproteínas plasmáticas contendo apo B, que são, posteriormente, captadas por receptores hepáticos de alta especificidade (LDLr) (Passarelli et al., 1997).

A CETP participa da via indireta de remoção do CE. Essa proteína é responsável pela transferência de CE das HDL para lipoproteínas ricas em apo B, recebendo em troca TG. Essa via de remoção é responsável pela retirada de dois terços do colesterol plasmático em seres humanos (Lagrost et al., 1994).

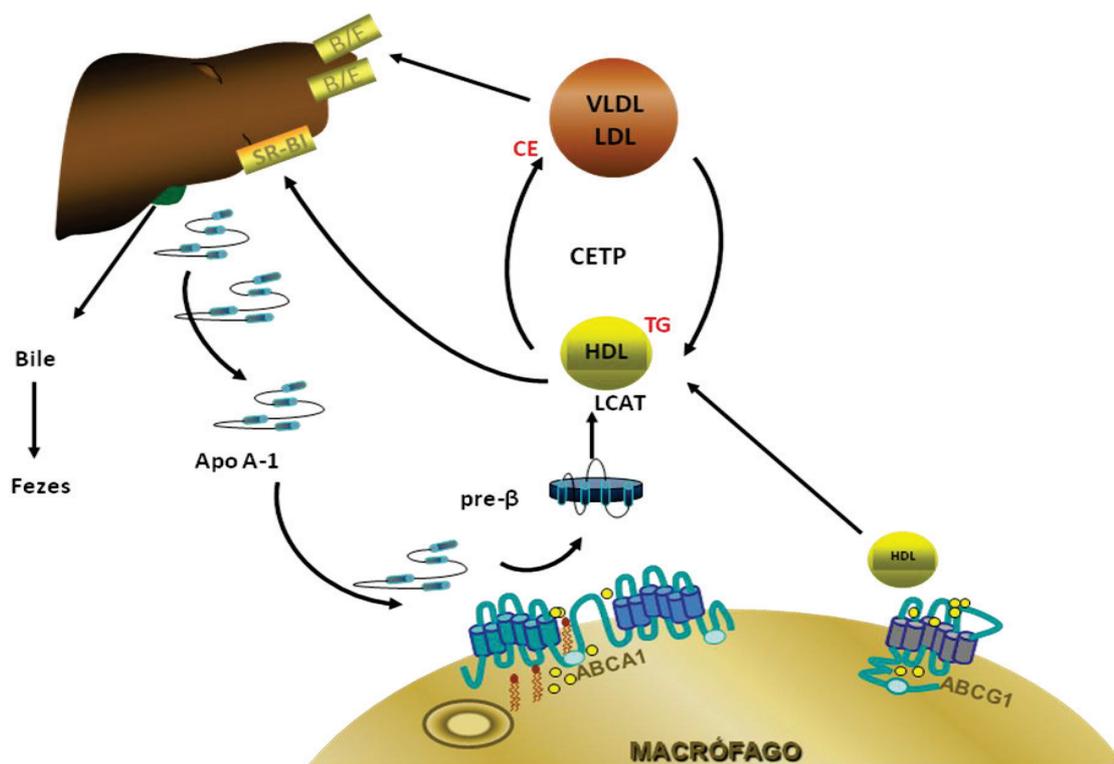
### **Receptores envolvidos no transporte reverso do colesterol**

A remoção de colesterol celular é a primeira etapa do TRC. São conhecidos três mecanismos de remoção: 1) difusão aquosa; 2) difusão mediada pelo SR-BI; e 3) efluxo mediado pelos transportadores ABCA1 e ABCG1. Nos três mecanismos é necessária a presença de partícula aceptora de colesterol (Phillips et al., 1987; Yancey et al., 2003; Vaughan et al., 2005), sendo preponderante a via do ABCA1.

A difusão aquosa envolve o deslocamento do CL presente no folheto externo da membrana celular e sua difusão através da interface aquosa até a colisão com uma molécula aceptora. O efluxo de colesterol tanto por difusão aquosa como mediado pelo SR-BI, é bidirecional e depende do gradiente de concentração e bem como da estrutura da partícula aceptora (Johnson et al., 1991; Rothblat et al., 1999; Yancey et al., 2003). O

SR-BI possui domínio extracelular que forma um canal hidrofóbico, fundamental para o tráfego de colesterol entre a membrana celular e as lipoproteínas aceptoras que contêm FL (Connelly et al., 2001; Rodriguez et al., 1999).

Os principais transportadores envolvidos no efluxo de colesterol e FL de macrófagos são ABCA1 e ABCG1, que parecem atuar de forma sinérgica (Klucken et al., 2000; Tall 2008). O transporte mediado por esses transportadores é unidirecional, dependente de energia e da presença de partículas aceptoras. O ABCA1 medeia o efluxo de CL e FL para apolipoproteínas isentas ou pobres em lípidos, principalmente para apo A-I, influenciando na formação e nas concentrações de HDL. O ABCG1 promove efluxo para as HDL, mas não influencia as concentrações plasmáticas dessas lipoproteínas (Yancey et al., 2003; Tall 2008).



**Figura 2. Transporte reverso de colesterol.** A HDL promove o efluxo de colesterol de tecidos periféricos, incluindo macrófagos da parede arterial, e transporta-o para o fígado, para que este possa ser excretado. O ABCA1 transporta PL e CL para partículas de apo A-I pobres em lipídios, gerando pre-β-HDL e HDL. O ABCG1 promove efluxo de colesterol de macrófagos para HDL maduras. A LCAT esterifica o colesterol nas HDL. O CE das HDL pode retornar ao fígado e ser captado por receptores SR-BI, ou pela ação da CETP ser trocado por TG.

O ABCA1 é uma proteína transmembrânica com 2.261 aminoácidos, membro da família de transportadores ABC, que utilizam ATP como fonte de energia para transportar lipídios, proteínas, aminoácidos, íons e drogas através da membrana plasmática (Oram, 2002). O ABCA1 está presente no fígado, nos rins, nas glândulas adrenais, no intestino, no sistema nervoso central e nos macrófagos (Lawn et al., 2001).

A descoberta do ABCA1 deu-se por meio de estudos em indivíduos portadores de doença de Tangier (DT), nos quais se identificou

mutação no gene que codifica o transportador ABCA1. Esses pacientes apresentam baixas concentrações plasmáticas de HDL-c, efluxo de colesterol por via ativa deficiente e acúmulo de lípidos em diversas regiões do corpo, além de serem precocemente acometidos por DCV (Rust et al., 1999; Brewer et al., 2003).

O gene da apo A-I, principal proteína de superfície da HDL, encontra-se normal em pacientes com DT (Francis et al., 1995), bem como sua secreção hepática e intestinal (Glickman et al., 1978). Pelo fato de permanecer pobre em lipídeos, porém, a apo A-I é rapidamente degradada, o que explica as baixas concentrações plasmáticas de HDL encontradas nesta população (Schaefer et al., 1982).

Wang et al. (2001) demonstraram que o ABCA1 atua primeiramente translocando uma molécula de FL (como a fosfatidilcolina e a esfingomielina) para a partícula de apo-A-I, a qual, após ser enriquecida com lípidos, adquire a capacidade de promover o efluxo de colesterol celular, tanto pela via do ABCA1, como pelos demais mecanismos envolvendo SR-BI e difusão simples. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que o efluxo de FL para a apo A-I, mediado pelo ABCA1, ocorre de forma independente do efluxo de colesterol, não sendo necessário haver colesterol disponível na membrana celular para que ocorra interação da apo A-I com o transportador. Os autores sugerem, ainda, que o ABCA1 se localiza em região pobre em colesterol e rica em FL da membrana plasmática.

Desta forma, a interação da apo A-I com o ABCA1 promove a formação de partículas que, em eletroforese migram na posição

pré- $\beta$  (pré- $\beta$  HDL), prevenindo assim a degradação da apo A-I (Lee et al., 2005). As pré- $\beta$  HDL passam, então, a remover o colesterol celular e são convertidas em HDL<sub>3</sub> pela ação da enzima LCAT, que utiliza o ácido graxo presente no FL da partícula de HDL para esterificar o colesterol (Navab et al., 1998). Assim, a presença do ABCA1 funcionando é fundamental para a manutenção das concentrações de HDL no plasma.

A regulação da expressão do ABCA1 envolve mecanismos complexos, possivelmente em razão da necessidade de manutenção da homeostase intracelular de colesterol e FL. Sabe-se que o excesso de colesterol é tóxico para a célula, ao passo que concentrações baixas podem causar alterações na estrutura da membrana plasmática e prejuízos na síntese hormonal e na secreção biliar (Goedeke e Fernández-Hernando, 2012).

Os reguladores de ABCA1 mais estudados são os receptores nucleares LXR e RXR, que formam, obrigatoriamente, heterodímeros que se ligam ao elemento responsivo na região promotora do gene do ABCA1, ativando sua transcrição (Oram, 2002). Todavia, para que ocorra a formação dos heterodímeros, os fatores de transcrição nuclear, LXR ou RXR, precisam ser ativados por um de seus ligantes, como óxidos de colesterol ou 9-cis-ácido retinoico, respectivamente.

Estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com agonista de LXR é capaz de aumentar a expressão de ABCA1 (Costet et al., 2000). Além disso, já se demonstrou que camundongos LDLr-KO submetidos a dieta aterogênica suplementada com agonista sintético de LXR (GW3965)

apresentaram redução na área de lesão aterosclerótica comparados aos animais que receberam dieta aterogênica sem suplementação (Joseph et al., 2002). Entretanto, em razão de os animais também terem apresentado redução da colesterolemia, não se pode imputar apenas ao agonista de LXR, a diminuição da área de lesão (Joseph et al., 2002).

Animais com ablação gênica para LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , ou ambos, mantidos em dieta normolipídica e normocolesterolêmica, apresentaram acúmulo de células espumosas em diferentes órgãos, inclusive na camada íntima da artéria. Isso demonstra a importância dos LXR no metabolismo lipídico e sua ação protetora no desenvolvimento de aterosclerose (Schuster et al., 2002).

Outros metabólitos lipídicos também podem interferir na expressão do ABCA1. Por exemplo, os ácidos graxos poli-insaturados, por serem ligantes de LXR, são capazes de antagonizar a ação dos óxidos de colesterol por competir pela ligação com o LXR (Pawar et al., 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que ácidos graxos poli-insaturados, como o linoleico e o araquidônico, podem reduzir o conteúdo de ABCA1 na membrana plasmática sem alterar o conteúdo celular de mRNA. Este fato ocorre em razão de ativarem vias de degradação da proteína e reduzirem o conteúdo de ABCA1 de forma tempo-dependente (Wang et al., 2005).

Sabe-se que a degradação de ABCA1 induzida por ácidos graxos insaturados está associada ao aumento da fosforilação da proteína em resíduos de serina desestabilizando-a e promovendo sua degradação (Wang e Oram, 2007). Com a diminuição de ABCA1 disponível

na membrana plasmática, há redução da ligação com a apo A-I e consequentemente, redução do efluxo de FL e colesterol mediado pela apo A-I. Esta, por não ter sido “lipidada”, é rapidamente catabolizada nos rins (Wang et al., 2002; Murthy et al., 2004). Essa via de degradação do ABCA1 parece distinta dos mecanismos envolvendo a via da calpaína e a fosforilação de resíduos de treonina (Martinez et al., 2003).

Em estudo realizado em camundongos transgênicos com expressão aumentada de ABCA1 humano, observou-se maior concentração de HDL-c, apo A-I e apo A-II, bem como aumento do efluxo de colesterol de macrófagos e fibroblastos mediado pela apo A-I. Isso sugere que o aumento da expressão do ABCA1 resulta em aumento proporcional do efluxo de colesterol celular (Singaraja et al., 2001).

Outro estudo sobre a expressão de ABCA1 em placas de ateroma demonstrou que, embora as concentrações de mRNA de ABCA1 se mostrassem aumentadas nos locais de lesão, o conteúdo da proteína se encontrava-se diminuído, evidenciando a importância da regulação pós-traducional (Albrecht et al., 2004).

### **Dieta e aterosclerose experimental**

Estudos experimentais têm sido realizados com a finalidade de avaliar os efeitos dos diferentes ácidos graxos no perfil lipídico e o desenvolvimento da aterosclerose em animais (Rudel et al., 1998; Rudel et al., 1995; Merkel et al., 2001; Nicolosi et al., 1998; George et al., 2000). No entanto, os resultados são conflitantes, provavelmente em razão da utilização

de diferentes modelos experimentais e da falta de padronização das dietas com relação ao tempo de consumo e composição de ácidos graxos.

Demonstrou-se em camundongos LDLr-KO submetidos a dietas hiperlipídicas enriquecidas com colesterol, que o consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados aumentou as concentrações plasmáticas de CT e a área de lesão aterosclerótica em relação aos animais submetidos a dieta enriquecida com ácidos graxos poli-insaturados (George et al., 2000). Entretanto, em outro estudo usando o mesmo modelo animal, os autores mostraram que dietas enriquecidas com ácidos graxos monoinsaturados e carboidratos se mostraram mais aterogênicas em comparação às dietas enriquecidas com ácidos graxos poli-insaturados e saturados (Merkel et al., 2001).

Em 1998, outro estudo avaliou o efeito dos ácidos graxos 8:0, 14:0, *cis*-18:1 e *trans*-18:1, sobre o perfil lipídico e o desenvolvimento de aterosclerose. Observou-se que o consumo de dietas ricas em ácidos graxos *cis*-18:1 ou *trans*-18:1 induziu perfil lipídico e *Lag phase* (medida padrão da oxidação da LDL) semelhantes. Contudo, a área de lesão na aorta foi maior no grupo *cis*-18:1 comparado ao grupo *trans*-18:1 (Nicolosi et al 1998).

Rudel et al. (1998) demonstraram, em animais LDLr-KO com superexpressão de apo B-100 humana, que o consumo de dieta rica em ácidos graxos *trans* aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de CT, VLDL-c, LDL-c e TG, bem como também as concentrações de CL e CE na camada íntima dos vasos quando comparada

ao consumo de dieta enriquecida com ácido graxo poli-insaturado (série  $\omega$ -3 ou série  $\omega$ -6, respectivamente, n-3 ou n-6), monoinsaturado ou saturado.

Apesar de estudos realizados *in vitro* com ácido graxo poli-insaturado terem demonstrado sua capacidade de reduzir o conteúdo celular de ABCA1, diminuindo com isso o efluxo de colesterol celular (Wang et al., 2002; Murthy et al., 2004), o consumo desses ácidos graxos por animais mostrou efeito variando de neutro a benéfico com relação à formação de lesão aterosclerótica (Rudel et al., 1998; Nicolosi et al., 1998; George et al., 2000; Merkel et al., 2001).

### **Ácidos graxos alimentares e doença hepática**

Dietas ricas em gordura em conjunto com estilo de vida sedentário estão associadas ao avanço da prevalência de obesidade no Brasil e no mundo. O aumento do peso corporal, especialmente o acúmulo de gordura visceral predispõe ao desenvolvimento de resistência insulínica (RI), dislipidemia, hipertensão e estado proinflamatório e protrombótico, que por sua vez são fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 e DCV (Grundy et al., 2005; Alegría-Ezquerria et al., 2008).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é uma condição clínica que compreende desde a esteatose hepática até NASH podendo evoluir para cirrose e até mesmo para carcinoma hepatocelular (Adams et al., 2005; Bugianesi et al., 2002). Histologicamente, define-se a NAFLD como o acúmulo intracelular de TG em mais de 5% dos hepatócitos. A caracterização do diagnóstico exclui hepatites virais ou doença hepática

autoimune e esteatose decorrente do uso de drogas ou consumo abusivo de álcool (Schindhelm et al., 2006; Targher et al., 2008; Rector et al., 2008).

A prevalência de NAFLD tem aumentado de forma significativa, concomitantemente ao aumento da síndrome metabólica (SM), variando de 15% a 25 % na população geral (Haukeland et al., 2005; Marchesini et al., 2003). Cerca de 90% dos pacientes com NAFLD apresentam um ou mais fatores da SM e aproximadamente 30% apresentam todos os fatores. Por essa razão, a NAFLD é atualmente apontada como a manifestação hepática da SM (Targher et al., 2007; Rector et al., 2008).

Embora a etiologia da NAFLD não esteja totalmente elucidada, pode-se explicá-la, em parte, pelo aumento do influxo de lípidos, decorrente de maior lipólise, predominantemente do tecido adiposo, juntamente com o excesso de gorduras da dieta (Zivkovic et al., 2007). Além disso, o aumento da lipogênese hepática, associado à diminuição da  $\beta$ -oxidação mitocondrial ou da secreção de VLDL, pode, também, predispor ao acúmulo de lípidos no fígado (Rector et al., 2008; Fabbrini et al., 2008; Browning et al., 2004; Ota et al., 2008; Postic et al., 2008). O acúmulo hepático de lípidos, por sua vez, acarreta lesão nos hepatócitos, que pode provocar inflamação e desenvolvimento de fibrose. Diversos fatores podem estar associados à progressão da doença, tais como: 1) estresse oxidativo, deflagrado por disfunção mitocondrial ou estresse do retículo endoplasmático; 2) peroxidação lipídica; 3) aumento da secreção hepática TNF- $\alpha$  e IL-6, que juntamente com as adipocitocinas, pode agravar ainda mais a doença. Por fim, a RI pode se apresentar como fator desencadeante ou como

consequência desse processo (Duvnjak et al., 2007; Targher et al., 2008; Wei et al., 2008).

A ação individual de fatores metabólicos e nutricionais na patogênese da NAFLD ainda não está totalmente elucidada. A RI parece ter papel-chave no desenvolvimento da esteatose hepática e é apontada por alguns como fator causal para o desenvolvimento da doença (Musso et al., 2003; Cave et al., 2007). Entretanto, a presença de RI não é obrigatória para a ocorrência de NAFLD. Estudos têm sido realizados em indivíduos portadores de NAFLD no sentido de identificar padrões de consumo alimentar que possam ser associados à predisposição da doença. Alguns estudos apontam associação com aumento do consumo de carboidratos e também com dieta rica em gordura (Rector et al., 2008).

Está demonstrado que tanto a quantidade quanto o tipo de ácidos graxos pode influenciar tanto a lipogênese hepática (Fabbrini et al., 2008; Browning et al., 2004; Ota et al., 2008) como a sensibilidade da ação da insulina (Postic et al., 2008; Wei et al., 2008). Além disso, dieta rica em gordura pode induzir RI (Manco et al., 2004), esteatose hepática, condições que elevam o risco de desenvolvimento de DCV (Nicolosi et al., 1998).

Já está descrito o papel aterogênico dos ácidos graxos *trans* (Mozaffarian et al., 2006) e saturados (Mensink et al., 2003), bem como os efeitos benéficos conferidos pelos ácidos graxos monoinsaturados e, em especial, os poli-insaturados. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência dos ácidos graxos *trans* no metabolismo hepático de lípidos.

## JUSTIFICATIVA

Estudo realizado em nosso laboratório, conduzido em indivíduos normocolesterolêmicos submetidos a dietas enriquecidas com ácidos graxos *trans*, saturados ou poli-insaturados, não encontrou diferença na eficiência das HDL no processo de remoção do colesterol celular (Buonacorso et al., 2007). Embora neste estudo, os ácidos graxos saturados e *trans* não tenham prejudicado o efluxo de colesterol celular, outras vias capazes de induzir aterosclerose podem ter sido ativadas, uma vez que já se encontra bem estabelecido que estes ácidos graxos elevam o risco cardiovascular (Oh et al., 2005; Sun et al., 2007a; Sun et al., 2007b). Por exemplo, o processo inflamatório contribui para o desenvolvimento de aterosclerose e pode ser modulado por ácidos graxos alimentares (Galli et al., 2009). Macrófagos e células espumosas da parede arterial secretam fatores proinflamatórios, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , que aumentam a inflamação local e contribuem para a progressão da lesão (Hansson et al., 2005). Os ácidos graxos saturados (Lee et al., 2001) e *trans* (Mozaffarian et al., 2004) aumentam a secreção de marcadores proinflamatórios, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados, especialmente os da série  $\omega$ -3, podem fazer o inverso (Lee et al., 2001).

Apesar de diversos estudos terem avaliado a ação dos diferentes ácidos graxos nos desfechos cardiovasculares, o impacto simultâneo do processo inflamatório e da alteração dos lípides plasmáticos no

desenvolvimento de aterosclerose não se encontra totalmente elucidado. Desta forma, um dos prpósitos deste estudo é o de avaliar o efeito de dietas hiperlipídicas enriquecidas com ácidos graxos saturados, poli-insaturados ou *trans*, no impacto concomitante dos lípides plasmáticos e da resposta inflamatória no desenvolvimento de aterosclerose em animais LDLr-KO.

Outro ponto que não se encontra totalmente elucidado na literatura é a influência dos diferentes padrões alimentares no desenvolvimento da doença hepática. Já se demonstrou que a quantidade e também o tipo de ácido graxo na dieta podem interferir na lipogênese hepática (Buettner et al., 2006; Giudetti et al., 2003; Jump et al., 2005; Jump et al., 2008; Spadaro et al., 2008), bem como na síntese e sensibilidade da insulina (Vessby et al., 2001; Lovejoy et al., 2001; Tremblay et al., 2004; Haag et al., 2005; Due et al., 2008). Entretanto, pouco se sabe a respeito das ações do ácido graxo *trans* no metabolismo hepático de lípides.

Por essa razão, neste estudo pretende-se também comparar os efeitos dos ácidos graxos saturados, poli-insaturados e *trans* no desenvolvimento de doença hepática. Os dados desta investigação poderão contribuir para melhor elucidar os mecanismos envolvidos na ação deletéria conferida pelo consumo de dieta rica em ácidos graxos *trans*.

## OBJETIVO

Avaliar a influência do consumo de diferentes dietas hiperlipídicas enriquecidas com ácidos graxos saturados, poli-insaturados ou *trans* sobre o desenvolvimento de lesão aterosclerótica e esteatose hepática em camundongos LDLr-KO

### Objetivos específicos

- Avaliar a influência do consumo das diferentes dietas hiperlipídicas sobre o acúmulo de lípidos, o conteúdo e a colocalização de ABCA1 e macrófago na raiz aórtica de camundongos LDLr-KO.
- Avaliar a influência das dietas sobre a estrutura da placa aterosclerótica
- Avaliar o perfil inflamatório dos animais (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), bem como a resposta inflamatória de macrófagos peritoneais ao LPS.
- Comparar a ação das três diferentes dietas hiperlipídicas no desenvolvimento de doença hepática não alcoólica e na expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático de lípidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e dieta

Camundongos LDLr-KO (C57BL/6J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, EUA) foram alimentados por 16 semanas com uma das três dietas hiperlipídicas (40% do valor calórico total sob a forma de gordura), enriquecidas com ácidos graxos saturados (SAT; n=14), poli-insaturados (POLI; n=14) ou *trans* (TRANS; n=13). As gorduras utilizadas foram especialmente desenvolvidas para o estudo pela empresa Unilever (São Paulo, Brasil) e as dietas preparadas pela Nutriexperimental (Campinas, SP, Brasil), seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves et al., 1993). As concentrações de ácido graxo oleico nas gorduras POLI e SAT foram normalizadas a fim de evitar efeitos específicos desse ácido graxo. Na gordura TRANS, em razão do processo de hidrogenação dos óleos, que converte ácido graxo monoinsaturado em saturado, não foi possível evitar a diminuição da concentração de monoinsaturado e aumento de saturado. Todas as dietas continham concentrações similares de fibras, colesterol e fitosteróis.

A gordura TRANS foi preparada com 100% de óleo de soja parcialmente hidrogenado; a gordura SAT foi preparada com 11% de óleo de oliva, 5% de óleo de soja e 84% de óleo de palma. A gordura POLI continha 54% de óleo de girasol e 46% de óleo de canola. A determinação da composição de ácidos graxos das gorduras foi realizada por cromatografia

gas-líquido (CGL) pela COGNIS Brasil (gordura TRANS) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (gorduras SAT e POLI).

A composição de ácidos graxos das gorduras é apresentada na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Composição percentual dos ácidos graxos presentes nas gorduras utilizadas no preparo das dietas**

| Ácidos Graxos<br>g/100g de gordura | SAT          | POLI        | TRANS       |
|------------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| Láurico 12:0                       | 0,42         | 0           | 0,64        |
| Mirístico 14:0                     | 0,77         | 0           | 0,38        |
| Palmítico 16:0                     | 33,87        | 4,57        | 14,38       |
| Palmitoleico 16:1 <i>cis</i>       | 0,25         | 0           | 0           |
| Esteárico 18:0                     | 4,51         | 2,83        | 17,78       |
| Elaídico 18:1 <i>trans</i>         | 0,31         | 0           | 34,7        |
| Oleico 18:1 <i>cis</i>             | 45,17        | 40,52       | 28,24       |
| Linoelaídico 18:2 <i>trans</i>     | 0,45         | 0,2         | 1,61        |
| Linoleico 18:2 (n-6) <i>cis</i>    | 13           | 47,13       | 1,33        |
| Linolênico 18:3 (n-3) <i>cis</i>   | 0,62         | 3,71        | 0,1         |
| Araquídico 20:0                    | 0,37         | 0,36        | 0,47        |
| Eicosenoico 20:1 (n-9)             | 0,21         | 0           | 0           |
| Docosanoico 22:0                   | 0            | 0,32        | 0,48        |
| <b>Total saturado</b>              | <b>39,95</b> | 8,08        | 34,12       |
| Total monoinsaturado               | 45,63        | 40,52       | 28,24       |
| Total poli-insaturado              | 13,62        | <b>50,4</b> | 1,43        |
| Total <i>trans</i>                 | 0,76         | 0,48        | <b>36,3</b> |

Fonte das gorduras: SAT (11% óleo de oliva, 5% óleo de soja, 84% óleo de palma); POLI (54% óleo de girassol, 46% óleo de canola); TRANS (100% óleo de soja hidrogenado).

Após o desmame, os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura, ciclo claro/escuro alternado de 12

horas e acesso a água e comida *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente e o consumo alimentar foi estimado diariamente pela diferença entre o peso da ração previamente oferecida e a sobra desta.

Após 16 semanas, os animais foram mantidos em privação alimentar por 12 horas e anestesiados com Ketamina (100 mg/kg, *ip*, Ketalar; Parke-Davis, Brasil) e xylazina (10 mg/kg, *ip*, Rompum; Bayer S/A, Brasil). Em seguida, os animais foram dessangrados pela veia subclávia e o sangue coletado em tubos contendo EDTA (0,1%). Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 670/06).

O coração ligado à aorta, o fígado e o tecido adiposo periepididimal foram dissecados, pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Para determinação do tecido adiposo subcutâneo, a carcaça foi congelada e mantida a -20°C para futuras análises.

### **Análises plasmáticas e perfil de lipoproteínas**

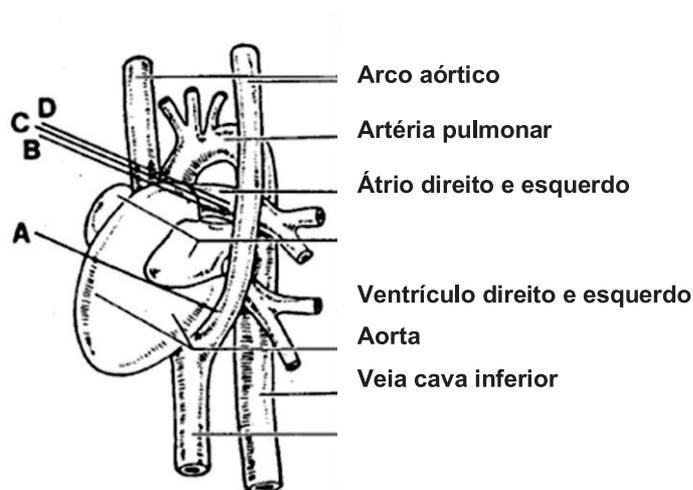
O plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C. As concentrações de CT e TG foram determinadas com a utilização de *kits* enzimático-colorimétricos (Roche Diagnostics, Alemanha). Glicose, ALT e AST foram determinadas com utilização de *kits* enzimático-colorimétricos (Labitest Diagnóstica, Brasil). Insulina foi determinada com uso de *kit* de ELISA (Alpco Diagnostics, EUA). A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Genius Plus–Tecan, Suíça) com filtro de

450nm. O índice  $HOMA_{IR}$  (*homeostasis model assessment of insulin resistance*) foi calculado pela fórmula: glicose (mg/dL) x insulina ( $\mu$ U/mL)/405 (Akagiri et al., 2008).

O perfil das lipoproteínas foi determinado por cromatografia em gel de filtração (FPLC). As frações foram coletadas e agrupadas de acordo com os picos das frações de VLDL, LDL e HDL. Alíquotas de cada fração foram utilizadas para determinação das concentrações de colesterol e TG por método enzimático em analisador Cobas Mira (F. Hoffman-La Roche, Suíça).

### **Processamento dos tecidos**

As artérias foram dissecadas, embebidas em substância criopreservante (Tissue TEK-OCT, Sakura, EUA), congeladas gradualmente e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foram realizados cortes seriados ( $4\ \mu\text{m}$ ) da região da raiz aórtica até o início da aorta ascendente (correspondente à área entre C e D, vide **Figura 3**). Os fragmentos foram fixados em lâminas silanizadas e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Fragmentos de tecido hepático de quatro animais por grupo foram incluídos em parafina para análise histológica.



**Figura 3. Anatomia do coração de camundongos.** A distância entre B e C é de aproximadamente  $250 \pm 58\mu\text{m}$  e, entre C a D  $280 \pm 67\mu\text{m}$ . A área avaliada compreende a distância entre C e D. (Paigen B et al., 1987)

### Determinação da área de lesão aterosclerótica

Os cortes realizados na região da raiz aórtica foram analisados em intervalos de  $80\ \mu\text{m}$ , para assegurar análise representativa da área estudada (Paigen et al., 1987).

Os fragmentos foram corados com Oil Red O (ORO; Sigma-Aldrich, EUA). Os cortes foram fixados em formalina 10%, lavados em água corrente e colocados em propileno glicol (100%). Em seguida, foram corados com Oil Red O e diferenciados em solução de propileno glicol (85%) (Paigen et al., 1987). Após lavagem, foram contracorados com hematoxilina de Carazzi. A área de lesão foi quantificada utilizando sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System, Alemanha) e programa de computador específico (Image-Pro Plus-Media Cybernetics, EUA). A média das áreas foi calculada para cada animal e, subsequentemente, para cada grupo. Em todo

estudo, as análises das imagens foram conduzidas por investigador cego para os grupos.

Como uma segunda medida de lesão aterosclerótica, as aortas totais (desde região ascendente até inguinal) foram delipidadas em clorofórmio:metanol (2:1) e as concentrações de CT e CL foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Rudel et al., 1998; Carr et al., 1993). A concentração de CE nas artérias foi calculada pela diferença entre as medidas de CT e CL. O conteúdo total de proteína do tecido aórtico delipidado foi determinado com o uso do *kit* de BCA (Pierce Ins. Rockford, EUA).

#### **Determinação do conteúdo de ABCA1 e do infiltrado de macrófagos por Imuno-histoquímica**

Cortes da raiz aórtica foram fixados em acetona (4°C; 10 min) e lavados em água corrente. Em seguida, foram bloqueados por 30 min com TBS e albumina de soro bovino (BSA, 1%); TBS + BSA (1%) + leite desnatado (2%); TBS + soro equino (DAKO, Dinamarca) + Tween 20 (0,05%); em seguida foram lavados com TBS + Tween 20 (0,05%). As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário policlonal anti-ABCA1 (1:500) (Novus Biologicals, EUA) ou anti-CD68 (1:600) (Serotec, EUA). Em seguida, foram lavadas com TBS + Tween 20 (0,05%), incubadas por 30 min com 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para bloqueio da peroxidase endógena, lavadas com TBS + Tween20 (0,05%) e incubadas por 90 min com anticorpo secundário

conjugado a peroxidase (1:500) (Abcam, EUA e Serotec, EUA, respectivamente). Foi aplicado substrato de revelação (DAB Substrate Kit, Vector, EUA) segundo informações do fabricante. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Carazzi. As áreas marcadas em marrom (DAB), correspondendo ao conteúdo de ABCA1 e infiltrado de macrófagos (CD68) na parede da artéria, foram quantificadas utilizando sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System, Alemanha) e programa de computador específico (Image-Pro Plus-Media Cybernetics, EUA). As médias das áreas foram calculadas para cada animal e, subsequentemente, para cada grupo.

### **Colocalização de ABCA1 e macrófagos**

As lâminas contendo cortes de raízes aórticas foram lavadas e bloqueadas para sítios inespecíficos, como segue: PBS + 1% de BSA (1hora); PBS + 1% de leite desnatado (1hora), em seguida lavadas (3 vezes/5 min) com PBS + 0,05% Tween 20. As lâminas foram incubadas *overnight*, simultaneamente, com os anticorpos (AC) primários: anti-ABCA1 (1:50) (Novus Biologicals, EUA) e anti-CD68 (1:400) (Serotec, EUA) diluídos em tampão PBS + 1% de BSA. Em seguida, foram lavadas (3 vezes/5 min) com PBS + 0,05% Tween 20 e incubadas com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos Alexafluor (Invitrogen Life Technologies, EUA), para detecção de ABCA1 Alexa 633 (vermelho; 1:500) e de macrófago Alexa 488 (verde; 1:1000). As lâminas foram lavadas com PBS + Tween 20 e incubadas por 15 min com DAPI (Invitrogen Life Technologies, EUA) para observação

dos núcleos. Todo o procedimento foi realizado em câmara escura para evitar autofluorescência das artérias. A detecção do sinal foi realizada por scanner de microscopia confocal (ZEISS LSM 510 META, Alemanha). O uso do microscópio foi aceito nos moldes do Projeto Multiusuário FAPESP e realizado no Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (INCOR) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Dr. Francisco Laurindo.

### **Conteúdo de colágeno na lesão aterosclerótica**

O conteúdo de colágeno na área de lesão aterosclerótica foi determinado na raiz aórtica por coloração de Picrosirius-red, em cortes subsequentes aos utilizados na análise de área de lesão aterosclerótica. A área marcada foi medida histomorfometricamente, utilizando sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System, Alemanha) e programa de computador específico (Image-Pro Plus-Media Cybernetics, EUA). A marcação das fibras de colágeno foi identificada por sua aparência amarela ou vermelha sob luz polarizada em aumento de 40 vezes. A fração do volume de colágeno (FVC) foi expressa como percentual da área marcada pela área total da placa.

**Análise da expressão de ABCA1 e de genes envolvidos no**  
**metabolismo de lípidos**

Após pulverização do tecido hepático (~50 mg) em temperatura de nitrogênio líquido, o RNA hepático total foi extraído com uso de trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA) de acordo com instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram determinadas por espectrofotometria. A integridade do RNA foi determinada pela visualização das bandas 28S e 18S em gel de agarose (1%) com brometo de etídio. Os transcritos de ABCA1, receptor ativado por proliferadores de peroxisoma (PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$ ), MTP, palmitoilcarnitina aciltransferase-1 (CPT-1) e SREBP-1-c foram quantificados por Transcrição Reversa seguida por Reação Quantitativa em Cadeia pela Polimerase (qRT-PCR). qRT-PCR foi realizado em Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Australia) com uso de SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Os “Primers” foram designados usando Primer3 Plus (<http://primer3.sourceforge.net>).

As seqüências dos *primers* (*sense* e *anti-sense*) foram:

**$\beta$ -Actina:** TGTTACCAACTGGGACGACA e GGGGTGTTGAAGGTCTCAA;

**ABCA-1:** GGACATGCAGAAGGTCCTGA e CAGAAAATCCTGGAGCTTGAAA;

**PPAR- $\alpha$ :** ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC e TTGCCCAGAGATTTGAGGTC;

**PPAR- $\gamma$ :** CATAAAGTCCTTCCCGCTGA e GAAACTGGCACCTTGAAAA;

**MTP:** CCTCTTGGCAGTGCTTTTTTC e ATTTTGTAGCCCACGCTGTC;

**CPT-1:** TGCCTCTATGTGGTGTCCAA e TCAAACAGTTCCACCTGCTG;

**SREBP-1:** GCGCTACCGGTCTTCTATCA e GGATGTAGTCGATGGCCTTG.

Os valores de mRNA foram normalizados em relação aos valores obtidos para o mRNA de  $\beta$ -actina, utilizado como controle interno, e normalizados com a medida dos valores obtidos dos fígados de animais alimentados com dieta padrão (Nuvilab-CR1, Nuvital, Brasil). A quantificação relativa foi calculada usando método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Pfaffl et al., 2001) com base na equivalência de amplificação comparada a  $\beta$ -actina. O modelo matemático descrito (Livak et al., 2001) foi utilizado para avaliar a expressão de PPAR- $\alpha$ , MTP e CPT-1 em relação a  $\beta$ -actina.

#### **Extração do tecido adiposo subcutâneo**

O tecido adiposo subcutâneo foi extraído individualmente. Após decapitação, as carcaças foram aquecidas (90°C) em solução contendo 2 mL de NaOH (10 M) e 20 mL de etanol (95%) até dissolução completa dos tecidos. As amostras foram acidificadas com HCl (10 N) e os lípidos extraídos com hexana (40 mL, 3 vezes). Após evaporação dos solventes, os lípidos foram ressuspensos em volume conhecido de hexana, transferidos para recipientes de vidro previamente pesados e mantidos em capela para evaporação completa do solvente. Os recipientes contendo as amostras foram pesados e o total de lípidos foi determinado gravimetricamente.

### **Análise histológica e gradação da doença hepática**

Amostras de tecido hepático de cada animal foram fixadas em solução de formaldeído 4% e coradas com hematoxilina/eosina (HE) e tricromo de Masson. As variáveis histopatológicas foram determinadas por análise cega, de acordo com Nonalcoholic Fat Liver Disease (NAFLD) Activity Score (NAS) definido pelo Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network (Kleiner et al., 2005). O escore é definido pela soma dos graus de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização (0-2). Valores de 5 ou mais estabelecem o diagnóstico de NASH; valores inferiores a 3, diagnóstico de ausência de NASH; valores entre 3 e 4 podem ser alocados nas categorias de ausência, presença ou provável NASH.

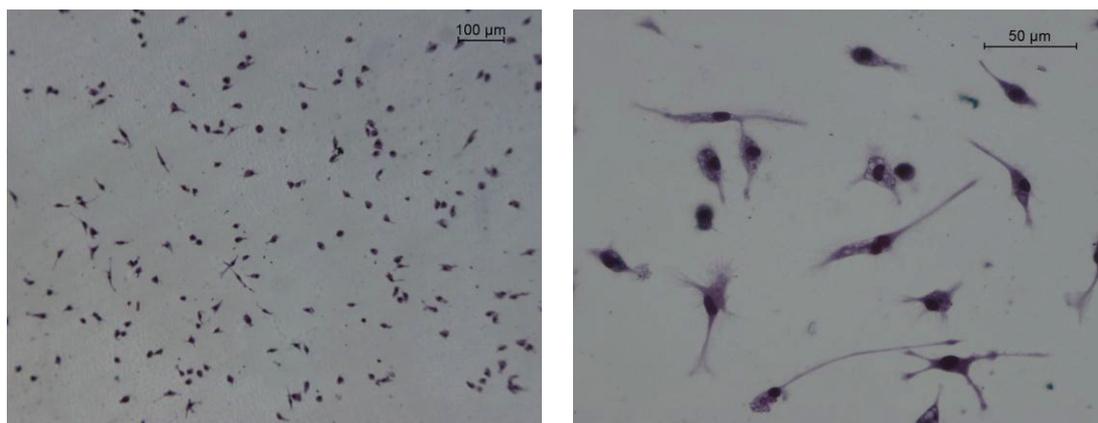
### **Análise dos lípides hepáticos**

A extração de lípides hepáticos foi realizada segundo Carr et al. (1993). Aproximadamente 200 mg de fígado foram homogeneizados e os lípides extraídos com solução (2:1) de clorofórmio:metanol (6 mL). As fases foram separadas pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,05%). A fase inferior foi removida e adicionou-se clorofórmio (1mL) contendo 0,5% de Triton X-100 para solubilização dos lípides. Em seguida os tubos foram mantidos sob nitrogênio em temperatura ambiente para evaporação total do solvente. Os tubos foram lavados com clorofórmio e em seguida submetidos a evaporação. Após adição de 1 mL de água destilada, os tubos foram submetidos a banho com agitação (37°C por 15 min), agitados

e o conteúdo utilizado para determinação do conteúdo lipídico com o uso de *kits* enzimático-colorimétricos (Roche Diagnostics, Alemanha).

### **Marcadores inflamatórios plasmáticos e resposta inflamatória de macrófagos peritoneais**

As concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram determinadas por ELISA com o uso de *kits* comerciais (R&D Systems, EUA). A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Genius Plus—Tecan, Suíça) com filtro de 450 nm. Macrófagos peritoneais, de animais alimentados com uma das três diferentes dietas por 16 semanas, foram coletados por meio de punção peritoneal, com uso de PBS estéril sem EDTA, pH 7,4. Para esse procedimento não se utilizou nenhuma substância indutora de migração de macrófagos para a cavidade peritoneal. A viabilidade celular foi determinada (89 a 98%) e as células foram plaqueadas ( $0,5 \times 10^6$ /poço) e cultivadas por 48 horas em placas de 24 poços, em RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) contendo 10% de BSA (Invitrogen Life Technologies, EUA), penicilina e estreptomicina, e mantidas em estufa (5%CO<sub>2</sub>) a 37°C. Após esse período as células foram lavadas, permanecendo apenas macrófagos aderidos à placa. Em seguida, as células foram estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma Chemical Co. EUA) por 24 horas. Marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) liberados no meio de cultura foram determinados por ELISA com uso de kits comerciais (R&D Systems, EUA). A figura abaixo mostra exemplo típico do procedimento acima descrito.



**Figura 4. Macrófagos de peritônio de camundongos submetidos a uma das dietas hiperlipídicas por 16 semanas.** As células foram contadas e cultivadas em placas de 24 poços, em meio RPMI. Após 48 horas as células foram lavadas, permanecendo na placa apenas macrófagos aderidos.

### **Análise estatística**

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade e, quando necessário, transformações logarítmicas foram realizadas antes da análise estatística. Utilizou-se One-way ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls, para comparação dos grupos. Dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. Considerou-se o nível de significância de 5% para todas as análises ( $P < 0,05$ ). A avaliação dos dados foi feita com o uso do programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., EUA). Tabelas e figuras apresentam dados não transformados, como média  $\pm$  DP ou EP.

## RESULTADOS

Ao longo do estudo, o consumo de dieta não diferiu entre os grupos, entretanto, os animais do grupo TRANS apresentaram menor ganho de peso comparado aos animais dos grupos POLI (16%) e SAT (11%). Essa diferença foi decorrente de menor acúmulo de tecido adiposo subcutâneo e de tecido adiposo periepídimal, que corresponde à gordura visceral humana, no grupo TRANS comparado aos grupos POLI e SAT. Além disso, o consumo de dieta TRANS induziu aumento do peso do fígado em 66% e 61% comparado ao consumo de dietas POLI e SAT, respectivamente (**Tabela 2**). As concentrações plasmáticas de AST e ALT não diferiram entre os grupos.

**Tabela 2 - Ganho de peso, peso relativo do fígado e do tecido adiposo, lípides hepáticos e concentrações plasmáticas de AST, ALT, TNF- $\alpha$  e IL-6 em animais LDLr-KO, alimentados com dietas SAT, POLI ou TRANS por 16 semanas<sup>1,2,3</sup>**

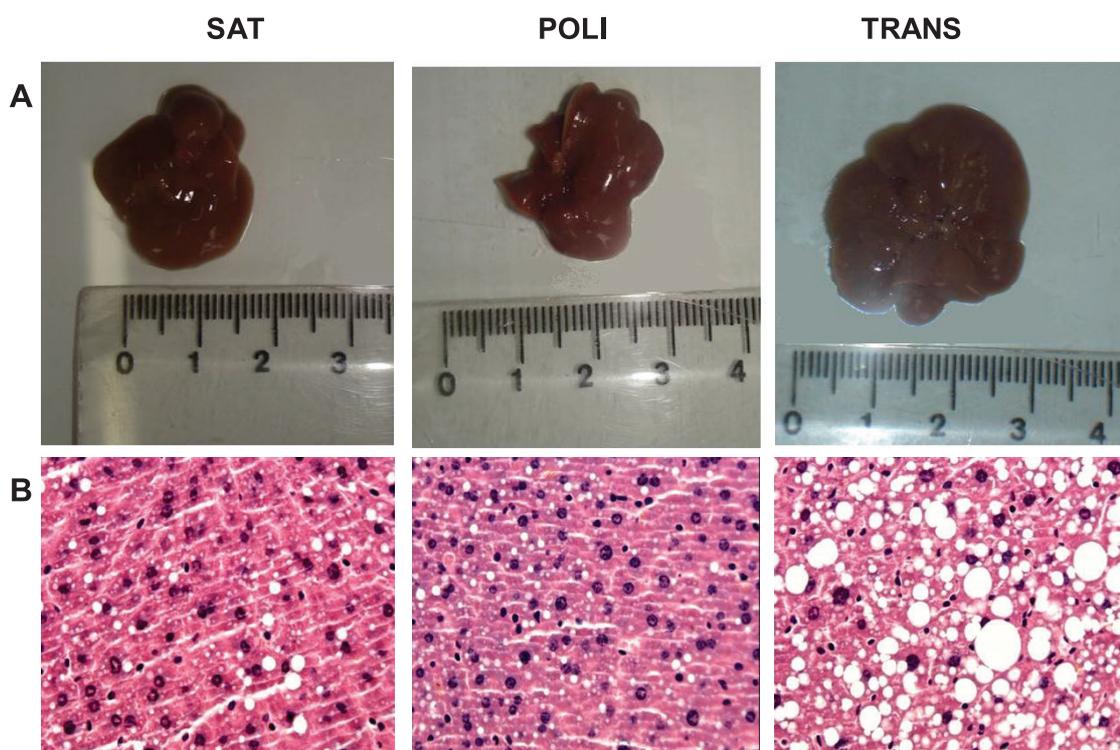
| Medidas                            | SAT                            | POLI                         | TRANS                        |
|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Ganho de peso, g/16 sem; n=14      | 19,2 $\pm$ 3,24 <sup>a,b</sup> | 20,4 $\pm$ 3,46 <sup>a</sup> | 17,1 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup> |
| Peso fígado, g/100g peso; n=14     | 3,68 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>   | 3,56 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup> | 5,93 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup> |
| TA epididimal, g/100g peso; n=10   | 2,81 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>   | 3,09 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup> | 1,88 $\pm$ 1,73 <sup>b</sup> |
| TA subcutâneo, g/100g carcaça; n=8 | 17,5 $\pm$ 5,08 <sup>a</sup>   | 17,9 $\pm$ 4,50 <sup>a</sup> | 11,2 $\pm$ 2,95 <sup>b</sup> |
| AST (U/L); n=5                     | 61,2 $\pm$ 31,7                | 70 $\pm$ 22,9                | 66,7 $\pm$ 7,2               |
| ALT (U/L); n=5                     | 34,5 $\pm$ 29,9                | 45,8 $\pm$ 38                | 31,6 $\pm$ 4                 |
| Colesterol, mg/g fígado; n=7       | 3,05 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>   | 2,53 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup> | 4,60 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup> |
| TG, mg/g fígado; n=7               | 24,3 $\pm$ 6,2 <sup>b</sup>    | 23,6 $\pm$ 11 <sup>b</sup>   | 46,2 $\pm$ 19 <sup>a</sup>   |

<sup>1</sup>Dados apresentados em media  $\pm$  DP; médias na mesma linha com letras distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), sendo  $a > b > c$ . <sup>2</sup>Tecido adiposo (TA); <sup>3</sup>Ganho de peso (peso final – peso inicial). Teste estatístico: One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

### **Dieta hiperlipídica e doença hepática não alcoólica**

Com relação ao impacto das gorduras no fígado dos animais, as três dietas induziram algum grau de esteatose, o que era esperado devido à sobrecarga de gordura oferecida na dieta. Entretanto no grupo TRANS o conteúdo hepático de CT e TG foi significativamente maior comparado aos grupos POLI e SAT (**Tabela 2**). Além de ter induzido hepatomegalia (**Figura 5, A**) e esteatose o consumo de dieta TRANS acarretou o desenvolvimento de NASH, caracterizada por esteatose macrovesicular (grau 3) e infiltrado inflamatório (grau 2). Por outro lado, os

animais alimentados com dieta SAT e POLI apresentaram esteatose microvesicular (grau 1) com discreto infiltrado inflamatório (grau 1) (**Figura 5, B**). Não foi observado processo de balonização hepatocelular ou desenvolvimento de fibrose nos grupos estudados.



**Figura 5 - Fígado dos animais LDLr-KO alimentados com dieta SAT, POLI ou TRANS por 16 semanas. (A)** Hepatomegalia induzida pelo consumo de dieta TRANS. **(B)** Animais alimentados com dieta TRANS desenvolveram macroesteatose (grau 3) e infiltrado inflamatório (grau 2) caracterizando NASH. Por outro lado, os animais alimentados com dieta SAT ou POLI apresentaram microesteatose (grau 1) e discreto infiltrado inflamatório (grau 1). A coloração de tricromo de Masson não mostrou a presença de fibrose. Fragmentos corados com hematoxilina/eosina (HE), 400x; n=5.

Para investigar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de NASH induzida pelo consumo de dieta TRANS em

animais LDLr-KO, foi determinada a expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo hepático de lípides.

A expressão de SREBP-1c no grupo TRANS foi, aproximadamente, 130% e 88% maior, comparado aos grupos POLI e SAT, respectivamente. Já a expressão de PPAR- $\gamma$  foi cinco vezes maior no grupo TRANS comparado ao grupo POLI e cerca de três vezes maior comparado ao grupo SAT. Esses dados mostram que o consumo de dieta TRANS ocasionou aumento da expressão de genes relacionados à síntese hepática de lípides aumentando, assim, a capacidade lipogênica hepática. Por outro lado, a dieta TRANS reduziu o mRNA de MTP em 46% comparado ao grupo POLI, sugerindo menor capacidade do fígado de exportar TG ( $p < 0,05$ ). As expressões de PPAR- $\alpha$  e CPT-1 não diferiram entre os grupos (**Tabela 3**). Esses resultados sugerem situação propícia ao acúmulo hepático de lípides.

**Tabela 3 - Determinação do mRNA dos genes envolvidos no metabolismo hepático de lípides dos animais LDLr-KO alimentados com dieta SAT, POLI ou TRANS por 16 semanas<sup>1,2</sup>**

| mRNA                            | SAT                    | POLI                   | TRANS                  |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>SREBP-1c</b>                 | 0,92±0,5 <sup>b</sup>  | 0,75±0,6 <sup>b</sup>  | 1,73±0,9 <sup>a</sup>  |
| <b>PPAR-<math>\gamma</math></b> | 0,36±0,10 <sup>b</sup> | 0,18±0,06 <sup>b</sup> | 0,99±0,43 <sup>a</sup> |
| <b>MTP</b>                      | 1,02±0,6 <sup>b</sup>  | 2,3±0,7 <sup>a</sup>   | 1,5±0,5 <sup>b</sup>   |
| <b>CPT-1</b>                    | 1,13±0,05              | 1,17±0,06              | 1,15±0,03              |
| <b>PPAR-<math>\alpha</math></b> | 1,07±0,15              | 1,13±0,2               | 1,02±0,1               |

<sup>1</sup>Dados apresentados em média  $\pm$  DP; médias na mesma linha com letras distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), sendo  $a > b > c$ ;  $n = 10$ .

<sup>2</sup>Resultados foram normalizados para mRNA de  $\beta$ -actina e normalizados

para a média do valor dos fígados de animais alimentados com dieta normolipídica. Dados apresentados em relação à amostra controle da reação. Teste estatístico: One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

### **Concentração de glicose e insulina plasmática**

A concentração plasmática de glicose no grupo alimentado com dieta TRANS foi maior comparado ao grupo POLI, porém não diferiu do grupo SAT. A concentração plasmática de insulina não diferiu entre os grupos. Entretanto, o cálculo do índice  $HOMA_{IR}$  para os animais alimentados com dieta TRANS foi maior comparado aos demais, indicando maior resistência insulínica no grupo TRANS (**Tabela 4**).

**Tabela 4 - Efeito do consumo das dietas SAT, POLI ou TRANS, sobre glicose e insulina plasmática e  $HOMA_{IR}$ <sup>1</sup>**

|                               | SAT                   | POLI                  | TRANS                 |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Glicose mg/dL</b>          | 285±80 <sup>a,b</sup> | 196±82 <sup>b</sup>   | 392±126 <sup>a</sup>  |
| <b>Insulina ng/dL</b>         | 1.053±0.07            | 1.054±0.003           | 1.021±0.02            |
| <b><math>HOMA_{IR}</math></b> | 21,3±6 <sup>b</sup>   | 16,4±4,3 <sup>b</sup> | 28,3±8,8 <sup>a</sup> |

<sup>1</sup>Dados apresentados em média ± DP; médias na mesma linha com letras distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), sendo  $a > b > c$ ;  $n = 8$ . Teste estatístico: One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

### **Lípides plasmáticos e perfil de lipoproteínas**

A concentração plasmática de TG nos animais do grupo TRANS foi três vezes maior que a do grupo POLI e duas vezes maior que a

do grupo SAT (**Tabela 5**). Além disso, os animais alimentados com dieta TRANS apresentaram severa hipercolesterolemia, com concentrações plasmáticas de colesterol duas vezes superiores às do grupo SAT e cinco vezes ao grupo POLI. Os animais alimentados com dieta POLI apresentaram menores concentrações de CT e TG comparados aos animais alimentados com dietas TRANS e SAT (**Tabela 5**).

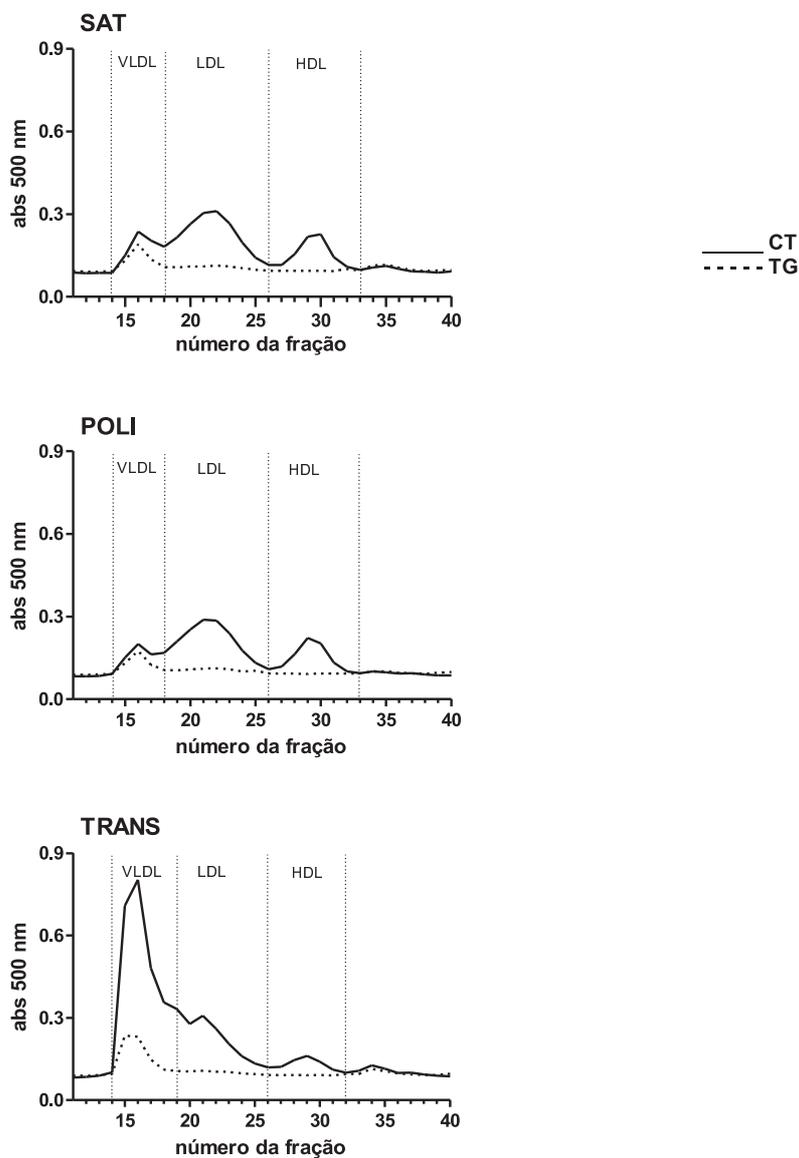
No grupo TRANS as partículas de VLDL e LDL apresentaram severo aumento das concentrações de colesterol e TG quando comparadas aos grupos SAT e POLI. Além disso, nos animais alimentados com dieta TRANS 94% do colesterol plasmático foi transportado por partículas não HDL, e 67% deste encontrava-se em VLDL, aumentando a aterogenicidade dessas partículas. Com relação as HDL, apesar de apresentarem concentrações de colesterol similares entre os grupos, no grupo TRANS apenas 6% do colesterol encontrava-se nas HDL, reforçando o perfil aterogênico das lipoproteínas desses animais (**Tabela 5**).

Além disso, a dieta TRANS induziu maior concentração de TG em VLDL e LDL comparada a SAT e POLI, e também de HDL-TG comparado a POLI (**Tabela 5; Figura 6**).

**Tabela 5 - Perfil lipídico das lipoproteínas dos animais LDLr-KO alimentados com dieta SAT, POLI ou TRANS por 16 semanas<sup>1,2</sup>**

|                         | SAT                   | POLI                | TRANS                  |
|-------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| CT, <i>mg/dL</i>        | 359±102 <sup>b</sup>  | 189±66 <sup>c</sup> | 1.152±449 <sup>a</sup> |
| TG, <i>mg/dL</i>        | 154±40 <sup>b</sup>   | 108±55 <sup>c</sup> | 423±174 <sup>a</sup>   |
| VLDL-c, <i>mg/dL</i>    | 170±121 <sup>b</sup>  | 49±25 <sup>b</sup>  | 701±292 <sup>a</sup>   |
| (%)                     | (41±2)                | (30±2)              | (67±7)                 |
| LDL-c, <i>mg/dL</i>     | 160±76 <sup>b</sup>   | 91±54 <sup>b</sup>  | 293±154 <sup>a</sup>   |
| (%)                     | (40±13)               | (45±16)             | (27±7)                 |
| HDL-c, <i>mg/dL</i>     | 70±27 <sup>a</sup>    | 50±27 <sup>a</sup>  | 54±10 <sup>a</sup>     |
| (%)                     | (19±9)                | (25±9)              | (6±3)                  |
| não-HDL-c, <i>mg/dL</i> | 260±152 <sup>b</sup>  | 140±56 <sup>b</sup> | 995±426 <sup>a</sup>   |
| (%)                     | (80±9)                | (75±9)              | (94±3)                 |
| VLDL-TG, <i>mg/dL</i>   | 115±36 <sup>b</sup>   | 73±40 <sup>b</sup>  | 296±112 <sup>a</sup>   |
| (%)                     | (74±1)                | (74±5)              | (80±8)                 |
| LDL-TG, <i>mg/dL</i>    | 28±11 <sup>b</sup>    | 21±11 <sup>b</sup>  | 44±16 <sup>a</sup>     |
| (%)                     | (18±8)                | (22±6)              | (12±4)                 |
| HDL-TG, <i>mg/dL</i>    | 17±21 <sup>a, b</sup> | 4±3 <sup>b</sup>    | 29±24 <sup>a</sup>     |
| (%)                     | (8±9)                 | (5±3)               | (8±7)                  |

<sup>1</sup>Dados apresentados em média ± DP; médias na mesma linha com letras distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), sendo  $a > b > c$ . Análises plasmáticas,  $n=11-14$ ; FPLC,  $n=8-9$ . <sup>2</sup>A distribuição percentual de colesterol e triglicérides foi calculada pela área sob a curva dos picos das frações de lipoproteínas obtida por FPLC e, posteriormente, convertida a números absolutos. Teste estatístico: One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.



**Figura 6 - Perfil plasmático das lipoproteínas, determinado por FPLC; n=8-9.**

As concentrações plasmáticas de colesterol e TG foram positivamente correlacionadas com conteúdo arterial de ABCA1 (CT:  $r = 0,70$ ,  $p = 0,0002$ ; TG:  $r = 0,61$ ,  $p = 0,002$ ), área de macrófagos (CT:  $r = 0,69$ ,  $p = 0,0004$ ; TG:  $r = 0,63$ ,  $p = 0,001$ ) e área de lesão aterosclerótica (CT:  $r = 0,77$ ,  $p = 0,001$ ; TG:  $r = 0,86$ ,  $p = 0,0001$ ). Esses dados evidenciam o papel

preponderante dos lípides plasmáticos no desenvolvimento de lesão aterosclerótica associado ao consumo de diferentes dietas hiperlipídicas (Figura 7).

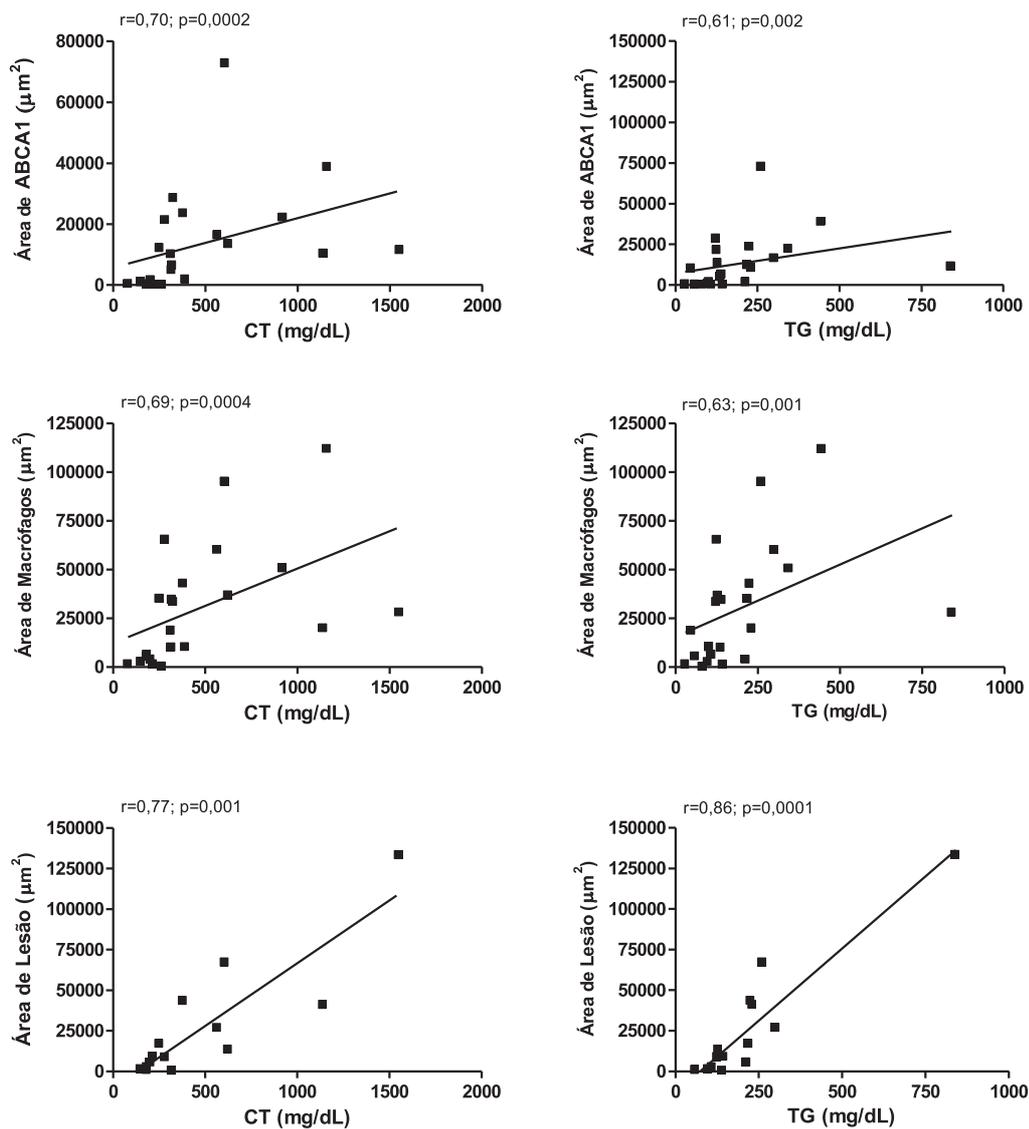
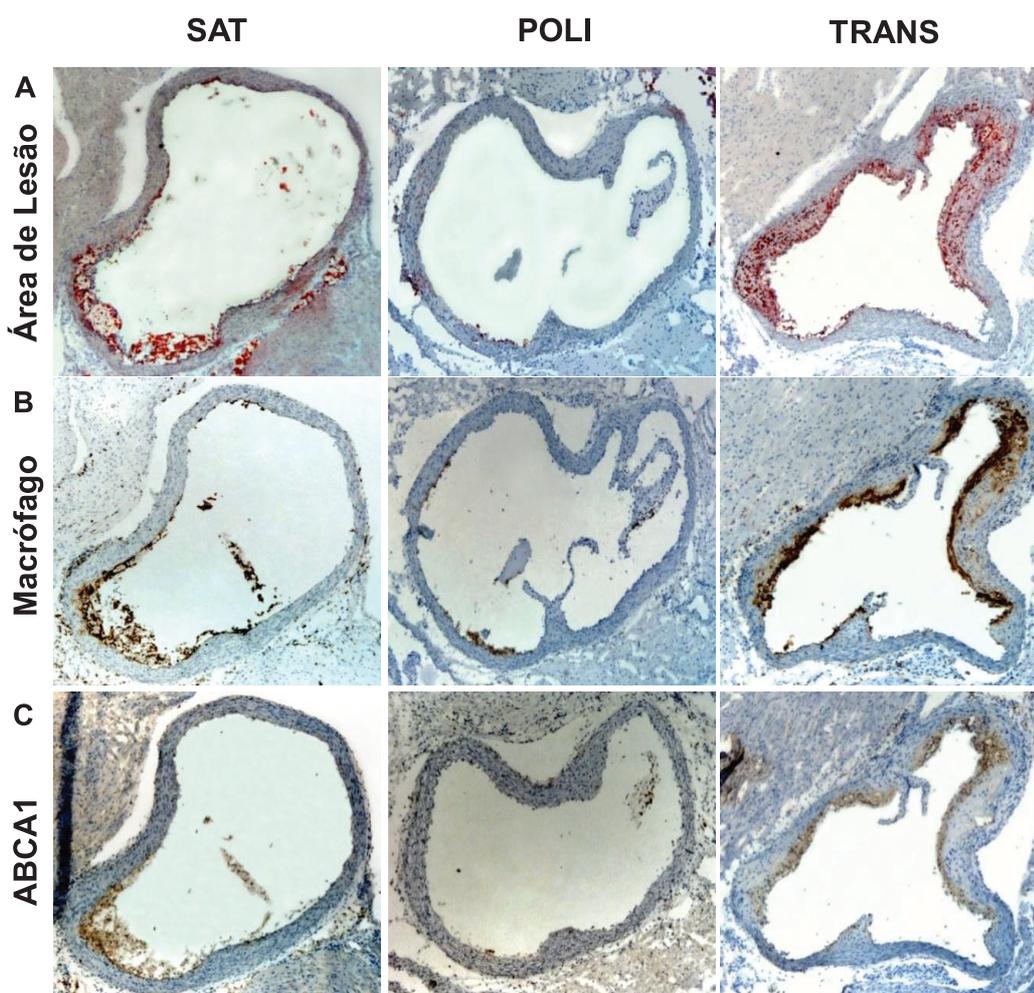


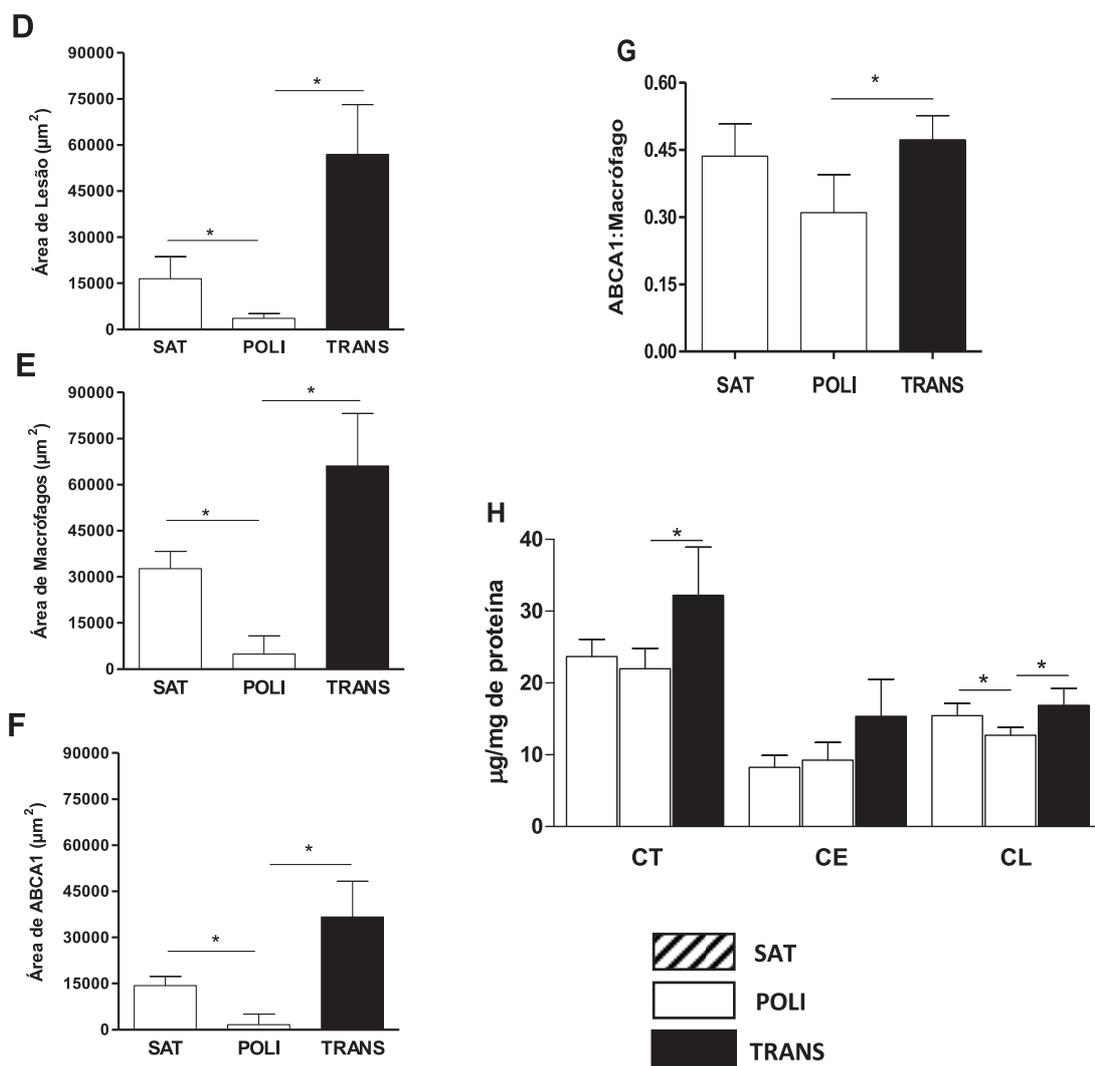
Figura 7 - Correlação entre lípides plasmáticos (CT e TG) e conteúdo de ABCA1, infiltrado de macrófagos e área de lesão aterosclerótica. Correlação de Spearman.

### Dieta hiperlipídica e desenvolvimento de aterosclerose

O consumo de dieta TRANS induziu severo aumento do conteúdo de lípidos nas artérias dos animais. Por outro lado, os animais do grupo POLI apresentaram o menor conteúdo de ABCA1, infiltrado de macrófagos e lípidos na parede arterial, quando comparado aos grupos SAT e TRANS (**Figura 8, A-F**).

A razão ABCA1:macrófago na área de lesão foi menor nos animais do grupo POLI comparado aos animais do grupo TRANS, contudo não foi diferente dos animais do grupo SAT (**Figura 8, G**).

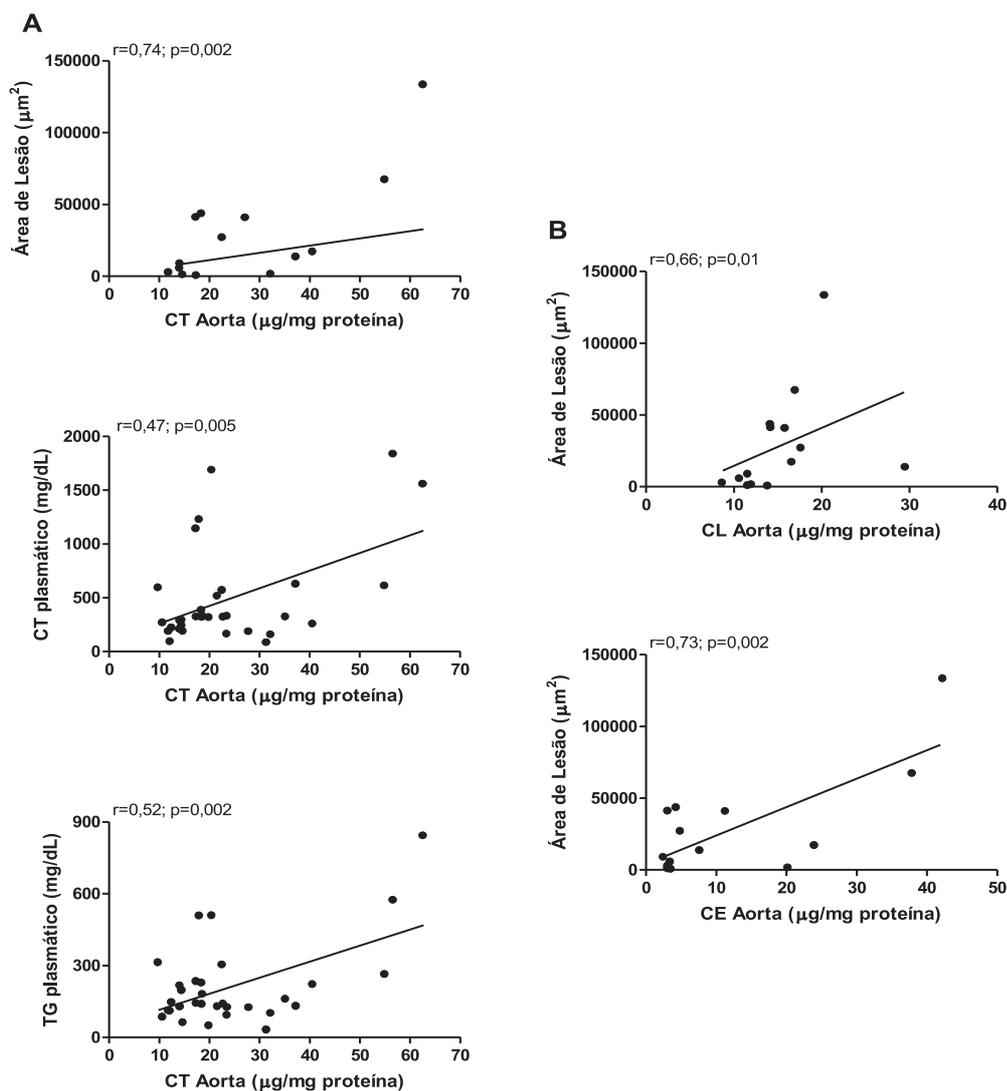




**Figura 8 - Dietas hiperlipídicas e desenvolvimento de aterosclerose.** A área de lesão foi determinada na raiz aórtica dos animais LDLr-KO alimentados por 16 semanas com uma das dietas hiperlipídicas. Cortes consecutivos foram analisados para **(A)** infiltrado lipídico, por Oil Red-O; **(B)** infiltrado de macrófagos (anti-CD68); e **(C)** conteúdo de ABCA1 por imuno-histoquímica (anti-ABCA1); anticorpo secundário conjugado a peroxidase, detecção feita com DAB (marrom). Os seguintes parâmetros foram quantificados: **(D)** área de lesão aterosclerótica (n=5); **(E)** infiltrado de macrófagos (n=7) e **(F)** conteúdo de ABCA1 (n=7); **(G)** determinação da razão entre ABCA1:macrófago na placa aterosclerótica; **(H)** conteúdo de colesterol na aorta total (n=8-13); \*p<0,05. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e, quando necessário, foi realizada transformação logarítmica antes da análise estatística. Utilizou-se One-way ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls, para comparação dos grupos. Resultados apresentados como média  $\pm$  EP.

Como outra medida do desenvolvimento de lesão aterosclerótica, o conteúdo de colesterol na aorta total dos animais foi determinado individualmente. O conteúdo de CT no grupo POLI foi menor comparado ao grupo TRANS, mas não diferiu do grupo SAT. O conteúdo de CL foi menor no grupo POLI comparado aos grupos TRANS e SAT; as concentrações de CE na parede da artéria não diferiram entre os grupos **(Figura 8, H)**.

O conteúdo de CT na aorta foi positivamente correlacionado com a área de lesão ( $r = 0,74$ ,  $p = 0,002$ ), o CT plasmático ( $r = 0,47$ ,  $p = 0,005$ ) e os TG plasmáticos ( $r = 0,52$ ,  $p = 0,002$ ). A área de lesão aterosclerótica foi positivamente correlacionada com o conteúdo de CE e CL na aorta total dos animais ( $r = 0,73$ ,  $p = 0,002$  e  $r = 0,66$ ,  $p = 0,01$ , respectivamente) **(Figura 9)**.



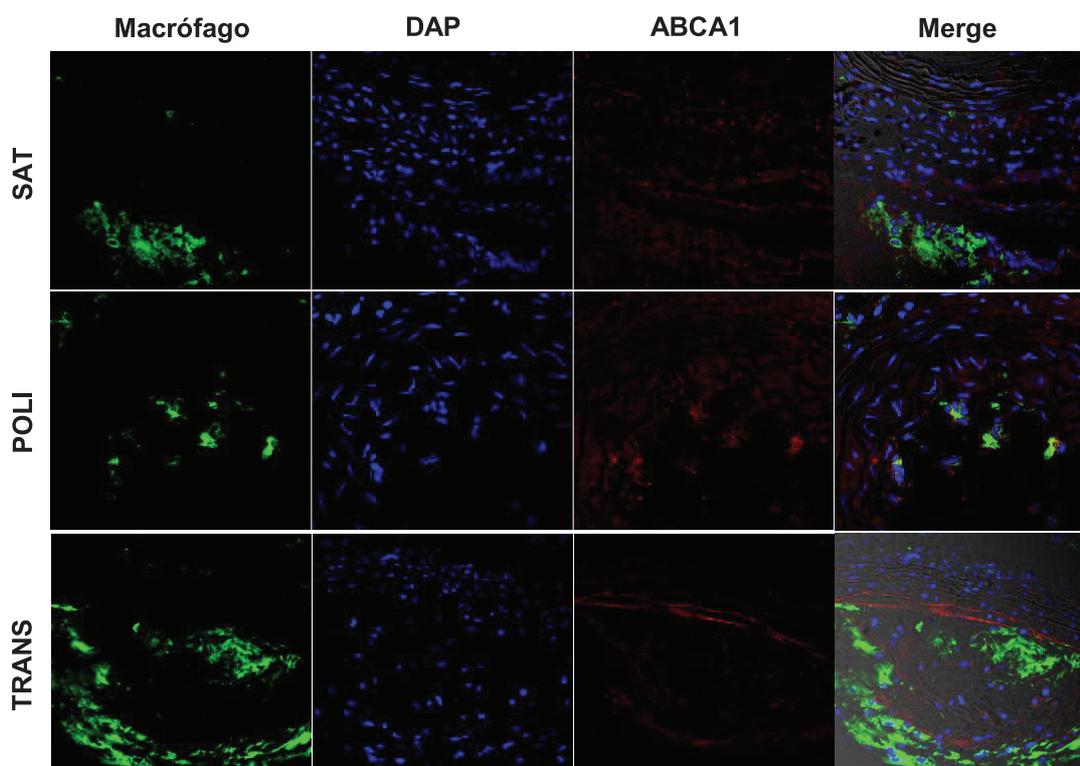
**Figura 9 - Correlação entre: (A)** CT da aorta com área de lesão, concentração plasmática de colesterol e TG; **(B)** conteúdo de CE e CL na aorta e área de lesão. Correlação de Pearson.

A expressão hepática de ABCA1 tem papel primordial na biogênese da HDL, partícula que tem relevante papel na prevenção da doença cardiovascular (Oram et al., 2006) e, conseqüentemente, na prevenção de aterosclerose (Brunham et al., 2009). Entretanto, não foi encontrada diferença na expressão de mRNA de ABCA1 no fígado dos

animais consumindo as diferentes dietas enriquecidas com ácidos graxos SAT, POLI ou TRANS.

### Localização de ABCA1 e macrófago na placa aterosclerótica

Resultados da análise por microscopia confocal não mostraram colocalização entre ABCA1 e macrófago na área de lesão (**Figura 10**). Esses dados sugerem que além de macrófagos (células positivas para CD68) outros tipos celulares devem responder pela expressão de ABCA1 na área de lesão.

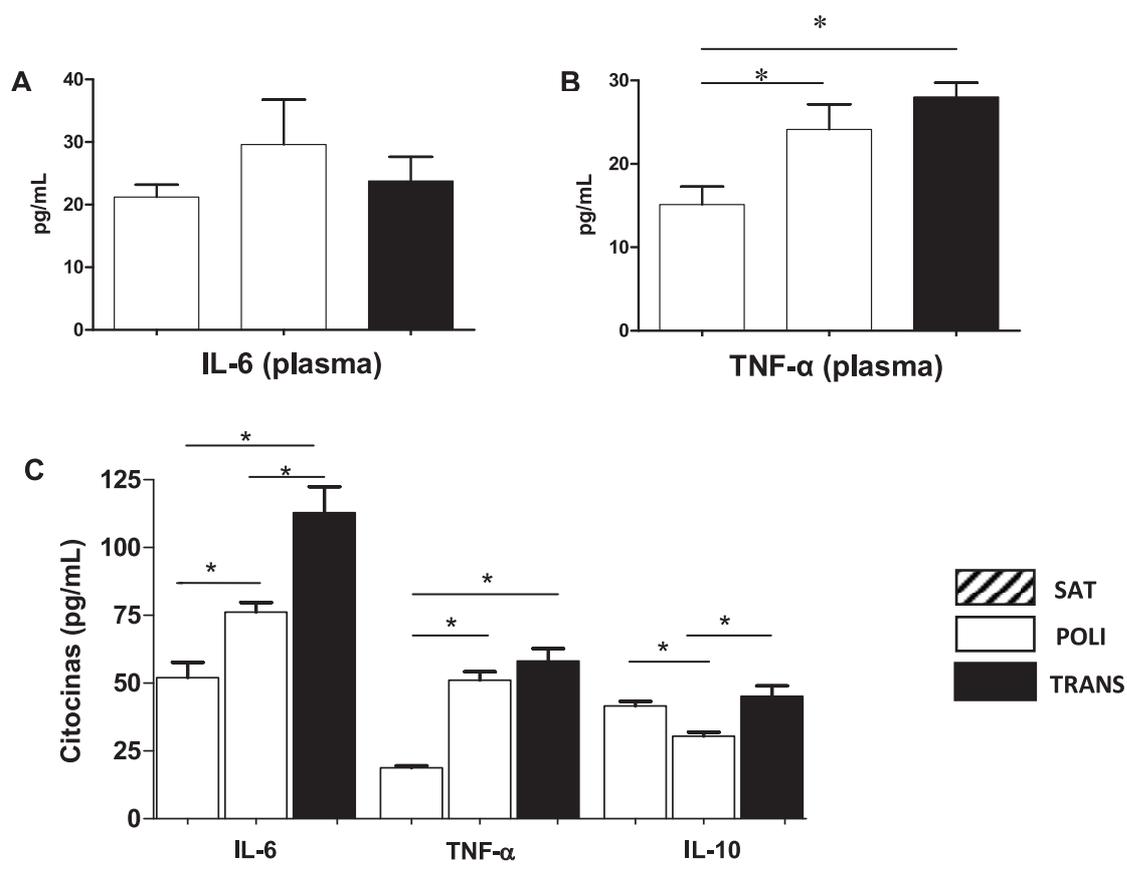


**Figura 10 - Colocalização de ABCA1 e macrófago na área de lesão aterosclerótica.** A marcação dupla por imunofluorescência foi realizada em cortes subsequentes, na área de lesão aterosclerótica na região da raiz aórtica de animais

LDLr-KO, alimentados com dietas SAT, POLI ou TRANS por 16 semanas. A análise por microscopia confocal não mostrou colocalização entre ABCA1 (vermelho) e macrófago (verde); núcleos celulares marcados com DAPI (azul) (n=3).

### **Citocinas plasmáticas e resposta inflamatória**

A concentração plasmática de IL-6 não diferiu entre os grupos (**Figura 11, A**), entretanto, a concentração de TNF- $\alpha$  foi maior nos grupos TRANS e POLI comparados ao grupo SAT (**Figura 11, B**). Com relação à resposta inflamatória de macrófagos ao estímulo com LPS, animais alimentados com dieta TRANS e POLI apresentaram maiores concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  comparadas à SAT, confirmando dados plasmáticos. Além disso, comparado a SAT e TRANS, o grupo POLI apresentou concentrações inferiores de IL-10, marcador relacionado à resposta anti-inflamatória (**Figura 11, C**). É importante ressaltar que a dieta POLI continha altas concentrações de ácidos graxos da série  $\omega$ -6, o que pode explicar a resposta proinflamatória observada neste estudo.

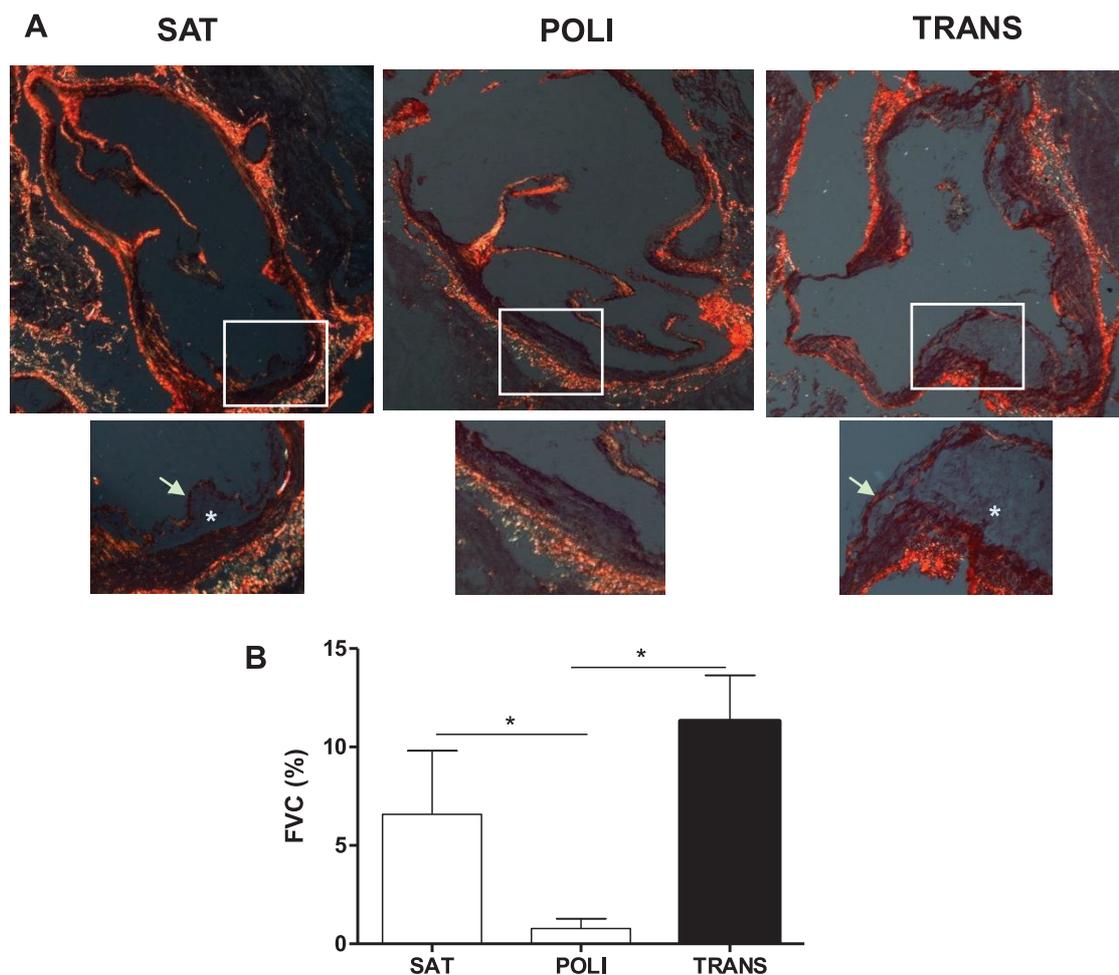


**Figura 11 - Perfil inflamatório plasmático e resposta inflamatória de macrófagos.** Citocinas plasmáticas (A) IL-6 e (B) TNF- $\alpha$ , foram determinadas por ELISA. (C) Macrófagos peritoneais de animais alimentados com uma das três dietas hiperlipídicas por 16 semanas foram isolados e cultivados em meio RPMI ( $0,5 \times 10^6$  células/poço). As células foram estimuladas com 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS de *Escherichia coli*, por 24 horas, e as citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) liberadas no meio de cultura foram determinadas por ELISA, com uso de *kits* comerciais;  $n=4$ . Teste estatístico: dados transformados (log) antes de teste estatístico; One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

### Vulnerabilidade da placa aterosclerótica

Os animais que consumiram dieta POLI apresentaram a menor área de lesão e, portanto, o conteúdo de colágeno foi praticamente indetectável neste grupo. Por outro lado, os animais alimentados com dietas

TRANS e SAT apresentaram placas ateroscleróticas com capas fibróticas contendo núcleos necróticos, características de placas ateroscleróticas instáveis (**Figura 12**).



**Figura 12 - Análise do conteúdo de colágeno na lesão aterosclerótica em animais LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas enriquecidas com SAT, POLI ou TRANS.** (A) Os cortes foram analisados por Picrosirius red (PSR) e mostram a presença de capa fibrosa (indicado com flecha) com conteúdo pobre em fibras de colágeno e núcleos necróticos. (B) Quantificação da fração do volume de colágeno (FVC%) expresso em porcentagem da área total da placa. Teste estatístico: dados transformados (log) antes de teste estatístico; One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, o consumo de dieta não diferiu entre os grupos; entretanto, a dieta TRANS induziu menor ganho de peso em comparação à dieta POLI, possivelmente em razão da redução de tecido adiposo observada no grupo TRANS. Este resultado pode estar relacionado a possíveis ações diretas dos ácidos graxos *trans* na atividade de enzimas do tecido adiposo (Ibrahim et al., 2005).

Por outro lado, a ingestão de dieta TRANS provocou aumento do peso do fígado, em razão de maior acúmulo de lípidos comparado ao consumo de dietas POLI e SAT. Como esperado, as três dietas hiperlipídicas induziram algum grau de esteatose hepática; contudo, o consumo de dieta TRANS levou ao desenvolvimento de macroesteatose com importante infiltrado inflamatório, caracterizando NASH, ao passo que as dietas ricas em SAT e POLI provocaram apenas microesteatose e processo inflamatório inicial.

O consumo de dieta TRANS aumentou a transcrição de PPAR- $\gamma$  e SREBP-1c, genes envolvidos na lipogênese hepática, bem como a concentração hepática de colesterol e TG, em comparação com o consumo de dieta SAT e POLI. Esses dados foram corroborados por recente estudo também conduzido em camundongos (Tetri et al., 2008). No entanto, no presente demonstrou-se adicionalmente que o consumo de dieta TRANS não

alterou a expressão hepática de PPAR- $\alpha$  e CPT-1, sugerindo que os três grupos apresentaram a mesma capacidade oxidativa.

A expressão de mRNA de MTP no grupo TRANS foi menor comparada ao grupo POLI, mas não diferiu em relação aos animais do grupo SAT. A MTP está envolvida na transferência de TG para partículas de apo B e seu papel na formação da VLDL já está bem elucidado na literatura (Ginsberg et al., 2009). Sabe-se também que a ausência de atividade da MTP é clinicamente demonstrada na abetalipoproteinemia (Wetterau et al., 1992). Desta forma, esses resultados sugerem que a dieta TRANS aumentou a capacidade lipogênica hepática, porém não elevou a capacidade oxidativa nem a exportação de TG por meio de maior formação de VLDL, gerando uma situação propícia ao acúmulo hepático de lípidos.

As concentrações plasmáticas de AST, ALT, IL-6 e insulina não diferiram entre os grupos, entretanto, o consumo de dieta TRANS induziu severo aumento da glicemia e TNF- $\alpha$ , sugerindo maior resistência insulínica como demonstrado pelo índice HOMA<sub>IR</sub>. Esses achados podem ter contribuído significativamente para o desenvolvimento de NASH no grupo TRANS.

A redução da oxidação lipídica hepática pode contribuir para o acúmulo de lípidos neste órgão. Já se demonstrou que a oxidação dos ácidos graxos saturados diminui com o aumento do comprimento da cadeia carbônica, sendo o ácido láurico o mais oxidado, seguido do palmítico e do esteárico (DeLany et al., 2000). Com relação aos ácidos graxos insaturados, a oxidação parece diferir com relação ao número de insaturações, sendo mais

oxidado o ácido linolênico seguido do linoleico e do oleico. No entanto, parece não haver diferença significativa com relação à capacidade oxidativa entre os ácidos palmítico (16:0), linoleico (18:2) e *trans* (*trans* 18:1) (DeLany et al., 2000), presentes nas dietas SAT, POLI e TRANS, respectivamente.

Outro estudo mostrou aumento do gasto energético com o consumo de ácido graxo oleico, comparado aos ácidos linoleico e linolênico (Jones et al., 2008). Já os ácidos graxos saturados reduziram o gasto energético diário (Kien C et al., 2005). Todavia, neste último estudo, o gasto energético foi inferido por meio de cálculos e não por calorimetria indireta podendo assim limitar as conclusões dessa investigação.

Cassagno et al. (2005) demonstraram que o consumo de ácidos graxos *trans* pode induzir estresse oxidativo. Por outro lado, estudo realizado em animais alimentados com dieta hiperlipídica enriquecida com ácido graxo poli-insaturado da série  $\omega$ -3 mostrou que, embora o consumo desse ácido graxo tenha promovido o desenvolvimento de esteatose hepática moderada, impediu o desenvolvimento de disfunção mitocondrial (Oliveira et al., 2006). Esses achados colocam os ácidos graxos *trans* como possíveis agentes causais do desenvolvimento de estresse oxidativo, seja pela indução de disfunção mitocondrial ou de estresse do retículo endoplasmático.

O consumo de ácido linoleico conjugado (CLA) induz hepatomegalia e depleção do tecido adiposo corporal (Clément et al., 2002; Ferramosca et al., 2006) de forma semelhante à encontrada no presente estudo. Entretanto, a gordura *trans* utilizada nesse estudo se mostrou isenta de CLA em análise de cromatografia gás-líquido (GLC- Cognis do Brasil Ltda).

Desta forma, os efeitos encontrados pelo consumo de dieta TRANS podem ser atribuídos exclusivamente ao ácido elaídico (*trans* 18:1) em função de sua participação preponderante na composição da gordura.

Ainda não está esclarecido o mecanismo pelo qual a gordura *trans* induziu o desenvolvimento de NASH e a diminuição do tecido adiposo; contudo, algumas possibilidades podem ser levantadas: 1) retardo na remoção de quilomícrons e VLDL-TG pelos tecidos periféricos, por redução da atividade e/ou expressão da enzima lipoproteína lipase, diminuindo o conteúdo de tecido adiposo e aumentando o influxo hepático de lípidos; 2) ativação de lipases no tecido adiposo (lipase hormônio-sensível - HSL e lipase de triglicérides de adipócitos - ATGL), disponibilizando maior quantidade de ácidos graxos livres no plasma e aumentando a captação hepática de lípidos, assim como nos demais tecidos, contribuindo para o quadro de resistência insulínica visto neste grupo; 3) qualquer combinação desses defeitos metabólicos.

Com relação aos efeitos das dietas no desenvolvimento de aterosclerose, demonstramos pela primeira vez que a ingestão de dieta hiperlipídica, enriquecida com ácidos graxos poli-insaturados da série  $\omega$ -6, preveniu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, mesmo em condições proinflamatórias. No entanto, mesmo apresentando efeito similar sobre o perfil inflamatório, o consumo de dieta TRANS induziu severo desenvolvimento de aterosclerose, com área de lesão significativamente maior comparada aos animais do grupo POLI e cerca de três vezes comparada aos animais do grupo SAT. Os animais do grupo POLI apresentaram pequenas infiltrações

lipídicas na artéria e, por vezes, nenhuma marcação. Isso mostra que apesar de o consumo de gordura ter sido igual entre os animais, o tipo de ácido graxo preponderante na dieta POLI preveniu o desenvolvimento de lesão. Esses resultados reforçam a preponderância da concentração plasmática de lípidos sobre o desenvolvimento de aterosclerose, denominada por Steinberg como “hipótese lipídica” (Steinberg, 2006).

O grupo POLI apresentou maior concentração plasmática de TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo SAT, porém não diferiu do grupo TRANS. Em concordância com os dados plasmáticos, macrófagos peritoneais de animais dos grupos POLI e TRANS tratados com LPS induziram maior secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) no meio de cultura em comparação com os animais do grupo SAT. O marcador anti-inflamatório, IL-10, foi menor no grupo de POLI em comparação aos grupos TRANS e SAT. Assim, mesmo com uma resposta inflamatória semelhante à do grupo TRANS, o grupo POLI apresentou menor desenvolvimento de aterosclerose, menor conteúdo de ABCA1 e infiltrado de macrófagos na área de lesão em comparação aos grupos TRANS e SAT.

No que diz respeito à inflamação, os ácidos graxos poli-insaturados da série  $\omega$ -6 são conhecidos por sua capacidade pró-inflamatória (Wang et al., 2009). O ácido araquidônico é substrato para a síntese de eicosanoides envolvidos no controle da intensidade e da duração das respostas inflamatórias (Calder et al., 2011). Sabe-se que a composição dos lípidos da membrana celular reflete os ácidos graxos da dieta e que essa composição promove diferenças na fluidez de membrana, o que pode

interferir na atividade de proteínas e também na sinalização celular. Desta forma, a incorporação desses ácidos graxos na membrana de células inflamatórias pode modular sua resposta (Calder et al., 2011), o que pode ter influenciado a resposta inflamatória vista no grupo POLI, uma vez que a dieta deste grupo continha elevada concentração de  $\omega$ -6.

Outro efeito dos ácidos graxos, bastante estabelecido na literatura, está relacionado aos receptores *Toll-like* (TLR). O TLR 4, por exemplo, faz o reconhecimento de LPS presentes em bactérias Gram-negativas, mas pode também reconhecer moléculas que não são derivadas de bactérias, como proteína de choque térmico 60 (HSP-60), fibronectina, fibrinogênio e certos tipos de ácidos graxos. Já foi demonstrado que os ácidos graxos saturados são capazes de induzir a secreção de marcadores inflamatórios de forma análoga ao LPS, ao passo que os poli-insaturados inibem esse efeito (Lee et al., 2001).

No presente estudo, o consumo de dieta SAT induziu menor resposta inflamatória em comparação aos grupos POLI e TRANS, fato que diverge da literatura (Lee et al., 2001). Entretanto, sabe-se que a exposição crônica ao LPS pode levar ao desenvolvimento de tolerância (Dobrovolskaia e Vogel. 2002), assim, a exposição prolongada aos ácidos graxos saturados presentes na dieta SAT pode ter, de forma análoga a observada com o pré-tratamento com LPS, induzido mecanismo de tolerância.

Apesar do efeito proinflamatório, o grupo POLI apresentou menores concentrações plasmáticas de colesterol e TG em comparação aos grupos TRANS e SAT. Além disso, no grupo POLI 25% do

colesterol plasmático total apresentou-se distribuído em HDL, em comparação com 19% no grupo SAT e 6% no grupo TRANS (**Tabela 1**). Isso sugere que no grupo POLI, as HDL transportam o colesterol para o fígado com maior eficiência, de modo que este possa ser excretado pela bile. Desta forma, a melhora no perfil lipídico decorrente do consumo de dieta POLI suplantou o efeito prejudicial que a inflamação possa ter causado.

A dieta TRANS induziu severa hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, provavelmente como resultado de maior síntese hepática de lípidos também vista neste grupo. Corroborando dados da literatura (Mensink et al., 2003; Bassett et al., 2009), a dieta TRANS induziu perfil lipídico proaterogênico, com partículas de apo B contendo altas concentrações de colesterol. Além disso, o consumo de dieta TRANS aumentou a concentração de TG em HDL. Estas, quando enriquecidas com TG, tornam-se melhores substratos para lipase hepática, enzima responsável pelo catabolismo da HDL (Vergès et al., 2009). O aumento da atividade da LH pode estar envolvido com redução das concentrações plasmáticas de HDL e contribuir para o perfil lipídico proaterogênico associado ao consumo de ácidos graxos *trans*.

Devido ao processo de hidrogenação, a gordura utilizada para elaboração da dieta TRANS apresentou altas concentrações de ácido esteárico. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo podem ser atribuídos ao conteúdo de ácido graxo *trans*, uma vez que no fígado o ácido esteárico é rapidamente convertido a ácido oléico pela ação da SCD1 (Bonanome et al., 1988).

Já está demonstrado que o conteúdo hepático de ABCA1 exerce grande impacto sobre o desenvolvimento de aterosclerose devido a seu papel na formação de HDL. Portanto, a redução hepática de ABCA1 pode contribuir para a progressão da lesão, por reduzir as concentrações plasmáticas de HDL. Os ácidos graxos insaturados reduzem o conteúdo de ABCA1 por aumentar sua taxa de degradação, ação que tem sido descrita por alguns autores como indesejável (Wang et al., 2002; Wang et al., 2007; Hu et al., 2009). Entretanto, apesar da função biológica dessa regulação ainda não ter sido elucidada, vários estudos clínicos e epidemiológicos têm destacado os benefícios do consumo de ácidos graxos insaturados (Lavie et al., 2009; Harris et al., 2008), especialmente sobre o desfecho cardiovascular. No presente estudo, os diferentes tipos de ácidos graxos utilizados não interferiram na expressão de mRNA de ABCA1 hepático.

Um estudo recente demonstrou que os ácidos graxos eláidico e palmítico reduziram de maneira similar o efluxo de colesterol de macrófagos mediado por ABCA1. Além disso, evidenciou-se que este efeito não se deu por alteração da estabilidade, transcrição, ou tradução da proteína, uma vez que não foram alterados a expressão do mRNA de ABCA1 nem o conteúdo de proteína na membrana celular. Assim, os autores sugerem alteração na funcionalidade do transportador em decorrência da alteração da fluidez de membrana promovida pela incorporação de ácidos graxos saturados e *trans* (Fournier et al., 2012). Estes resultados ajudam a explicar a razão pela qual nos grupos TRANS e SAT, o maior conteúdo de

ABCA1 na área de lesão aterosclerótica não foi suficiente para conter a progressão da lesão.

Foi demonstrado também, por microscopia confocal, que ABCA1 e macrófagos não co-localizam na área de lesão aterosclerótica. Estes resultados indicam que, além de macrófagos, outros tipos celulares podem ter respondido pelo conteúdo de ABCA1 na placa. Estes achados não corroboram resultados encontrados em humanos, nos quais foi mostrado que na placa aterosclerótica o transportador ABCA1 é expresso especialmente por macrófagos (Lawn et al, 2001). Entretanto, nesta investigação, foram realizadas análises por hibridização *in situ* (ABCA1 mRNA) e imunohistoquímica (CD68) e não por microscopia confocal (como realizado no presente estudo), que permite determinação espacial da localização das proteínas estudadas.

Embora não avaliado nesta investigação, outro tipo celular possivelmente envolvido na expressão de ABCA1 na área de lesão poderia ser a célula muscular lisa (CML). O envolvimento da CML na progressão da lesão aterosclerótica já está bem documentado. As CML migram para camada íntima dos vasos em resposta a citocinas e mediadores inflamatórios (Rudijanto et al., 2007). Estas células quando presentes na íntima dos vasos adquirem características proliferativas e maior capacidade de sintetizar matriz extracelular, proteases e citocinas. Além disso, CML são capazes de expressar receptores para lipoproteínas, captar lípidos e promover a formação de células espumosas de forma similar aos macrófagos promovendo progressão da lesão (Rong et al., 2003; Doran et al., 2008). O

fenótipo da CML presente na íntima apresenta menor expressão de ABCA1, menor capacidade de ligação a apo A-I, menor formação de HDL e também redução no efluxo de colesterol mediado por apo A-I (Choi et al., 2009).

No presente estudo, o conteúdo de colágeno na raiz aórtica dos camundongos alimentados com POLI foi quase imperceptível. Os animais dos grupos TRANS e SAT desenvolveram placas de ateroma com uma capa fibrosa fina envolvendo núcleo necrótico caracterizando placas instáveis e propensas a ruptura (Falk et al., 1995).

Estudos têm demonstrado que o conteúdo de ABCA1 em macrófagos pode não estar relacionado diretamente a contenção da área de lesão, uma vez que em placas mais avançadas pode haver comprometimento da sua função (Fournier et al., 2012) ou mesmo diminuição na expressão desta proteína (Lawn et al.). Os nossos resultados corroboram estas descobertas, e acrescentam ainda que os ácidos graxos poli-insaturados diminuíram a relação ABCA1:macrófago na lesão aterosclerótica sem prejuízo no desfecho cardiovascular. Além disso, no grupo POLI este efeito foi associado a perfil proinflamatório e menores concentrações plasmáticas de colesterol e TG que culminaram na prevenção da aterosclerose.

No entanto, apesar de estado proinflamatório semelhante a dieta POLI, o consumo de ácidos graxos *trans* induziu severa hiperlipidemia, que acarretou grande impacto no desenvolvimento de aterosclerose.

Com base em dados da literatura, algumas hipóteses, podem ser levantadas para explicar os resultados encontrados:

1) No grupo TRANS, o ABCA1 da parede arterial sofreu perda de função e com isso reduziu a eficiência do efluxo de colesterol celular e impedindo a reversão da lesão (Fournier et al., 2012); 2) o ambiente da placa pode ser crucial na modulação dos fatores que levam a degradação da proteína (Feng et al., 2002). Sabe-se que, o estresse de cisalhamento (*shear stress*) bem com o ambiente de placa pode interferir na expressão, conteúdo e/ou funcionalidade do ABCA1, comprometendo o efluxo de colesterol e propiciando o avanço da lesão (Zhu M et al., 2008); 3) a presença de CML na íntima do vaso, pode contribuir para a evolução da lesão aterosclerótica, e que, estas células, quando presentes na íntima, expressam ABCA1 com baixa atividade, induzindo ao acúmulo de lípidos (Choi et al., 2009); 4) placas em estágio avançado, com presença de núcleos necróticos, fibrose e mineralização, podem apresentar menor conteúdo de ABCA1 em razão de processos de morte celular (Lawn et al., 2001);

Os resultados podem, ainda, ser explicados pela “hipótese lipídica”, uma vez que o consumo de dieta TRANS elevou de forma severa o colesterol plasmático, condição preponderante no desenvolvimento de aterosclerose que pode ter tido participação crucial no desenvolvimento da lesão neste grupo (Steinberg, 2006). Desta forma, a expressão de ABCA1 em macrófagos na área de lesão talvez exerça papel secundário na progressão da aterosclerose (Brunham et al., 2009). Além disso, o conteúdo de macrófagos, ABCA1 e área de lesão, mostraram correlação positiva com a

colesterolemia em todos os grupos, sugerindo que esta possui ação preponderante.

O acúmulo de gordura no tecido adiposo subcutâneo confere proteção aos outros tecidos, impedindo que o excesso de gordura se acumule em outros órgãos trazendo danos metabólicos. Os adipócitos subcutâneos são as únicas células capazes de armazenar TG em seu citoplasma sem comprometer sua integridade funcional (Fonseca-Alaniz et al., 2006). Assim, a redução do tecido adiposo subcutâneo, observada neste estudo nos animais que consumiram dieta TRANS, pode ser interpretada como diminuição da capacidade de armazenamento de lípidos, que contribuiu com severo acúmulo de gordura no fígado, aumento dos lípidos plasmáticos, resistência insulínica e certamente com a progressão da lesão aterosclerótica.

Mostramos ainda que a ingestão de dieta TRANS induziu perfil lipídico proaterogênico, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, além de hepatomegalia, NASH e resistência à insulina, componentes reconhecidos da SM.

Em conclusão, com relação aos efeitos dos ácidos graxos no desenvolvimento de aterosclerose, este estudo reforça o impacto da hipercolesterolemia, onde o colesterol plasmático desempenha papel crucial no desenvolvimento da aterosclerose, mesmo na presença de um perfil inflamatório, como observado no grupo de POLI.

## REFERÊNCIAS

Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis*. 1988;8:207-11.

Adams LA, Sanderson S, Lindor K, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol*. 2005;42:132-138.

Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, Kokura S, Yoshikawa T. A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;42:150-7.

Albrecht C, Soumian S, Amey JS, Sardini A, Higgins CF, Davies AH, Gibbs RG. ABCA1 expression in carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*. 2004;35:2801-2806.

Alegría-Ezquerria E, Castellano Vázquez JM, Alegría Barrero A. Obesity, metabolic syndrome and diabetes: cardiovascular implications and therapy. *Rev Esp Cardiol*. 2008;6:752-764.

Ascherio A. Epidemiologic studies on dietary fats and coronary heart disease. *Am J Med*. 2002;113:9S-12S.

Barter P. The inflammation: lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl*. 2005;6:15-20.

Bassett CM, McCullough RS, Edel AL, Maddaford TG, Dibrov E, Blackwood DP, Austria JA, Pierce GN. Trans-fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. *Metabolism*. 2009;58:1802-8.

Bennett AJ, Billett MA, Salter AM, Mangiapane EH, Bruce JS, Anderton KL, Marenah CB, Lawson N, White DA. Modulation of hepatic apolipoprotein B, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and low-density lipoprotein receptor mRNA and plasma lipoprotein concentrations by defined dietary fats. Comparison of trimyristin, tripalmitin, tristearin and triolein. *Biochem J*. 1995; 311:167-73.

Blanco-Molina A, Castro G, Martín-Escalante D, Bravo D, López-Miranda J, Castro P, López-Segura F, Fruchart JC, Ordovás JM, Pérez-Jiménez F. Effects of different dietary cholesterol concentrations on lipoprotein plasma

concentrations and on cholesterol efflux from Fu5AH cells. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1028-33.

Block JM, Barrera-Arellano D. Hydrogenated products in Brazil: trans isomers, physico-chemical characteristics and fatty acid composition. *Arch Latinoam Nutr.* 1994;44:281-5.

Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med* 1988;318:1244-1248.

Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA. The Influence of Different Fats and Fatty Acids on Obesity, Insulin Resistance and Inflammation. *J. Nutr.*2002;132:2488–2491.

Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter. *Am J Cardiol.* 2003;92:10K-16K.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89:331-40.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.*2004;114:147-152.

Brunham LR, Singaraja RR, Duong M, Timmins JM, Fievet C, Bissada N, Kang MH, Samra A, Fruchart JC, McManus B, Staels B, Parks JS, Hayden MR. Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:548-54.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 2006;36:485-501.

Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.*2002;123:134–140.

Buonacorso V, Nakandakare ER, Nunes VS, Passarelli M, Quintão EC, Lottenberg AM. Macrophage cholesterol efflux elicited by human total plasma and by HDL subfractions is not affected by different types of dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1270-1277.

Calder PC. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol.* 2011;668:S50-58.

Callow J, Summers LK, Bradshaw H, Frayn KN. Changes in LDL particle composition after the consumption of meals containing different amounts and types of fat. *Am J Clin Nutr.*2002;76:345-350.

Calzada C, Colas R, Guillot N, Guichardant M, Laville M, Véricel E, Lagarde M. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis.* 2010;208:467-472.

Carr TP, Andresen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem.* 1993;26:39-42.

Cassagno N, Palos-Pinto A, Costet P, Breilh D, Darmon M, Berard AM. Low amounts of trans 18:1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defence to oxidative stress in mice. *Br J Nutr.* 2005;94:346-352.

Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem.* 2007;18:184-195.

Chan DC, Watts GF, Mori TA, Barrett PH, Redgrave TG, Beilin LJ. Randomized controlled trial of the effect of n-3 fatty acid supplementation on the metabolism of apolipoprotein B-100 and chylomicron remnants in men with visceral obesity. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:300-307.

Choi HY, Rahmani M, Wong BW, Allahverdian S, McManus BM, Pickering JG, Chan T, Francis GA. ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation.* 2009;119:3223-3231.

Clément L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res.* 2002;43:1400-1409.

Connelly MA, de la Llera-Moya M, Monzo P, Yancey PG, Drazul D, Stoudt G, Fournier N, Klein SM, Rothblat GH, Williams DL. Analysis of chimeric receptors shows that multiple distinct functional activities of scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), are localized to the extracellular receptor domain. *Biochemistry.* 2001;40:5249-59.

Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:28240-28245.

Dangardt F, Osika W, Chen Y, Nilsson U, Gan LM, Gronowitz E, Strandvik B, Friberg P. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis*. 2010;212:580-5.

Daumerie CM, Woollett LA, Dietschy JM. Fatty acid regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992;89:10797-10801.

De Caterina R, Scarano M, Marfisi R, Lucisano G, Palma F, Tataschiere A, Marchioli R. Cholesterol-lowering interventions and stroke: insights from a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:198-211.

de Lima-Salgado TM, Alba-Loureiro TC, do Nascimento CS, Nunes MT, Curi R. Molecular mechanisms by which saturated fatty acids modulate TNF- $\alpha$  expression in mouse macrophage lineage. *Cell Biochem Biophys*. 2011;59:89-97.

De Lorgeril M, Salen P. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. *Public Health Nutr*. 2006; 9:118-123.

DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:905-911.

Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002 Jul;4(9):903-14

Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:812-819.

Due A, Larsen TM, Hermansen K, Stender S, Holst JJ, Toubro S, et al. Astrup A. Comparison of the effects on insulin resistance and glucose tolerance of 6-mo high-monounsaturated-fat, low-fat, and control diets. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:855-862.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;21:473-480.

Duvnjak M, Lerotić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4539-4550.

Earl W, Weber PC, Weber C. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. *Atherosclerosis*. 1998;136:297-303.

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134:424-431.

Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657-671.

Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J Biol Chem*. 2002;277:43271-43280.

Ferramosca A, Savy V, Conte L, Colombo S, Einerhand AW, Zara V. Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. *J Lipid Res*. 2006;47:1994-2003.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50:216-229.

Fournier N, Attia N, Rousseau-Ralliard D, Védie B, Destailats F, Grynberg A, Paul JL. Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821:303-312.

Fox JC, McGill HC Jr, Carey KD, Getz GS. In vivo regulation of hepatic LDL receptor mRNA in the baboon. Differential effects of saturated and unsaturated fat. *J Biol Chem*. 1987;262:7014-7020.

Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest*. 1995;96:78-87.

Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briancon S, Blacher J, Hercberg S; SU.FOL.OM3 Collaborative Group. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. *BMJ*. 2010;341:c6273.

Gale SE, Westover EJ, Dudley N, Krishnan K, Merlin S, Scherrer DE, Han X, Zhai X, Brockman HL, Brown RE, Covey DF, Schaffer JE, Schlesinger P, Ory DS. Side chain oxygenated cholesterol regulates cellular cholesterol homeostasis through direct sterol-membrane interactions. *J Biol Chem*. 2009;284:1755-1764.

Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab*. 2009;55:123-139.

George J, Mulkins M, Casey S, Schatzman R, Sigal E, Harats D. The effects of N-6 polyunsaturated fatty acid supplementation on the lipid composition and atherogenesis in mouse models of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2000;150:285-293.

Gillotte KL, Lund-Katz S, de la Llera-Moya M, Parks JS, Rudel LL, Rothblat GH, Phillips MC. Dietary modification of high density lipoprotein phospholipid and influence on cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 1998;39:2065-75

Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res*. 2009;50:S16216-6.

Giudetti AM, Sabetta S, di Summa R, Leo M, Damiano F, Siculella L, Gnoni GV. Differential effects of coconut oil- and fish oil-enriched diets on tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J Lipid Res*. 2003;44:2135-2141.

Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet and metabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19:63-8.

Glatz JF, Turner PR, Kataaan MB, Stalenhoef AF, Lewis B. Hypo and hyperresponse of serum cholesterol level and low density lipoprotein production and degradation to dietary cholesterol in men. *Ann N Y Sci*. 1993; 15:163-179.

Glickman RM, Green PH, Lees RS, Tall A. Apoprotein A-I synthesis in normal intestinal mucosa and in Tangier disease. *N Engl J Med*. 1978;299:1424-1427.

Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:915-30.

Goodnight SH Jr, Harris WS, Connor WE, Illingworth DR. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis*. 1982;2:87-113.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al.; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735-2752.

Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res*. 1990;31:1149-1172.

Gylling H, Kontula K, Koivisto UM, Miettinen HE, Miettinen TA. Polymorphisms of the genes encoding apoproteins A-I, B, C-III, and E and LDL receptor, and cholesterol and LDL metabolism during increased cholesterol intake. Common alleles of the apoprotein E gene show the greatest regulatory impact. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:38-44

Haag M, Dippenaar NG. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med Sci Monit.* 2005;11:RA359-367.

Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2002;43:445-52.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-95.

Hara H, Yokoyama S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem.* 1991;266:3080-6.

Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol.* 2006;17:387-93.

Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis.* 2008;197:12-24.

Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton P, Rudel LL, Appel LJ, Engler MM, Engler MB, Sacks F. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2009 ;119:902-7

Haukeland JW, Konopski Z, Linnestad P, Azimy S, Marit Loberg E, Haaland T, et al. Abnormal glucose tolerance is a predictor of steatohepatitis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40:1469 –1477

Ho KY, Brown MS, Goldstein JL. Hydrolysis and excretion of cytoplasmatic cholesteryl ester by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J Lipid Res.* 1980; 21:391-398.

Hodson L, Skeaff CM, Chisholm WA. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr.* 2001;55:908-15.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-31.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1997; 337:1491-1499.

Hu YW, Ma X, Li XX, Liu XH, Xiao J, Mo ZC, Xiang J, Liao DF, Tang CK. Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis*. 2009;204:e35-43.

Ibrahim A, Natrajan S, Ghafoorunissa R. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism*. 2005;54:240-6.

Iqbal R, Anand S, Ounpuu S, Islam S, Zhang X, Rangarajan S, Chifamba J, Al-Hinai A, Keltai M, Yusuf S; INTERHEART Study Investigators. Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries:results of the INTERHEART study. *Circulation*. 2008;118:1929-1937.

Jackson KG, Maitin V, Leake DS, Yaqoob P, Williams CM. Saturated fat-induced changes in Sf 60-400 particle composition reduces uptake of LDL by HepG2 cells. *J Lipid Res*. 2006;47:393-403.

Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH, Phillips MC. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1085:273-298.

Jones PJ, Jew S, AbuMweis S. The effect of dietary oleic, linoleic, and linolenic acids on fat oxidation and energy expenditure in healthy men. *Metabolism*. 2008;57:1198-1203.

Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusis AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7604-9.

Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J Nutr*. 2005;135:2503-2506.

Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19:242-247.

Katan MB, Beynen AC, de Vries JH, Nobels A. Existence of consistent hypo and hyperresponders to dietary cholesterol in man. *Am J Epidemiol*. 1986;123:221-234.

Khosla P, Hajri T, Pronczuk A, Hayes KC. Replacing dietary palmitic acid with elaidic acid (t-C18:1 delta9) depresses HDL and increases CETP activity in cebus monkeys. *J Nutr.* 1997;127:531S-536S.

Kien CL, Bunn JY, Ugrasbul F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:320-326.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta ML, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histologic scoring system for NAFLD. *Hepatology.* 2005;41:1313-1321.

Klucken J, Büchler C, Orsó E, Kaminski WE, Porsch-Ozcürümez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:817-22.

Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med.* 1999;341:498-511.

Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM; Alpha Omega Trial Group. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2010;363:2015-26.

Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1215:209-36.

Lammert F, Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology.* 2005;129:718-34.

Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:585-594.

Lawn RM, Wade DP, Couse TL, Wilcox JN. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:378-385.

Lee JY, Timmins JM, Mulya A, Smith TL, Zhu Y, Rubin EM, Chisholm JW, Colvin PL, Parks JS. HDLs in apoA-I transgenic *Abca1* knockout mice are remodeled normally in plasma but are hypercatabolized by the kidney. *J Lipid Res.* 2005;46:2233-45.

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276:16683-16689.

Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005;96:1221-1232.

Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Schaefer EJ. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *N Engl J Med*. 1999;340:1933-1940.

Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 $\beta$  coactivation of SREBP. *Cell*. 2005;120:261-73.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 <sup>$\Delta\Delta$</sup> CT method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, Neves M, Bernik M, Santos JE, Quintao EC. Food phytosterol ester efficiency on the plasma lipid reduction in moderate hypercholesterolemic subjects. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79:139-142.

Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, DeLany JP, Bray GA, Lefevre M, Denkins YM, Rood JC. Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and women with a range of glucose tolerance. *Metabolism*. 2001;50:86-92.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.

Ma J, Folsom AR, Lewis L, Eckfeldt JH. Relation of plasma phospholipid and cholesterol ester fatty acid composition to carotid artery intima-media thickness: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:551-9.

Manco M, Calvani M, Mingroni G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2004;6:402-413.

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37:917-923.

Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Wang N, Chen W, Tall AR. Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J Biol Chem*. 2003;278:37368-37374.

Matthan NR, Ausman LM, Lichtenstein AH, Jones PJ. Hydrogenated fat consumption affects cholesterol synthesis in moderately hypercholesterolemic women. *J Lipid Res*. 2000;41:834-839.

Matthan NR, Welty FK, Barrett PH, Harausz C, Dolnikowski GG, Parks JS, Eckel RH, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Dietary hydrogenated fat increases

high-density lipoprotein apoA-I catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1092-1097.

Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res.* 1985;26:194-202

Mauger JF, Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Jauhiainen M, Ehnholm C, Lamarche B. Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:370-375.

Mazière C, Dantin F, Conte MA, Degonville J, Ali D, Dubois F, Mazière JC. Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density-lipoprotein peroxidation. *Biochem J.* 1998;336:57-62.

McGill HC Jr, McMahan CA, Kruski AW, Mott GE. Relationship of lipoprotein cholesterol concentrations to experimental atherosclerosis in baboons. *Arteriosclerosis.* 1981;1:3-12.

McLennan PL. Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models. *Lipids.* 2001;36 Suppl:S111-4.

Menotti A, Keys A, Aravanis C, Blackburn H, Dontas A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kromhout D, Nedeljkovic S, Nissinen A, et al. Seven Countries Study. First 20-year mortality data in 12 cohorts of six countries. *Annals of Medicine.* 1989;21:175-179

Menotti A, Kromhout D, Blackburn H, Fidanza F, Buzina R, Nissinen A. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: Cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. *Eur J Epidemiol.* 1999;15:507-515

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1146-1155.

Merkel M, Velez-Carrasco W, Hudgins LC, Breslow JL. Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13294-9

Miettinen TA, Vahananen H. Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis.* 1994;105:217-226

Montoya MT, Porres A, Serrano S, Fruchart JC, et al. Fatty acid saturation of the diet and the plasma lipid concentrations, lipoprotein particle concentrations, and cholesterol efflux capacity. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:484-91.

Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1601-1613.

Mozaffarian D, Micha R, Wallace S. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med.* 2010 23;7:e1000252.

Mozaffarian D, Rimm EB, King IB, Lawler RL, McDonald GB, Levy WC . *Trans* fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1521-1525.

Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:2047-67.

Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ. Liver-X-receptor-mediated increase in ATP-binding cassette transporter A1 expression is attenuated by fatty acids in CaCo-2 cells: effect on cholesterol efflux to high-density lipoprotein. *Biochem J.* 2004;377:545-552.

Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003;37:909-916

Mustad VA, Ellsworth JL, Cooper AD, Kris-Etherton PM, Etherton TD. Dietary linoleic acid increases and palmitic acid decreases hepatic LDL receptor protein and mRNA abundance in young pigs. *J Lipid Res.* 1996;37:2310-23.

Navab M, Hama SY, Hough GP, Hedrick CC, et al. High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:449-456.

Nestel PJ, Havenstein N, Homma Y, Scott TW, Cook LJ. Increased sterol excretion with polyunsaturated-fat high-cholesterol diets. *Metabolism.* 1975;24:189-98.

Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer EJ. Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. In vivo studies of receptor and nonreceptor-mediated catabolism of LDL in cebus monkeys. *Arteriosclerosis.* 1990;10:119-128.

Nicolosi RJ, Wilson TA, Rogers EJ, Kritchevsky D. Effects of specific fatty acids (8:0, 14:0, cis-18:1, trans-18:1) on plasma lipoproteins, early atherogenic potential, and LDL oxidative properties in the hamster. *J Lipid Res.* 1998;39:1972-1980.

Oh K, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the nurses' health study. *Am J Epidemiol.* 2005;161:672-679.

Oliveira CP, Coelho AM, Barbeiro HV, Lima VM, Soriano F, Ribeiro C, Molan NA, Alves VA, Souza HP, Machado MC, Carrilho FJ. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:189-194.

Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2006;99:1031-1043.

Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:373-381.

Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest.* 2008;118:316-332.

Ouguerram K, Maugeais C, Gardette J, Magot T, Krempf M. Effect of n-3 fatty acids on metabolism of apo B100-containing lipoprotein in type 2 diabetic subjects. *Br J Nutr.* 2006;96:100-6.

Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6027-32.

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

Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med.* 1992;43:219-25.

Passarelli M, Carrilho AJF, Quintão ECR. Lipoproteínas de alta densidade (HDL) e o papel do transporte reverso do colesterol (TRC) na aterosclerose. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1997;41:111-116.

Pawar A, Xu J, Jerks E, Mangelsdorf DJ, Jump DB. Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells. *J Biol Chem.* 2002;277:39243-50.

Pedersen A, Baumstark M, Marckmann P, Gylling H, Sandstrom B. An olive oil-rich diet results in higher concentrations of LDL cholesterol and a higher number of LDL subfraction particles than rapeseed oil and sunflower oil diets. *J Lipid Res.* 2000; 41:1901-1911.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2009;29:2002–2007.

Phillips MC, Johnson WJ, Rothblat GH. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1987;906:223-76.

Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118:829-838.

Quintão E, Grundy SM, Ahrens EH Jr. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res.* 1971;12:233-47.

Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:6511-8.

Rantala M, Rantala TT, Savolainen MJ, et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms and serum lipids: meta-analysis of the role of genetic variation in responsiveness to diet. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:713-724.

Reaven, P.D.; Grasse, B.J.; Tribble, D.L. Effect of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with  $\alpha$ -tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. *Arterioscler. Thromb.* 1994;14:557-566.

Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol.* 2008;14:185-192.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939-51.

Rodrigueza WV, Thuahnai ST, Temel RE, Lund-Katz S, Phillips MC, Williams DL. Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem.* 1999;274:20344-20350.

Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13531-13536.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.

Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res*. 1999;40:781-96

Rudel LL, Bond MG, Bullock BC. LDL heterogeneity and atherosclerosis in nonhuman primates. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;454:248-53.

Rudel LL, Haine JL, Sawyer JK. Effect on plasma lipoprotein of monosaturated, saturated, and polyunsaturated fatty acids in the diet of African green monkeys. *J Lipid Res*. 1990;31:1873-1882.

Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, Shah Ramesh, Wilson MD. Dietary monounsaturated fatty acids promotes aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100- overexpression transgenic mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1818-1827.

Rudel LL, Parks JS, Sawyer JK. Compared with dietary monounsaturated and saturated fat, polyunsaturated fat protects African green monkeys from coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2101-10.

Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*. 2007;39:86-93.

Rumsey SC, Galeano NF, Lipschitz B, Deckelbaum RJ. Oleate and other long chain fatty acids stimulate low density lipoprotein receptor activity by enhancing acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity and altering intracellular regulatory cholesterol pools in cultured cells. *J Biol Chem*. 1995;270:10008-16.

Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*. 1999;22:352-5.

Salmerón J, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Willett WC. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:1019-26.

Schaefer EJ, Kay LL, Zech LA, Brewer HB Jr. Tangier disease. High density lipoprotein deficiency due to defective metabolism of an abnormal apolipoprotein A-i (ApoA-I-Tangier). *J Clin Invest.* 1982;70:934-45.

Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:191-212.

Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006;22:437-443.

Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet.* 2011;377:1949-61.

Schuster GU, Parini P, Wang L, Alberti S, Steffensen KR, Hansson GK, Angelin B, Gustafsson JA. Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;106:1147-53.

Seo T, Qi K, Chang C, Liu Y, Worgall TS, Ramakrishnan R, Deckelbaum RJ. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest.* 2005;115:2214-22.

Shepherd J, Packard CJ, Grundy SM, Yeshurun D, Gotto AM Jr, Taunton OD. Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. *J Lipid Res.* 1980;21:91-9.

Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR, Tan B, Brooks-Wilson A, Kwok A, Bissada N, Yang YZ, Liu G, Tafuri SR, Fievet C, Wellington CL, Staels B, Hayden MR. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J Biol Chem.* 2001;276:33969-33979.

Skálén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002; 417:750-754.

Skeaff CM, Miller J. Dietary fat and coronary heart disease: summary of evidence from prospective cohort and randomised controlled trials. *Ann Nutr Metab.* 2009;55:173-201

Solà R, La Ville AE, Richard JL, Motta C, Bargalló MT, Girona J, Masana L, Jacotot B. Oleic acid rich diet protects against the oxidative modification of high density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:1037-45.

Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2008;40:194-199.

Spady DK, Dietschy JM. Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82:4526-30.

Spritz N, Mishkel MA. Effects of dietary fats on plasma lipids and lipoproteins: an hypothesis for the lipid-lowering effect of unsaturated fatty acids. *J Clin Invest.* 1969;48:78-86.

Srivastava RA, Ito H, Hess M, Srivastava N, Schonfeld G. Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 and Caco2 cells by palmitate, oleate, and 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res.* 1995;36:1434-46.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;320:915-24.

Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res.* 2006;47:1339-51.

Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Manson JE, Stampfer MJ, Rexrode KM, Willett WC, Hu FB. A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. *Circulation.* 2007a;115:1858-65.

Sun Q, Ma J, Campos H, Hu FB. Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr.* 2007b;86:929-37.

Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med.* 2008;263:256-73.

Tammi A, Ronnema T, Rask-Nissila L, et al. Apolipoprotein E phenotype regulates cholesterol absorption in healthy 13-month-old children. The STRIP Study. *Pediatr Res.* 2001; 50:688-691

Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, Day C, Muggeo M. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2008;51:444-50.

Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats

and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*2008; 295:G987-995.

The World Health (WHO) Report 2004. Global strategy on diet, physical activity, and health. Geneva: World Health Organization; 2004.

Tremblay AJ, Després JP, Piché ME, Nadeau A, Bergeron J, Alméras N, et al. Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation, and components of the insulin resistance syndrome. *Metabolism.*2004;53:310-317.

Vaughan AM, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem.* 2005;280:30150-7.

Večeřa R, Kottová N, Váňa P, et al. Antioxidant Status, Lipoprotein Profile And Liver Lipids In Rats Fed On High-Cholesterol Diet Containing Currant Oil Rich In N-3 And N-6 Polyunsaturated Fatty Acids *Physiol. Res.* 2003;52:177-187.

Vergès B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009;23:681-685.

Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia.*2001;44:312-319.

Virella G, Munoz JF, Galbraith GM, Gissinger C, Chassereau C, Lopes-Virella MF. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes containing low-density lipoprotein. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;75:179-189.

Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem.* 2001;276:23742-7.

Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL, Lichtenstein AH. Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis.* 2009;204:147-155.

Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem.* 2002;277:5692-7.

Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. *J Biol Chem.* 2005;28:35896-903.

Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a protein kinase C delta pathway. *J Lipid Res.* 2007;48:1062-8.

Wang L, Manson JE, Forman JP, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. Dietary fatty acids and the risk of hypertension in middle-aged and older women. *Hypertension.* 2010;56:598-604

Warensjö E, Sundström J, Vessby B, Cederholm T, Risérus U. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:203-9.

Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS, Hwang DH. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol.* 2005;174:5390-7.

Weggemans RM, Zock PL, Ordovas JM, Ramos-Galluzzi J, Katan MB. Genetic polymorphisms and lipid response to dietary changes in humans. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:950-7.

Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2008;14:193-199.

Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science.* 1992;258:999-1001

Wolff RL, Precht D, Nasser B, El Kebbij MS. Trans- and cis-octadecenoic acid isomers in the hump and milk lipids from *Camelus dromedarius*. *Lipids.* 2001;36:1175-8.

Woollett LA, Spady AK, Dietschy JM. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J Lipid Res.* 1992; 33:77-88.

Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:712-9.

Ye SQ, Kwiterovich PO Jr. Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:1275S-1284S.

Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K; Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007;369:1090-8.

Zapolska-Downar D, Kosmider A, Naruszewicz M. Trans fatty acids induce apoptosis in human endothelial cells. *J Physiol Pharmacol*.2005;56:611-625.

Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:285-300.

Zhu M, Fu Y, Hou Y, Wang N, Guan Y, Tang C, Shyy JY, Zhu Y. Laminar shear stress regulates liver X receptor in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:527-33.

**ANEXOS**



# Intake of *trans* Fatty Acids Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Reduces Adipose Tissue Fat Content<sup>1-3</sup>

Roberta M. Machado,<sup>4</sup> José T. Stefano,<sup>5</sup> Claudia P. M. S. Oliveira,<sup>5</sup> Evandro S. Mello,<sup>6</sup> Fabiana D. Ferreira,<sup>4</sup> Valeria S. Nunes,<sup>4</sup> Vicência M. R. de Lima,<sup>5</sup> Eder C. R. Quintão,<sup>4</sup> Sergio Catanozi,<sup>4</sup> Edna R. Nakandakare,<sup>4</sup> and Ana Maria P. Lottenberg<sup>4\*</sup>

<sup>4</sup>Endocrinology and Metabolism Division, Faculty of Medical Sciences of the University, Lipids Laboratory, LIM-10, <sup>5</sup>Department of Gastroenterology, LIM-07, and <sup>6</sup>Department of Pathology, LIM-14, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, Sao Paulo, 01246-903 Brazil

## Abstract

We investigated the effects of dietary *trans* fatty acids, PUFA, and SFA on body and liver fat content, liver histology, and mRNA of enzymes involved in fatty acid metabolism. LDL receptor knockout weaning male mice were fed for 16 wk with diets containing 40% energy as either *trans* fatty acids (TRANS), PUFA, or SFA. Afterwards, subcutaneous and epididymal fat were weighed and histological markers of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) were assessed according to the Histological Scoring System for NAFLD. PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , microsomal triglyceride transfer protein (MTP), carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1), and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) mRNA were measured by quantitative RT-PCR. Food intake was similar in the 3 groups, although mice fed the TRANS diet gained less weight than those receiving the PUFA diet. Compared with the PUFA- and SFA-fed mice, TRANS-fed mice had greater plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations, less epididymal and subcutaneous fat, larger livers with nonalcoholic steatohepatitis (NASH)-like lesions, and greater liver TC and TG concentrations. Macrosteatosis in TRANS-fed mice was associated with a higher homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA<sub>IR</sub>) index and upregulated mRNA related to hepatic fatty acid synthesis (SREBP-1c and PPAR $\gamma$ ) and to downregulated MTP mRNA. Diet consumption did not alter hepatic mRNA related to fatty acid oxidation (PPAR $\alpha$  and CPT-1). In conclusion, compared with PUFA- and SFA-fed mice, TRANS-fed mice had less adiposity, impaired glucose tolerance characterized by greater HOMA<sub>IR</sub> index, and NASH-like lesions due to greater hepatic lipogenesis. These results demonstrate the role of *trans* fatty acid intake on the development of key features of metabolic syndrome. J. Nutr. doi: 10.3945/jn.109.117937.

## Introduction

The intake of fat-rich diets and a sedentary lifestyle are related to the epidemic of obesity in Western societies. Body weight excess and abdominal obesity predispose to insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, and a proinflammatory and prothrombotic status, which are linked to the development of premature

atherosclerotic cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus (1).

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)<sup>7</sup> is a clinical and pathological condition whose severity can range from mild steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and even to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (2) in patients without a history of alcohol abuse. The prevalence of NAFLD is rapidly increasing, ranging from 15 to 25% in the general population (3). Recently, a strong association between metabolic syndrome

<sup>1</sup> Supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP no. 06/55516-8). Fats were provided by UNILEVER Best Foods (SP, Brazil) and gas-liquid chromatographic analyses was conducted by Cognis Brasil LTDA.

<sup>2</sup> Author disclosures: R. M. Machado, J. T. Stefano, C. P. M. S. Oliveira, E. S. Mello, F. D. Ferreira, V. S. Nunes, V. M. R. d. Lima, E. C. R. Quintão, S. Catanozi, E. R. Nakandakare, and A. M. P. Lottenberg, no conflicts of interest.

<sup>3</sup> Supplemental Figure 1 is available with the online posting of this paper at [jn.nutrition.org](http://jn.nutrition.org).

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [amlottenberg@uol.com.br](mailto:amlottenberg@uol.com.br).

<sup>7</sup> Abbreviations used: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; HDL-C, HDL cholesterol; HOMA<sub>IR</sub>, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL-KO, LDL receptor knockout; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; TRANS, diet enriched with *trans* fatty acid.

and NAFLD was reported; ~90% of NAFLD cases concurrently present 1 or more features of metabolic syndrome, whereas 30% present all features of metabolic syndrome (4).

Although the etiology of NAFLD is not fully understood, accumulation of fat in the liver has been ascribed to diverse fatty acid metabolic abnormalities, including increased hepatic lipogenesis, impaired mitochondrial fatty acid oxidation, and increased triglyceride (TG) content of VLDL particles (5,6). Additionally, fatty liver can be associated with local oxidative stress, lipid peroxidation, and tumor necrosis factor- $\alpha$  production that may be critical to liver injury, inflammation, fibrosis, and the development of NASH (6,7).

The individual roles of various nutritional and metabolic factors in the pathogenesis and natural history of NAFLD are still incompletely understood. One key contributor could be insulin resistance, regarded by some as the hallmark and causal factor of NAFLD, although its occurrence is not obligatory for NAFLD (8,9). Individuals with uncomplicated steatosis and NASH have been studied to discern common dietary patterns and macronutrient intake. Whereas some studies revealed elevated carbohydrate and fat intake, scientific and clinical consensus is lacking. Dietary assessment cannot reveal lipotoxicity per se (10).

Other studies have shown that both quantity and quality of dietary fat influences liver fatty acid synthesis (11–13) and insulin sensitivity (14,15). Dietary fatty acids can induce insulin resistance (16) and raise the risk of cardiovascular disease (17). Furthermore, elevated intake of *trans* fatty acids (18) and dietary SFA are related to the incidence of coronary atherosclerotic disease (19). The proatherogenic effect of the *trans* fatty acids is in part attributed to reduced plasma HDL cholesterol (HDL-C) and increased LDL cholesterol, TG, and lipoprotein (a) (18–20). However, little is known about the influence of *trans* fatty acids on hepatic lipid metabolism. In mice, intake of *trans* fatty acids induced fat accumulation in the liver that resembled NASH (21); however, PUFA were not included for comparison and the authors did not evaluate hepatic genes involved in fat accumulation (21).

LDL receptor knockout (LDLr-KO) mice have a plasma lipoprotein profile that mimics that of humans. When fed a high-fat diet, these mice develop atherosclerosis, weight gain, and other features of metabolic syndrome such as hypertriglyceridemia, decreased HDL, hyperinsulinemia, and insulin resistance (22). Therefore, we chose this murine model to compare the effects of high-fat diets enriched with 3 different fatty acids, *trans* (TRANS), PUFA, and SFA fatty acid, on the development of NAFLD.

## Materials and Methods

**Mouse models and diet.** LDLr-KO weaning male mice (C57BL/6J; Jackson Laboratory) were fed for 16 wk with 1 of 3 high-fat diets (40% of energy as fat) enriched with *trans* fatty acids (TRANS;  $n = 13$ ), PUFA ( $n = 14$ ), or SFA ( $n = 14$ ). Diets were prepared by Nutriexperimental and the composition complied with the recommendations of the AIN (23). The fatty acid compositions of the fats used in the diets are shown on Table 1.

After weaning, male LDLr-KO mice were housed in a temperature-controlled environment (12-h-light/dark cycle) and were allowed ad libitum access to food and water. Mice were weighed weekly and food intake was estimated daily by weighing the food offered and the residual food from the previous feeding. After a 16-wk period, mice were feed-deprived for 12 h and anesthetized with ketamine (100 mg/kg, intraperitoneal, Ketalar; Parke-Davis) and xylazine (10 mg/kg, intraperitoneal, Rompum; Bayer). Blood was then drawn from the subclavian

**TABLE 1** Fatty acid compositions of the diets<sup>1–3</sup>

| Fatty acids                         | TRANS                 | PUFA  | SFA   |
|-------------------------------------|-----------------------|-------|-------|
|                                     | <i>g/100 g of fat</i> |       |       |
| Lauric, 12:0                        | 0.64                  | 0     | 0.42  |
| Mirystic, 14:0                      | 0.38                  | 0     | 0.77  |
| Palmitic, 16:0                      | 14.38                 | 4.57  | 33.87 |
| Palmitoleic, 16:1 <i>cis</i>        | 0                     | 0     | 0.25  |
| Stearic, 18:0                       | 17.78                 | 2.83  | 4.51  |
| Elaidic, 18:1 <i>trans</i>          | 34.70                 | 0     | 0.31  |
| Oleic, 18:1 <i>cis</i>              | 28.24                 | 40.52 | 45.17 |
| Linoelaidic, 18:2 <i>trans</i>      | 1.61                  | 0.20  | 0.45  |
| Linoleic, [18:2 (n-6) <i>cis</i> ]  | 1.33                  | 47.13 | 13    |
| Linolenic, [18:3 (n-3) <i>cis</i> ] | 0.10                  | 3.71  | 0.62  |
| Araquidic, 20:0                     | 0.47                  | 0.36  | 0.37  |
| Eicosenoic, 20:1 (n-9)              | 0                     | 0     | 0.21  |
| Docosanoic, 22:0                    | 0.48                  | 0.32  | 0     |
| Total saturated                     | 34.12                 | 8.08  | 39.95 |
| Total monounsaturated               | 28.24                 | 40.52 | 45.63 |
| Total polyunsaturated               | 1.43                  | 50.84 | 13.62 |
| Total <i>trans</i>                  | 36.30                 | 0.48  | 0.76  |

<sup>1</sup> Sources of fats: SFA (11% olive oil, 5% soy bean oil, 84% palm oil); TRANS (100% hydrogenated soy bean oil); PUFA (54% sunflower oil, 46% canola oil).

<sup>2</sup> GLC performed by COGNIS Brazil (TRANS fat) and Faculty of Pharmaceutical Science of the University of São Paulo (polyunsaturated and saturated fat).

<sup>3</sup> Fats were generously provided by Unilever, SP, Brazil.

vein. All animal experiments and care were conducted in accordance with the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo.

Livers and epididymal fat pads were dissected, weighed, and immediately frozen. For later determination of subcutaneous adipose tissue, the remaining carcass was frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

**Blood sampling and lipoprotein profile.** Plasma was separated after centrifugation and samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The following analyses were performed with enzymatic kits: plasma cholesterol (Cholesterol CHOD-PAP 1489232), TG (Triglyceride GPO-PAP 11488872), glucose (Glucose PAP 84 Labtest Diagnostics, MG), alanine aminotransferase (ALT) (ALT/GTP Liquiform 108, Labtest Diagnostics), and aspartate aminotransferase (AST) (AST/GOT Liquiform 109, Labtest Diagnostics). Insulin was measured using an ELISA (Alpco Diagnostics). The homeostasis model assessment of insulin resistance ( $\text{HOMA}_{\text{IR}}$ ) index was calculated with glucose and insulin concentration obtained in the feed-deprived state using the following formula:  $\text{glucose (mg/dL)} \times \text{insulin } (\mu\text{U/mL})/405$ . The plasma lipoprotein profile was determined by fast protein liquid chromatography. Whole plasma (100  $\mu\text{L}$ ) was injected onto a HR 10/30 30-cm Superose 6 column (Pharmacia Biotech) and run at a constant flow of 0.5 mL/min with Tris buffer (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, and 0.03%  $\text{NaN}_3$ ), pH 7.4. Fractions were collected and pooled according to the elution times expected for VLDL, LDL, and HDL. Aliquots of isolated lipoprotein fractions were used for enzymatic measurement of cholesterol and TG in a Cobas Mira analyzer (F. Hoffman-La Roche).

**Subcutaneous adipose tissue extraction.** Subcutaneous adipose tissue was extracted after homogenization under mild alkaline hydrolysis. Briefly, after removing the head, the carcasses were heated ( $90^{\circ}\text{C}$ ) in ethanol (20 mL, 95%, NaOH, 2 mL at 10 mol/L) until complete dissolution of the tissues. The samples were then acidified with HCl (10 mol/L) followed by lipid extraction with hexane ( $3 \times 40$  mL). After solvent evaporation, lipids were diluted in hexane, transferred to preweighed glass shells, and completely evaporated at room temperature. The glass shells were then weighed to extrapolate the weight of lipids.

**Histological analysis and grading of the NAFLD activity.** Liver tissue samples of each animal were fixed in 4% formaldehyde and

processed for histological analysis with hematoxylin/eosin and Masson's Trichrome stains. Histological variables were blindly scored by one of the authors (E.S.M.) using a scoring system adapted from the NASH activity score in accordance with the Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network (24). This system numerically rates macrosteatosis (0–3), lobular inflammatory changes (0–3), and hepatocyte ballooning (0–2) and fibrosis (24–26).

**Liver lipid concentrations.** Measurement of liver cholesterol and TG was performed as previously described (27). Briefly, ~200 mg of tissue (wet weight) was homogenized and lipids were extracted in a chloroform:methanol (2:1) solution (6 mL). Phases were separated by the addition of 0.05% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Chloroform (1 mL, 0.5% Triton X-100) was then added to the lower phase and dried under nitrogen at room temperature. The tubes were rinsed with chloroform and dried again. Deionized water (1 mL) was added, tubes were shaken in a water bath (37°C for 15 min), vortexed, and subsequently used for the enzymatic determination of lipid content.

**Liver RNA analysis.** Liver tissue total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. RNA content was determined spectrophotometrically and RNA integrity verified by visualization of the 28S and 18S RNA bands in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Transcription levels of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , microsomal TG transfer protein (MTP), carnitine palmitoyl transferase (CPT-1), and sterol regulatory element binding protein 1-c (SREBP-1c) were determined by quantitative RT-PCR, which was carried out in a Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research) using the SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Primers were designed using the Primer3 Plus (<http://primer3.sourceforge.net>). The sense and antisense primers for each transcript were as follows:  $\beta$ -actin, TGTTACCAACTGGGACGACA and GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAA; PPAR $\alpha$ , ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC and TTGCCAGAGATTGAGGTC; PPAR $\gamma$ , CATAAAGTCCTTCCCCTGCGTGA and GAAACTGGCACCCCTTGAAAA; MTP, CCTCTTGCA-GTGCTTTTTTC and ATTTTGTAGCCACGCTGTG; CPT-1, TGCCTCTATGTGGTGTCCAA and TCAAACAGTCCACCTGCTG; SREBP-1c, GCGCTACCGGTCTTCTATCA and GGATGTAGTCGATGGCCCTG.

Values of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , MTP, CPT-1, and SREBP-1 mRNA were normalized by corresponding values of housekeeping  $\beta$ -actin mRNA and additionally normalized to the mean value control livers from mice fed a regular-fat diet (Nuvilab-CR1, Nuvital). These animals were utilized to determine basal conditions. To evaluate the amplification efficiency of each target gene and  $\beta$ -actin gene, standard curves were constructed from a control liver RNA sample using duplicate serial dilutions with 5 different RNA concentrations (500, 100, 20, 4, and 0.8  $\mu$ g/L). Relative quantification was calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method (28) for PPAR $\gamma$  and SREBP-1 genes based on their equivalent amplification efficiency with  $\beta$ -actin. The mathematical model described (29) was used to evaluate the relative expression ratio of PPAR $\alpha$ , MTP, and CPT-1 to  $\beta$ -actin. Amplification of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , MTP, CPT-1, SREBP-1c, and housekeeping control genes was conducted in duplicate for each sample.

Interassay variation was investigated in 2 different experimental analyses performed on different days.

**Statistical analysis.** Results are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical analysis for the data that passed the normality test was performed using 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman-Keuls multiple comparison test for pair wise comparisons. AST and ALT were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis tests. A value of  $P < 0.05$  was considered significant. The data were analyzed with the software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

## Results

Food intake did not differ among the groups, even though mice fed the TRANS diet gained less weight than those fed the PUFA (16%) and SFA (11%) diets. Moreover, mice in the TRANS group had ~37% and 36% less subcutaneous fat compared with mice in the PUFA and SFA groups, respectively. The epididymal fat pad content, which roughly mimics visceral fat in humans, was also lower in mice fed the TRANS diet (Table 2). However, liver weight of the TRANS-fed mice was 66% and 61% higher as compared with PUFA- and SFA-fed mice, respectively (Table 2; Supplemental Fig. 1A). Plasma AST and ALT levels did not differ among the groups (Table 2).

**Liver histology and lipid concentrations.** Liver total cholesterol (TC) and TG concentrations were significantly greater in the TRANS-fed mice than in the PUFA- and SFA-fed mice (Table 2). Moreover, mice fed the TRANS diet developed NASH-like lesions characterized by macrovesicular steatosis (grade 3) and inflammatory infiltrate (grade 2), whereas mice fed the PUFA and SFA diets had very mild microvesicular hepatic steatosis (grade 1) with minimal inflammatory process (grade 1) (Supplemental Fig. 1B). Fibrosis and hepatocellular ballooning were not observed in all samples and were therefore not scored.

**Hepatic lipogenic gene expression.** To investigate the mechanisms of development of NASH in LDLr-KO mice fed the TRANS diet, we determined the mRNA of genes involved in hepatic lipid metabolism. SREBP-1c expression was 130% and 88% higher in TRANS-fed mice than in PUFA- and SFA-fed mice, respectively. PPAR $\gamma$  mRNA was over 4-fold and 2-fold higher in TRANS-fed mice than in PUFA- and SFA-fed mice, respectively. Conversely, MTP mRNA was 46% lower in TRANS-fed mice compared with PUFA-fed mice, suggesting a diminished liver capacity to export TG ( $P < 0.05$ ). However, the groups did not differ in expression of genes related to fatty acid oxidation, PPAR $\alpha$ , and CPT-1 (Table 3).

**TABLE 2** Body weight gain, relative weights of liver and adipose tissue, liver lipids, and plasma enzyme levels of LDLr-KO mice fed TRANS, PUFA, or SFA diets for 16 wk<sup>1,2</sup>

| Measurements                        | n  | TRANS                         | PUFA                          | SFA                             |
|-------------------------------------|----|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Weight gain, g/16 wk                | 14 | 17.17 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup> | 20.44 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup> | 19.26 $\pm$ 3.24 <sup>a,b</sup> |
| Liver weight, g/100 g body weight   | 14 | 5.93 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>  | 3.56 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>  | 3.68 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>    |
| Epididymal fat, g/100 g body weight | 10 | 1.88 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>  | 3.09 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>  | 2.81 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>    |
| Subcutaneous fat, g/100 g carcass   | 8  | 11.24 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup> | 17.91 $\pm$ 4.50 <sup>a</sup> | 17.51 $\pm$ 5.08 <sup>a</sup>   |
| AST, U/L                            | 5  | 66.7 $\pm$ 7.2                | 70 $\pm$ 22.9                 | 61.2 $\pm$ 31.7                 |
| ALT, U/L                            | 5  | 31.6 $\pm$ 4.1                | 45.8 $\pm$ 38.1               | 34.5 $\pm$ 29.9                 |
| Liver TC, mmol/g wet tissue         | 7  | 0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>  | 0.06 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>    |
| Liver TG, mmol/g wet tissue         | 7  | 0.52 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>  | 0.26 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>  | 0.27 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>    |

<sup>1</sup> Data are presented as means  $\pm$  SD. Means in a row with superscripts without a common letter differ,  $P < 0.05$ .

**TABLE 3** Liver mRNA of LDLr-KO mice fed TRANS, PUFA, or SFA diets for 16 wk<sup>1,2</sup>

| mRNA     | TRANS                    | PUFA                     | SFA                      |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|          |                          | <i>Fold of control</i>   |                          |
| SREBP-1c | 1.73 ± 0.90 <sup>a</sup> | 0.75 ± 0.60 <sup>b</sup> | 0.92 ± 0.50 <sup>b</sup> |
| PPAR-γ   | 0.99 ± 0.43 <sup>a</sup> | 0.18 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.36 ± 0.10 <sup>b</sup> |
| MTP      | 1.5 ± 0.5 <sup>b</sup>   | 2.3 ± 0.7 <sup>a</sup>   | 1.0 ± 0.6 <sup>b</sup>   |
| CPT      | 1.15 ± 0.03              | 1.17 ± 0.06              | 1.13 ± 0.05              |
| PPAR-α   | 1.02 ± 0.13              | 1.13 ± 0.17              | 1.07 ± 0.15              |

<sup>1</sup> Data are presented as mean ± SD, *n* = 10. Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P* < 0.05.

<sup>2</sup> Results were standardized to β-actin mRNA and normalized to the mean of livers from mice fed a diet containing 7% of energy as fat.

**Plasma lipoproteins.** The plasma TG concentration in mice fed the TRANS diet was 3-fold higher than in mice fed the PUFA diet and 2-fold higher than in mice fed the SFA diet (Table 4). In addition, mice fed the TRANS diet had severe hypercholesterolemia; plasma cholesterol was 5-fold higher than in mice fed the PUFA diet and 2-fold higher than in mice fed the SFA diet. PUFA-fed mice developed only mild hypercholesterolemia and their plasma cholesterol concentration was lower than in SFA-fed mice (Table 4).

VLDL and LDL particles in the TRANS-fed mice had markedly elevated cholesterol and TG concentrations compared with the PUFA- and SFA-fed mice. HDL-C concentrations did not differ among the groups. However, mice fed the TRANS diet had a higher HDL-TG concentration compared with mice fed the PUFA diet (Table 4; Fig. 1).

**Circulating glucose and insulin.** The blood glucose concentration in feed-deprived mice in the TRANS group was higher than in the PUFA-fed mice but did not differ from the SFA-fed mice. Plasma insulin did not differ among groups. Thus, the calculated HOMA<sub>IR</sub> for mice fed the TRANS diet was higher than in mice fed the SAT and PUFA diets, indicating greater insulin resistance in the TRANS group (Table 5).

## Discussion

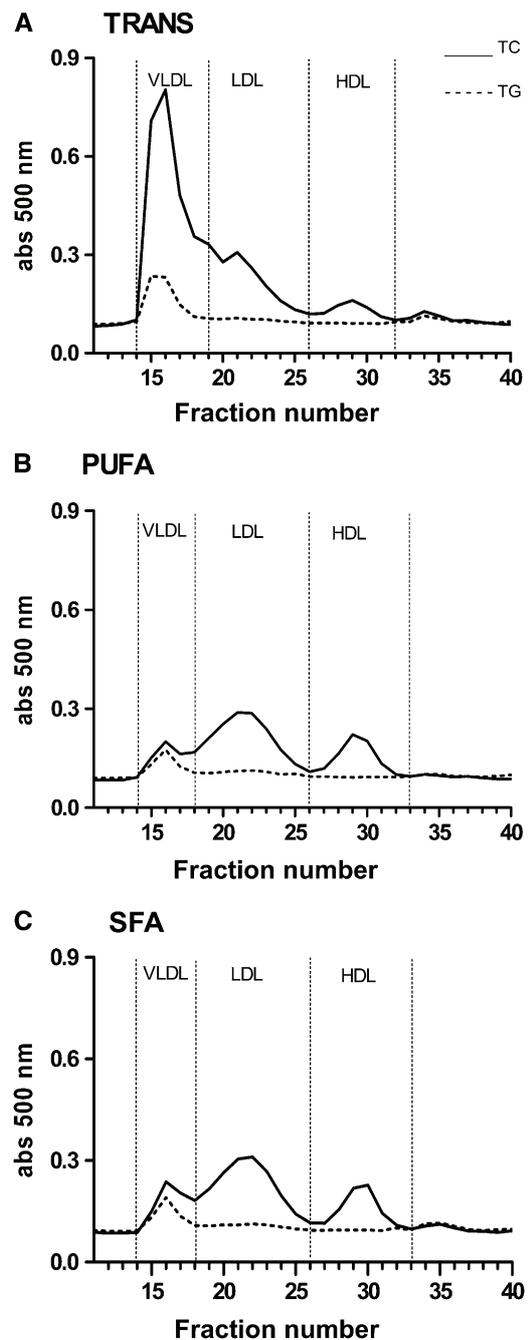
In this study, consumption of all 3 high-fat diets induced some degree of liver steatosis. However, compared with mice fed

**TABLE 4** Plasma lipoprotein cholesterol and TG concentrations in LDLr-KO mice fed TRANS, PUFA, or SFA diets for 16 wk<sup>1,2</sup>

|                  | TRANS                    | PUFA                     | SFA                        |
|------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                  |                          | <i>mmol/L</i>            |                            |
| TC               | 30 ± 12 <sup>a</sup>     | 4.9 ± 1.6 <sup>c</sup>   | 9.2 ± 2.6 <sup>b</sup>     |
| TG               | 4.7 ± 1.9 <sup>a</sup>   | 1.2 ± 0.7 <sup>b</sup>   | 1.7 ± 0.4 <sup>b</sup>     |
| VLDL cholesterol | 18 ± 7.5 <sup>a</sup>    | 1.2 ± 0.9 <sup>b</sup>   | 4.4 ± 3.1 <sup>b</sup>     |
| LDL cholesterol  | 7.5 ± 3.9 <sup>a</sup>   | 2.3 ± 1.3 <sup>b</sup>   | 4.1 ± 1.9 <sup>b</sup>     |
| HDL-C            | 1.3 ± 0.2                | 1.2 ± 0.6                | 1.8 ± 0.6                  |
| VLDL-TG          | 3.3 ± 1.2 <sup>a</sup>   | 0.8 ± 0.4 <sup>b</sup>   | 1.3 ± 0.4 <sup>b</sup>     |
| LDL-TG           | 0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>   | 0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>   | 0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>     |
| HDL-TG           | 0.30 ± 0.27 <sup>a</sup> | 0.04 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.20 ± 0.23 <sup>a,b</sup> |

<sup>1</sup> Data are presented as means ± SD, *n* = 8–14. Means in a row without a common letter differ, *P* < 0.05.

<sup>2</sup> The cholesterol and TG distribution was calculated as the area under the peaks of the fast protein liquid chromatography profiles of individual plasma samples and converted to absolute numbers.



**FIGURE 1** Plasma lipoprotein profiles of mice fed TRANS (A), PUFA (B), or SFA (C) diets for 16 wk. Mice fed the TRANS diet had greater enrichments of cholesterol and TG in VLDL and LDL particles and had more HDL-TG than mice fed the PUFA and SFA diets. HDL-C did not differ among the groups, *n* = 8–9.

the PUFA and SFA diets, mice fed the TRANS diet had greater liver weight that was associated with NASH-like lesions. In agreement with another study (30), the TRANS diet intake elicited increased transcription of genes involved in liver fat synthesis such as PPARγ and SREBP-1c and was associated with higher hepatic cholesterol and TG concentrations compared with the PUFA and SFA diets. However, PPARα and CPT-1 mRNA were not affected in mice fed the TRANS diet, suggesting that the liver β-oxidative capacity did not differ among groups. In addition, we have shown that consumption of the TRANS diet decreased the MTP mRNA compared with the PUFA diet. This effect could be implicated in a reduction or

**TABLE 5** Effect of TRANS, PUFA, and SFA diets on plasma glucose, insulin, and HOMA<sub>IR</sub> in LDLr-KO fed mice<sup>1</sup>

|                    | TRANS                   | PUFA                    | SFA                       |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Glucose, mmol/L    | 21.7 ± 7.0 <sup>a</sup> | 10.8 ± 4.5 <sup>b</sup> | 15.8 ± 4.4 <sup>a,b</sup> |
| Insulin, pmol/L    | 203.8 ± 5.2             | 210.1 ± 14.6            | 210.3 ± 5.8               |
| HOMA <sub>IR</sub> | 28.3 ± 8.8 <sup>a</sup> | 16.5 ± 4.3 <sup>b</sup> | 21.4 ± 6.0 <sup>b</sup>   |

<sup>1</sup> Data are presented as mean ± SD, n = 8. Means in a row with superscripts without a common letter differ, P < 0.05.

insufficient transfer of TG to nascent ApoB particles and thereby reduced (impaired) VLDL assembly and secretion. This role of MTP is well established in the literature (31) and absence of MTP activity is demonstrated clinically in abetalipoproteinemia (32).

Varied rodent models of NAFLD demonstrate histological evidence of hepatic steatosis. Nevertheless, features of NASH that should include ballooning hepatocyte degeneration or inflammatory infiltrate in addition to hepatic steatosis (24) are less frequently demonstrated (25). In the present study, LDLr-KO mice fed 3 variations of a high-fat diet developed NAFLD. However, only the TRANS diet consumption induced NASH-like lesions, characterized by steatosis and mixed lobular inflammatory infiltrate.

TRANS-fed mice had greater cholesterol and TG concentrations in VLDL and LDL particles compared with the PUFA- and SFA-fed mice. Moreover, compared with PUFA-fed mice, TRANS-fed mice had more TG in the HDL particles. TG-enriched HDL particles are good substrates for hepatic lipase, the enzyme responsible for the HDL catabolism (33). Greater enzyme activity can reduce HDL and promote the proatherogenic lipoprotein pattern associated with *trans* fatty acid consumption.

Our data show that mice fed the TRANS diet gained less weight than mice fed the PUFA diet and this was likely due to reduced subcutaneous and epididymal fat. This result might be explained by a direct effect of *trans* fatty acids on adipose tissue lipolysis enzymes. However, elucidating mechanisms would involve measurements of enzyme activity, protein expression as related to fatty acid mobilization, and transcription factor activity such as PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ .

Despite the similar plasma insulin concentration found in the 3 groups, only the consumption of the TRANS diet elicited greater insulin resistance as indicated by HOMA<sub>IR</sub>. In the study by Tetri et al. (21), animals fed a diet enriched with *trans* fatty acids plus fructose gained more weight than the controls, likely due to higher energy intake. However, their data cannot be compared with the current results, because mice fed the TRANS diet weighed less than the other group even with similar food intake.

Fat oxidation might be influenced by the degree of unsaturation of fatty acids, being in order linolenic>linoleic>oleic (34). In addition, energy expenditure is greater for oleic than for linoleic and linolenic fatty acids (35) and diets enriched with SFA reduce fat oxidation and energy expenditure (36). Nonetheless, it has also been proposed that the oxidative capacity does not differ among SFA (16:0), PUFA (18:2), and *trans* fatty acids (*trans* 18:1) (34). It is important to emphasize that in our study, all diets were made with similar amounts of oleic acid and that the TRANS, PUFA, and SFA diets were enriched, respectively, with elaidic acid (18:1-*trans*), linoleic acid (18:2), and palmitic acid (16:0), which appear to have similar oxidative capacities (34).

In a previous study, mice fed a high-fat diet enriched with (n-3) PUFA developed mild hepatic steatosis but had preserved

mitochondrial  $\beta$ -oxidation and phosphorylation (37), supporting that the consumption of a high-fat diet enriched with (n-3) PUFA may cause fatty liver without mitochondrial dysfunction. In another study with mice, low amounts of *trans* fatty acids induced oxidative stress (30). These findings raise the hypothesis that *trans* fatty acids might induce oxidative stress due to impaired mitochondrial function or increased endoplasmic reticulum stress. Intake of conjugated linoleic acids can also lead to hepatomegaly and decreased adipose tissue mass (38,39). However, because our diets did not contain conjugated linoleic acids (Table 1), the present results may be attributed to *trans* fatty acids contained in the TRANS diet.

In conclusion, this study demonstrates that dietary *trans* fatty acids promote changes similar to human metabolic syndrome, including proatherogenic plasma lipid profiles, hepatomegaly due to fat accumulation and inflammatory NASH-like lesions, and impaired glucose tolerance. Therefore, this investigation supports other findings that intake of *trans* fatty acids may be deleterious for human health.

### Acknowledgments

R.M.M. and A.M.P.L. designed and conducted the research, analyzed the data, interpreted the results, and wrote the manuscript; C.P.M.S.O. interpreted the results and wrote the manuscript; J.T.S., V.S.N., F.D.F., and V.M.R.L. conducted the experiments and analyzed the data; E.S.M. analyzed the data; S.C. provided the animals; E.R.N. and E.C.R.Q. designed the research, interpreted the results and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript and none of the authors had a financial or personal conflict of interest.

### Literature Cited

1. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, et al.; American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–52.
2. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002;123:134–40.
3. Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens. *Diabet Med*. 2007;24:1–6.
4. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol*. 2008;14:185–92.
5. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134:424–31.
6. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114:147–52.
7. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2008;14:193–9.
8. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;37:909–16.
9. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem*. 2007;18:184–95.
10. Solga S, Alkhuraishe AR, Clark JM, Torbenson M, Greenwald A, Diehl AM, Magnuson T. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1578–83.

11. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36:485–501.
12. Giudetti AM, Sabetta S, di Summa R, Leo M, Damiano F, Siculella L, Gnoni GV. Differential effects of coconut oil- and fish oil-enriched diets on tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J Lipid Res*. 2003;44:2135–41.
13. Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2008;40:194–9.
14. Haag M, Dippenaar NG. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med Sci Monit*. 2005;11:RA359–67.
15. Due A, Larsen TM, Hermansen K, Stender S, Holst JJ, Toubro S, Martinussen T, Astrup A. Comparison of the effects on insulin resistance and glucose tolerance of 6-mo high-monounsaturated-fat, low-fat, and control diets. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:855–62.
16. Manco M, Calvani M, Mingroni G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6:402–13.
17. Nicolosi RJ, Wilson TA, Rogers EJ, Kritchevsky D. Effects of specific fatty acids (8:0, 14:0, cis-18:1, *trans*-18:1) on plasma lipoproteins, early atherogenic potential, and LDL oxidative properties in the hamster. *J Lipid Res*. 1998;39:1972–80.
18. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2006;354:1601–13.
19. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:1146–55.
20. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med*. 1990;323:439–45.
21. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed *trans* fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G987–95.
22. Srivastava RA, Jahagirdar R, Azhar S, Sharma S, Bisgaier CL. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Mol Cell Biochem*. 2006;285:35–50.
23. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939–51.
24. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrel LD, Liu YC, Torbenson MS, et al. Design and validation of a histologic scoring system for NAFLD. *Hepatology*. 2005;41:1313–21.
25. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 2006;87:1–16.
26. Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, de Sá SV, Símplicio FI, de Mello ES, Corrêa-Giannella ML, Alves VA, Laurindo FR, et al. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol*. 2006;45:725–33.
27. Carr TP, Andresen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem*. 1993;26:39–42.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402–8.
30. Cassagno N, Palos-Pinto A, Costet P, Breilh D, Darmon M, Berard AM. Low amounts of *trans* 18:1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defense to oxidative stress in mice. *Br J Nutr*. 2005;94:346–52.
31. Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res*. 2009;50:S162–6.
32. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. 1992;258:999–1001.
33. Vergès B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23:681–5.
34. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:905–11.
35. Jones PJ, Jew S, AbuMweis S. The effect of dietary oleic, linoleic, and linolenic acids on fat oxidation and energy expenditure in healthy men. *Metabolism*. 2008;57:1198–203.
36. Kien CL, Bunn JY, Ugrasbul F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:320–6.
37. Oliveira CP, Coelho AM, Barbeiro HV, Lima VM, Soriano F, Ribeiro C, Molan NA, Alves VA, Souza HP, et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:189–94.
38. Clement L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P. Dietary *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinaemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res*. 2002;43:1400–9.
39. Ferramosca A, Savy V, Conte L, Colombo S, Einerhand AW, Zara V. Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. *J Lipid Res*. 2006;47:1994–2003.



## Omega-6 polyunsaturated fatty acids prevent atherosclerosis development in LDLr-KO mice, in spite of displaying a pro-inflammatory profile similar to *trans* fatty acids

Roberta M. Machado<sup>a</sup>, Edna R. Nakandakare<sup>a</sup>, Eder C.R. Quintao<sup>a</sup>, Patricia M. Cazita<sup>a</sup>, Marcia K. Koike<sup>b</sup>, Valeria S. Nunes<sup>a</sup>, Fabiana D. Ferreira<sup>a</sup>, Milessa S. Afonso<sup>a</sup>, Renata P.A. Bombo<sup>a</sup>, Adriana Machado-Lima<sup>a</sup>, Francisco G. Soriano<sup>b</sup>, Sergio Catanozi<sup>a</sup>, Ana Maria Lottenberg<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Endocrinology and Metabolism Division, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, Lipids Laboratory, LIM 10, SP, Brazil

<sup>b</sup>Department of Medicine Division of Emergency Medicine, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, LIM 51, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 December 2011

Received in revised form

13 June 2012

Accepted 21 June 2012

Available online 29 June 2012

#### Keywords:

Fatty acids

*Trans* fatty acids

Saturated fatty acids

Unsaturated fatty acids

Atherosclerosis

ABCA1

Inflammation

### ABSTRACT

The development of atherosclerosis and the inflammatory response were investigated in LDLr-KO mice on three high-fat diets (40% energy as fat) for 16 weeks: *trans* (TRANS), saturated (SAFA) or  $\omega$ -6 polyunsaturated (PUFA) fats. The following parameters were measured: plasma lipids, aortic root total cholesterol (TC), lesion area (Oil Red-O), ABCA1 content and macrophage infiltration (immunohistochemistry), collagen content (Picrosirius-red) and co-localization of ABCA1 and macrophage (confocal microscopy) besides the plasma inflammatory markers (IL-6, TNF- $\alpha$ ) and the macrophage inflammatory response to lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS). As expected, plasma TC and TG concentrations were lower on the PUFA diet than on TRANS or SAFA diets. Aortic intima macrophage infiltration, ABCA1 content, and lesion area on PUFA group were lower compared to TRANS and SAFA groups. Macrophages and ABCA1 markers did not co-localize in the atherosclerotic plaque, suggesting that different cell types were responsible for the ABCA1 expression in plaques. Compared to PUFA, TRANS and SAFA presented higher collagen content and necrotic cores in atherosclerotic plaques. In the artery wall, TC was lower on PUFA compared to TRANS group; free cholesterol was lower on PUFA compared to TRANS and SAFA; cholesteryl ester concentration did not vary amongst the groups. Plasma TNF- $\alpha$  concentration on PUFA and TRANS-fed mice was higher compared to SAFA. No difference was observed in IL-6 concentration amongst groups. Regarding the macrophage inflammatory response to LPS, TRANS and PUFA presented higher culture medium concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  as compared to SAFA. The PUFA group showed the lowest amount of the anti-inflammatory marker IL-10 compared to TRANS and SAFA groups. In conclusion, PUFA intake prevented atherogenesis, even in a pro-inflammatory condition.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

It is well documented that the quantity and type of dietary fatty acids have an important role in the development of cardiovascular disease (CVD), especially due to their impact on plasma lipids, lipoprotein metabolism [1] and inflammatory status [2].

Polyunsaturated fatty acids have beneficial effects on cardiovascular risk [1], in part because of their hypolipidemic actions, although the underlying mechanisms are incompletely understood.

\* Corresponding author. Av. Dr Arnaldo, 455, 3rd Floor, Room 3305, 01246-000, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 3061 7263.

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

According to experimental studies [3,4] and clinical trials [1] strong association has been described between cardiovascular disease and saturated fatty acids and more pronounced with TRANS-fat consumption. Although saturated fatty acids have important intracellular functions [5], their high intake raises plasma low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) concentration, increasing cardiovascular risk. Moreover, *trans* fatty acids also induce a pro-atherogenic lipid profile and adversely decrease high density lipoprotein cholesterol (HDL-c) concentration [1].

The anti-atherogenic properties of HDL are, in part, attributed to its role in reverse cholesterol transport (RCT) [6], and several proteins and receptors involved in this process (e.g., CETP, LDLr, apoA1) are modulated by dietary fatty acids [7–9]. The most important transporters implicated in the cholesterol efflux from

**Abbreviations**

|       |                                       |         |  |
|-------|---------------------------------------|---------|--|
| apoAI | apolipoprotein AI                     | LDLr    | LDL receptor                                   |
| apo B | apolipoprotein B                      | LDL     | low density lipoprotein                        |
| ABCA1 | ATP binding cassette transporters A1  | LDLr-KO | LDL receptor knockout                          |
| ABCG1 | ATP binding cassette transporters G1  | LCAT    | lecithin cholesterol acyl transferase          |
| CVD   | cardiovascular disease                | PBS     | phosphate-buffered saline                      |
| CETP  | cholesteryl ester transfer protein    | PUFA    | diet enriched with polyunsaturated fatty acids |
| FPLC  | fast protein liquid chromatography    | RCT     | reverse cholesterol transport                  |
| HDL   | high density lipoprotein              | SAFA    | diet enriched with saturated fatty acids       |
| LCAT  | lecithin cholesterol acyl transferase | TC      | total cholesterol                              |
| GLC   | gas liquid chromatography analysis    | TG      | triacylglycerol                                |
|       |                                       | TRANS   | diet enriched with <i>trans</i> fatty acid     |
|       |                                       | VLDL    | very low density lipoprotein                   |

macrophages are the ATP binding cassette transporters A1 (ABCA1) and ABCG1 that work synergistically. ABCA1 transports phospholipids (PL) and free cholesterol (FC) onto apolipoprotein AI (apoAI), generating pre-beta HDL, whereas ABCG1 promotes cholesterol efflux from macrophages onto mature HDL particles [10].

*In vitro*, polyunsaturated fatty acids undesirably diminish cellular ABCA1 content and, consequently, reduce the cell cholesterol and phospholipid apolipoprotein-mediated RCT [11,12]. Our previous data showed that diets enriched with *trans*, saturated or polyunsaturated fatty acids did not interfere with the HDL-mediated cholesterol efflux in young adults [13]. These results suggest that the underlying mechanisms involved on the pro-atherogenic capacity of *trans* and saturated fatty acids seem to be related to other steps of cholesterol transport, which deserve investigation.

The inflammatory process, which contributes to the development of atherosclerosis, is also modulated by dietary fatty acids [14]. Macrophages and foam cells in the arterial wall secrete pro-inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) that increase local inflammation and contribute to lesion progression [15]. Both saturated fatty acids [16] and *trans* fatty acids are known to increase the secretion of pro-inflammatory markers [17] whereas polyunsaturated fatty acids, especially the  $\omega$ -3 series, can do the opposite [16].

Although the many actions of different types of dietary fatty acids on cardiovascular endpoint studies have been described, the consequences of the simultaneous impact of the inflammatory processes and plasma lipid metabolism on the development of atherosclerosis are not yet fully elucidated.

Therefore, this study was designed to evaluate the effects of high fat diets enriched with *trans*, saturated or polyunsaturated fatty acids on the concomitant impact of plasma lipids and the inflammatory response on the development of atherosclerotic lesions in LDLr-KO mice.

## 2. Materials and methods

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

**Animals and diet:** Weaned male LDLr-KO mice with a C57BL/6 background were acquired from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and fed one of the three high-fat diets (40% of energy as fat) enriched with *trans* (TRANS;  $n = 13$ ), saturated (SAFA;  $n = 14$ ) or polyunsaturated (PUFA;  $n = 14$ ) fatty acids for 16 weeks. The diets were prepared without cholesterol addition and had similar amounts of fiber, cholesterol and phytosterols. The TRANS-fat consisted of 100% partially hydrogenated soy bean oil; the SAFA-fat contained 11% olive oil, 5% soy bean oil and 84% palm oil; the PUFA-fat contained 54% sunflower oil and 46% canola oil. Gas liquid chromatography analyses (GLC) were provided by COGNIS Brazil

(TRANS-fat) and the Faculty of Pharmaceutical Science of the University of São Paulo (SAFA and PUFA-fat). The fatty acid compositions of the fats used on the diets are presented in [Supplemental Table 1](#).

After weaning, mice were housed (12-h light/dark cycle) in a temperature-controlled environment and allowed access to food and water *ad libitum*. Mice were weighed weekly and their daily food intake was estimated as the difference between the food offered and the residual food in the cages. After a 16-wk period, mice fasted for 12 h were anesthetized as described elsewhere [18]. Blood was drawn from the subclavian vein into 0.1% EDTA. All animal experiments and care were in accordance with the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo (CAPPesq 670/06).

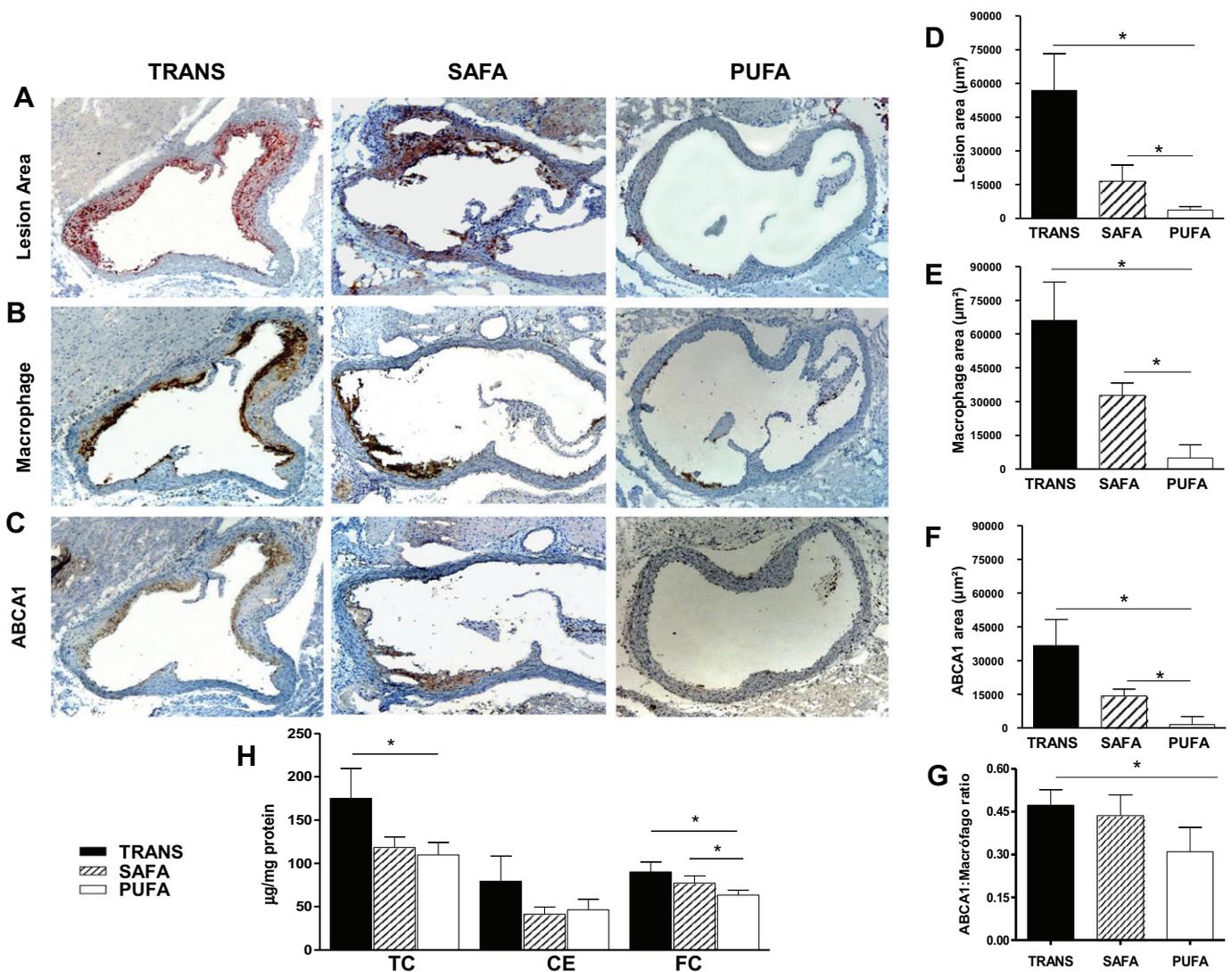
After perfusion with phosphate-buffered saline (PBS), the livers and hearts, attached to the aortas, were excised and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Blood sampling and lipoprotein profile:** Total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) analyses were carried out using enzymatic kits (Roche Diagnostics, IN, USA). The plasma lipoprotein profile was determined in aliquots (100  $\mu\text{l}$ ) isolated from each mouse using fast protein liquid chromatography (FPLC) as described elsewhere [18]. Plasma TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations were measured using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

**Atherosclerotic lesion analysis:** Five to six 4  $\mu\text{m}$ -sections per animal, 80  $\mu\text{m}$  distance from each other, were stained using Oil Red-O (ORO; Sigma–Aldrich, USA) to measure atherosclerosis as previously described [19]. Throughout this study all measurements of images were carried out by a by an independent investigator unfamiliar with the experimental groups, using Qwin image analysis software (Leica Imaging Systems, UK). Lesion area was expressed as the means of the areas from analyzed sections. As another measure of the degree of atherosclerotic lesion formation, the whole aorta was delipidated, and TC and free cholesterol (FC) were determined as previously described [20]. Cholesteryl ester (CE) was calculated as the difference between the two measurements. The total protein content of the residual delipidated aortic tissue was determined using BCA kit (Pierce Ins., Rockford, IL, USA).

**Collagen content in the atherosclerotic plaque:** Collagen content was measured in the aortic root, where subsequent sections were stained with Picrosirius-red. Histomorphometry was performed using a digital image system (Qwin image analysis software; Leica Imaging Systems, UK), and collagen fibers were identified by their bright red (thicker fibers) or yellow (thinner fibers) appearance under circularly polarized light at 40 $\times$  magnification. The collagen volume fraction (CVF, %) was expressed as the percentage of bright area per total plaque area.

**Immunohistochemical analyses of the atherosclerotic lesions:** The immunohistochemical (IHC) analysis for ABCA1 and the macrophage contents were determined in subsequent sections to those



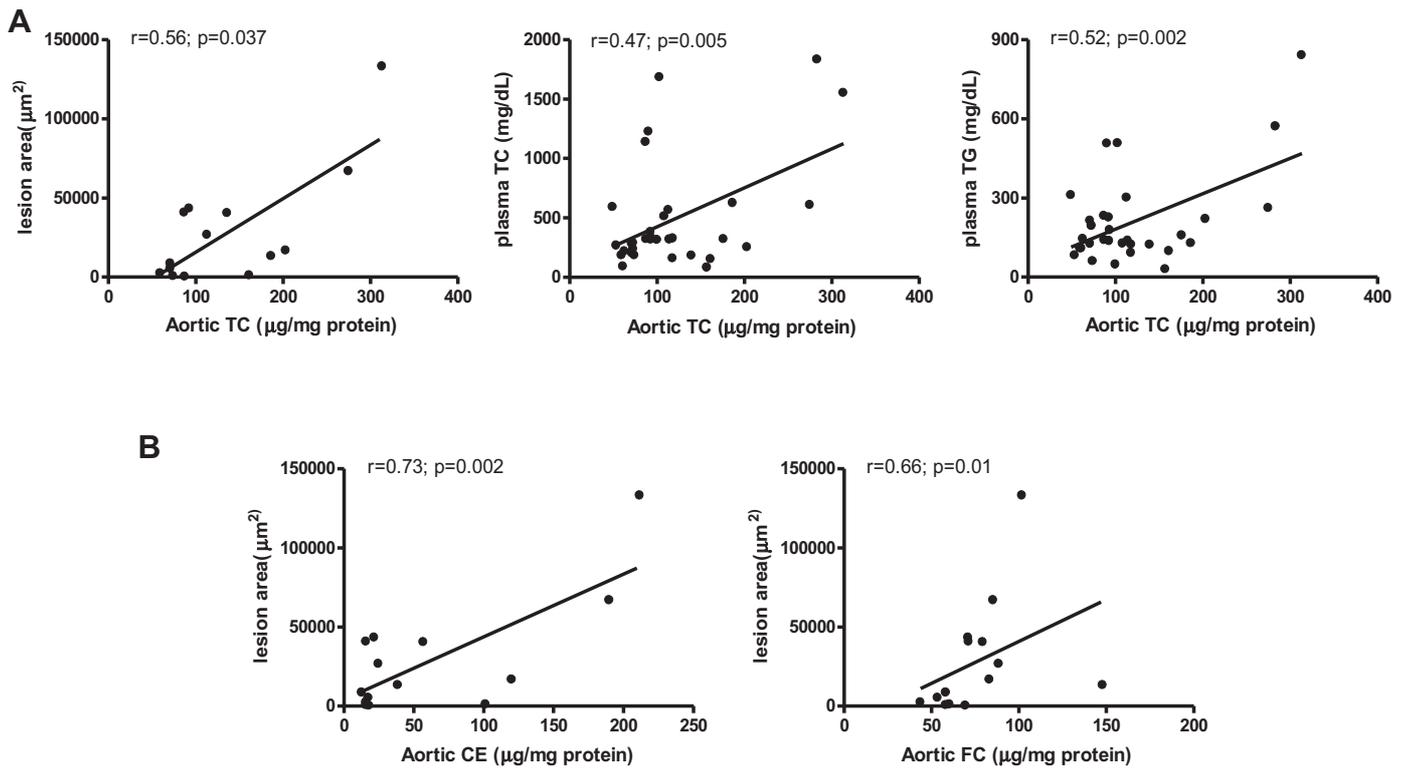
**Fig. 1.** Dietary fatty acids and the development of atherosclerosis. The atherosclerotic lesion area was determined in the aortas isolated from LDLr-KO mice fed a high fat diet for 16 weeks. Serial sections were analyzed for (A) lipid content using Oil Red-O stain; (B) macrophage infiltrate (anti-CD68); and (C) ABCA1 content using immunohistochemistry (anti-ABCA1). The following parameters were quantified: (D) the atherosclerotic lesion area ( $n = 5$ ); (E) macrophage infiltrate ( $n = 7$ ) and (F) ABCA1 content ( $n = 7$ ); (G) determination of the ABCA1: macrophage ratio of the atherosclerotic plaque; (H) aortic cholesterol content in whole aortas ( $n = 8-13$ ) isolated from LDLr-KO mice fed either a TRANS, SAFA or PUFA diet for 16 weeks; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . Data were checked for normality and transformation was performed prior to statistical analysis. One-way ANOVA followed by the *post-hoc* Newman–Keuls Multiple Comparison Test for pair-wise comparisons was performed. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM.

utilized for the atherosclerosis analysis so as to ensure the same arterial site. Briefly, sections were incubated overnight (4 °C) with primary antibodies recognizing ABCA1 (rabbit anti-mouse ABCA1, 1:500; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) or macrophages (rat anti-mouse CD68, 1:600; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), blocked for endogenous peroxidase, incubated with secondary antibodies conjugated with peroxidase (1:500; Abcam, MA, USA; and AbD Serotec, Raleigh, NC, USA) and detected with a DAB substrate kit (Vector Laboratories, CA, USA). The sections were counterstained with Carazzi's Hematoxylin. The stained (brown) areas were measured utilizing Qwin image analysis software (Leica Imaging Systems, UK). The area was expressed as the mean area of the sections for 6–7 animals per group. A negative control was established by omitting the primary antibodies.

For confocal microscopy, cryostat sections (4 µm) of the aortic root were blocked and simultaneously incubated with polyclonal rabbit anti-mouse ABCA1 (1:50, Novus Biologicals) and rat anti-mouse CD68 (1:400, AbD Serotec) in a dark chamber for 90 min. After washing, AlexaFluor® 633-conjugated goat anti-rabbit IgG

and AlexaFluor® 488-conjugated donkey anti-rat (Invitrogen) were utilized to detect ABCA1 and CD68, respectively, with a dual immunofluorescent staining. The nuclei were stained using DAPI (Sigma–Aldrich). Omission of the primary antibodies was used as the negative control. The sections were observed with a Zeiss LSM 510 Meta confocal laser-scanning microscope using the corresponding channel detector.

**Peritoneal macrophage culture and stimulation:** Peritoneal macrophages were harvested by peritoneal puncture, without adding any stimulant to induce macrophage migration to the peritoneal cavity, using sterile PBS, without EDTA, pH 7.4. Cells were cultured on a 24-mm multiwell plate in RPMI medium (Sigma–Aldrich) containing 10% BSA (Invitrogen), penicillin and streptomycin, and were maintained in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. After this period the cells were washed remaining only adhered macrophages in the plaque. Cells ( $0.5 \times 10^6$ /well) were stimulated with 1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 24 h, and inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) released into the culture medium were



**Fig. 2.** Correlations between (A) aortic total cholesterol (TC) with lesion area, plasma TC and plasma TG concentration: the aortic TC content was positively correlated with lesion area, plasma TC and plasma TG; (B) aortic cholesteryl ester (CE) and free cholesterol (FC) with lesion areas.

measured using a commercial ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

**Statistical analysis:** The data were checked for normality and appropriate transformation were performed when necessary, prior to statistical analysis. One-way ANOVA followed by the *post-hoc* Newman–Keuls Multiple Comparison Test for pair-wise comparisons was performed. The correlations were calculated using a Spearman Test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The data were analyzed with the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Untransformed data are presented in the figures, tables and text as the mean  $\pm$  SD or SEM.

### 3. Results

The dietary intake did not differ among the groups. However, animals on the TRANS diet gained significantly less weight during the 16 weeks period than the other groups (weight gain (g): TRANS:  $17.17 \pm 1.86$ , SAFA:  $19.26 \pm 3.24$  and PUFA:  $20.44 \pm 3.46$ ;  $p < 0.05$ ).

#### 3.1. Dietary fatty acids and the development of atherosclerosis

PUFA-fed mice presented the lowest amount of lipids in the arterial wall, intima macrophage infiltration and ABCA1 content compared to the SAFA and TRANS-fed mice (Fig. 1A–F).

The atherosclerotic plaque ABCA1: macrophage ratio for the PUFA-fed mice was lower than in the TRANS-fed mice but did not differ from the SAFA-fed mice (Fig. 1G).

Regarding the cholesterol content of the artery wall, TC was lower with PUFA feeding than with TRANS but did not differ from the SAFA feeding. Free cholesterol (FC) was lower in PUFA-fed mice compared to TRANS and SAFA groups; cholesteryl ester (CE) did not vary among the groups (Fig. 1H). The TC on the aorta was positively

correlated with lesion area ( $r = 0.56$ ,  $p = 0.037$ ), plasma TC ( $r = 0.47$ ,  $p = 0.005$ ), and plasma TG ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.002$ ); lesion area was positively correlated with CE and FC of the total aorta ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.002$  and  $r = 0.66$ ,  $p = 0.01$ , respectively) (Fig. 2).

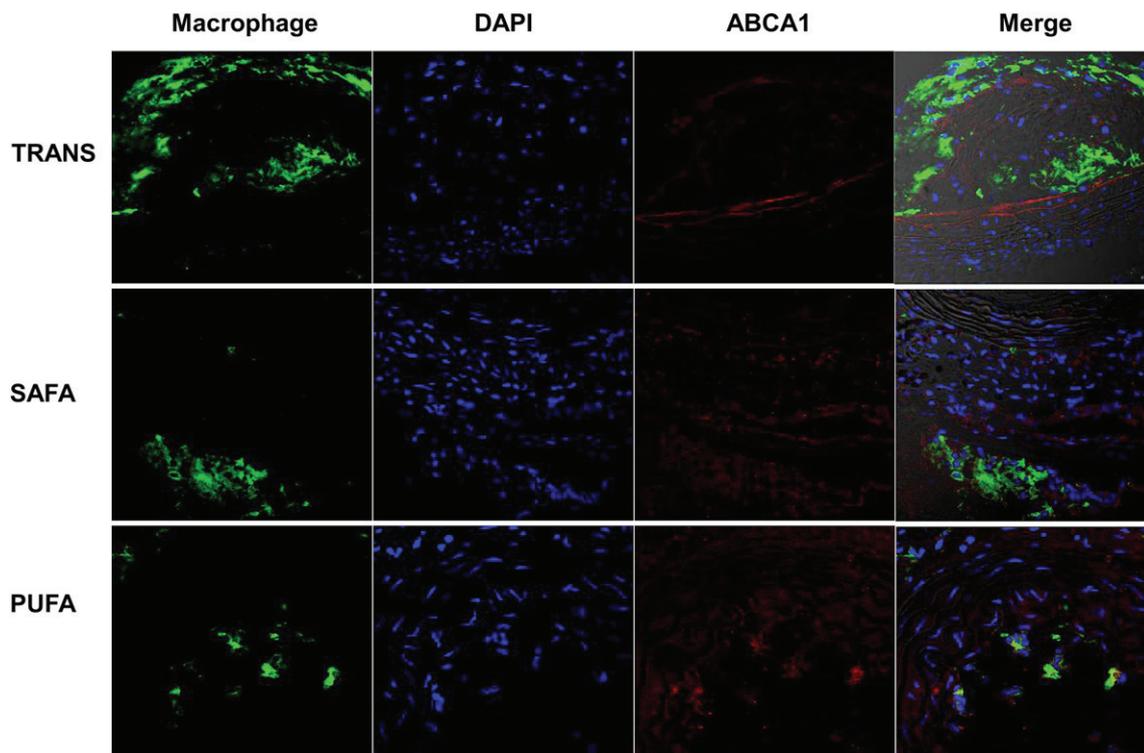
The liver expression of ABCA1 has a primordial role in HDL biogenesis [21] and consequently on the prevention of atherosclerosis [22]. However, in the present study, the intake of diets enriched with TRANS, SAFA or PUFA had similar effects on ABCA1 mRNA expression in the livers of the LDLr-KO mice (Supplemental Fig. 1).

#### 3.2. Localization of ABCA1 and macrophages on the atherosclerotic plaque

Immunohistochemical analyses suggested that ABCA1 and macrophage expression were found in the same region of the atherosclerotic plaque (Supplemental Fig. 2). However, the dual immunofluorescent staining (Fig. 3), in serial sections, did not show co-localization of macrophages and ABCA1 in the plaques. This suggested that although some expression of ABCA1 can be attributed to macrophages (CD68 positive cells), other cells types are likely responsible for the majority of the ABCA1 expression in the plaque.

#### 3.3. Plasma lipids and lipoprotein profile

The PUFA group had the lowest plasma TC and TG concentration compared to TRANS- and SAFA-fed mice. TRANS-fed mice developed hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia (Table 1). A greater atherogenic lipid profile was observed in the TRANS group because of the higher amount of cholesterol transported in non-HDL particles (94%), with 67% in VLDL and only 6% in HDL (Table 1). Moreover, the TRANS diet induced a higher VLDL-TG



**Fig. 3.** Co-localization of macrophage and ABCA1 on the atherosclerotic plaque. Dual immunofluorescent staining in serial sections did not show co-localization of ABCA1 (red) and macrophage (green) in the atherosclerotic plaques of LDLr-KO mice fed high fat diets enriched with TRANS, SAFA or PUFA for 16 weeks. DAPI (blue) ( $n = 3$ ).

concentration compared to the SAFA and PUFA diets and a higher HDL-TG concentration when compared to the PUFA diet.

Plasma TC and TG concentrations were positively correlated with the arterial macrophage infiltration (TC:  $r = 0.69$ ,  $p = 0.0004$ ; TG:  $r = 0.63$ ,  $p = 0.001$ ), ABCA1 content (TC:  $r = 0.70$ ,  $p = 0.0002$ ; TG:  $r = 0.61$ ,  $p = 0.002$ ) and atherosclerotic lesion area (TC:  $r = 0.77$ ,  $p = 0.001$ ; TG:  $r = 0.86$ ,  $p = 0.0001$ ). These results support the predominant role of plasma cholesterol on the development of atherosclerotic lesions associated with the different diets (Fig. 4).

**Table 1**

Plasma total cholesterol (TC), triglycerides (TG) concentrations (mmol/L) are listed, and the lipoprotein profiles are expressed as absolute concentration (mmol/L) and percent distributions. Data are from LDLr-KO mice fed a TRANS, SAFA or PUFA diet for 16 weeks.

|                    | TRANS                      | SAFA                       | PUFA                     |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| TC (mmol/L)        | 27.17 ± 11.01 <sup>a</sup> | 10.39 ± 3.29 <sup>b</sup>  | 4.92 ± 2.10 <sup>c</sup> |
| TG (mmol/L)        | 4.17 ± 1.40 <sup>a</sup>   | 1.81 ± 0.55 <sup>b</sup>   | 1.11 ± 0.57 <sup>c</sup> |
| VLDL-C (mmol/L)    | 18.16 ± 7.56 <sup>a</sup>  | 4.40 ± 3.13 <sup>b</sup>   | 1.27 ± 0.65 <sup>c</sup> |
| (%)                | (67 ± 7) <sup>a</sup>      | (41 ± 2) <sup>b</sup>      | (30 ± 2) <sup>c</sup>    |
| LDL-C (mmol/L)     | 7.59 ± 3.99 <sup>a</sup>   | 4.14 ± 1.97 <sup>b</sup>   | 2.36 ± 1.40 <sup>b</sup> |
| (%)                | (27 ± 7) <sup>b</sup>      | (40 ± 13) <sup>a</sup>     | (45 ± 16) <sup>a</sup>   |
| HDL-C (mmol/L)     | 1.40 ± 0.26 <sup>a</sup>   | 1.81 ± 0.70 <sup>a</sup>   | 1.30 ± 0.70 <sup>a</sup> |
| (%)                | (6 ± 3) <sup>c</sup>       | (19 ± 9) <sup>b</sup>      | (25 ± 9) <sup>a</sup>    |
| non-HDL-C (mmol/L) | 25.77 ± 11.03 <sup>a</sup> | 8.55 ± 3.5 <sup>b</sup>    | 3.63 ± 1.45 <sup>b</sup> |
| (%)                | (94 ± 3) <sup>a</sup>      | (80 ± 9) <sup>b</sup>      | (75 ± 9) <sup>b</sup>    |
| VLDL-TG (mmol/L)   | 3.34 ± 1.27 <sup>a</sup>   | 1.29 ± 0.41 <sup>b</sup>   | 0.82 ± 0.45 <sup>b</sup> |
| (%)                | (80 ± 8) <sup>a</sup>      | (74 ± 1) <sup>a</sup>      | (74 ± 5) <sup>a</sup>    |
| LDL-TG (mmol/L)    | 0.50 ± 0.18 <sup>b</sup>   | 0.31 ± 0.12 <sup>b</sup>   | 0.24 ± 0.12 <sup>b</sup> |
| (%)                | (12 ± 4) <sup>b</sup>      | (18 ± 9) <sup>a</sup>      | (22 ± 6) <sup>a</sup>    |
| HDL-TG (mmol/L)    | 0.33 ± 0.27 <sup>a</sup>   | 0.19 ± 0.24 <sup>a,b</sup> | 0.05 ± 0.03 <sup>b</sup> |
| (%)                | (8 ± 7) <sup>a</sup>       | (9 ± 9) <sup>a</sup>       | (5 ± 3) <sup>a</sup>     |

a > b > c: values within the same row with different letters indicate a significantly difference ( $p < 0.05$ ). Cholesterol and TG percent distribution was calculated as the area under the peaks of the FPLC profiles of individual plasma samples and then converted to absolute numbers. Data are shown as the mean values ± SD,  $n = 7-9$ .

#### 3.4. Plasma cytokines and the inflammatory response

No difference was observed in IL-6 concentration amongst the groups (Fig. 5 A). Plasma TNF- $\alpha$  concentration on PUFA- and TRANS-fed mice was higher compared to SAFA-fed mice after the 16-week intake period (Fig. 5B). Regarding the macrophage inflammatory response to LPS, PUFA- and TRANS-fed mice presented higher concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  compared to SAFA, confirming the plasma findings. Compared to TRANS and SAFA groups, the PUFA group showed the lowest amount of the anti-inflammatory marker IL-10. The PUFA diet was rich in  $\omega$ -6 fatty acids, which may explain the pro-inflammatory response observed (Fig. 5C).

#### 3.5. Vulnerability of the atherosclerotic plaque

TRANS- and SAFA-fed mice presented a higher amount of collagen on the atherosclerotic plaques compared to PUFA-fed mice, however, as expected, in this group the collagen content was nearly undetectable, because they presented the lowest degree of atherosclerosis. Moreover, the atherosclerotic lesions in mice fed a TRANS or a SAFA diet had a thin fibrous cap with a necrotic core characterizing unstable plaques (Fig. 6).

## 4. Discussion

This study demonstrates for the first time that the intake of a high-fat diet enriched with  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids prevented the development of atherosclerotic lesions even in a pro-inflammatory condition. However, though showing a similar effect on the inflammatory profile, TRANS-fat led to severe atherogenesis. These results reinforce the preponderance of plasma lipid concentration on the atherosclerotic development [23]. The PUFA

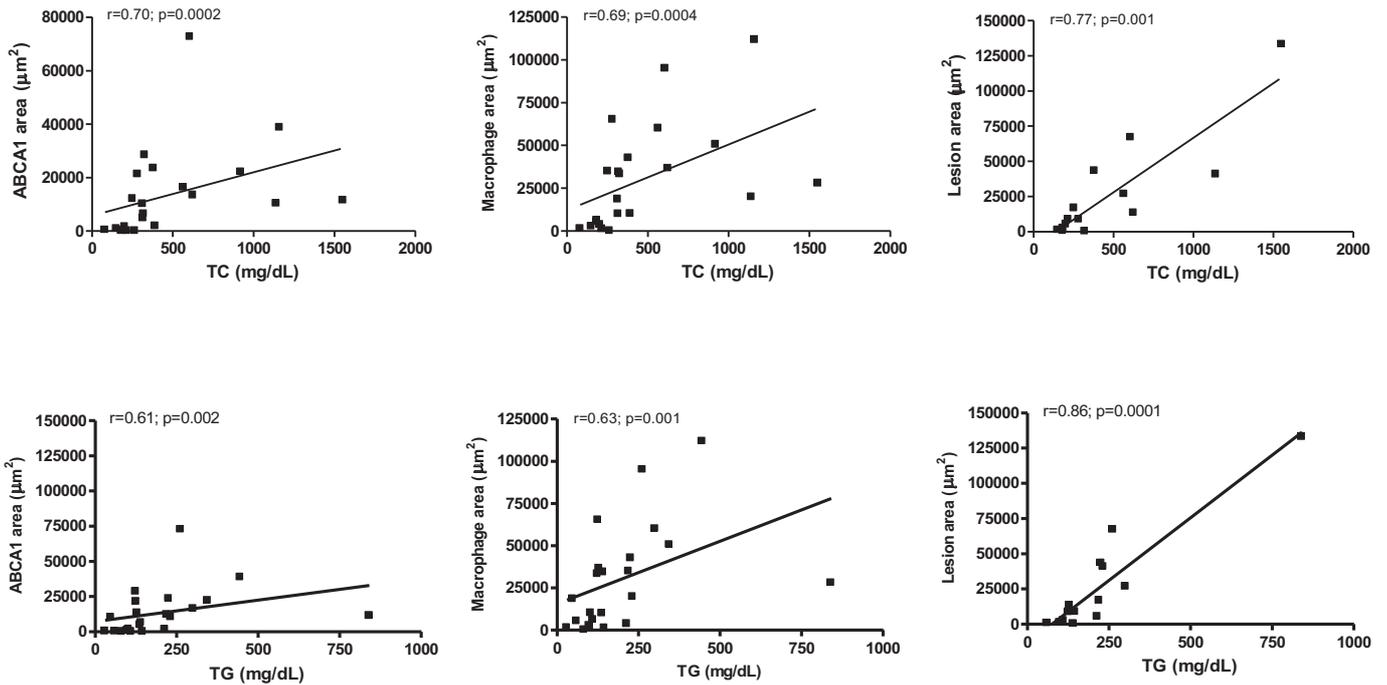


Fig. 4. Correlations between plasma lipid concentrations (TC and TG) and aortic root ABCA1, and macrophage infiltration and lesion areas. Plasma TC and TG concentrations were positively correlated with aortic ABCA1 content, macrophage infiltration and, atherosclerotic lesion area.

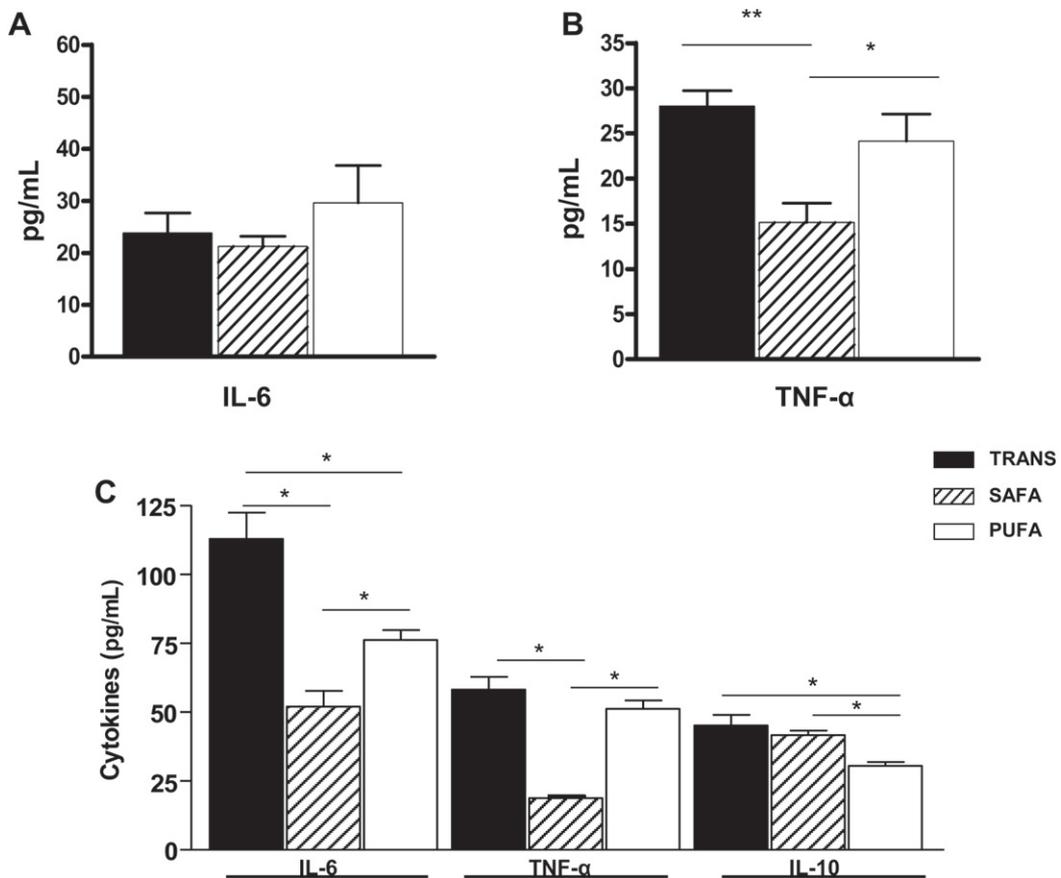
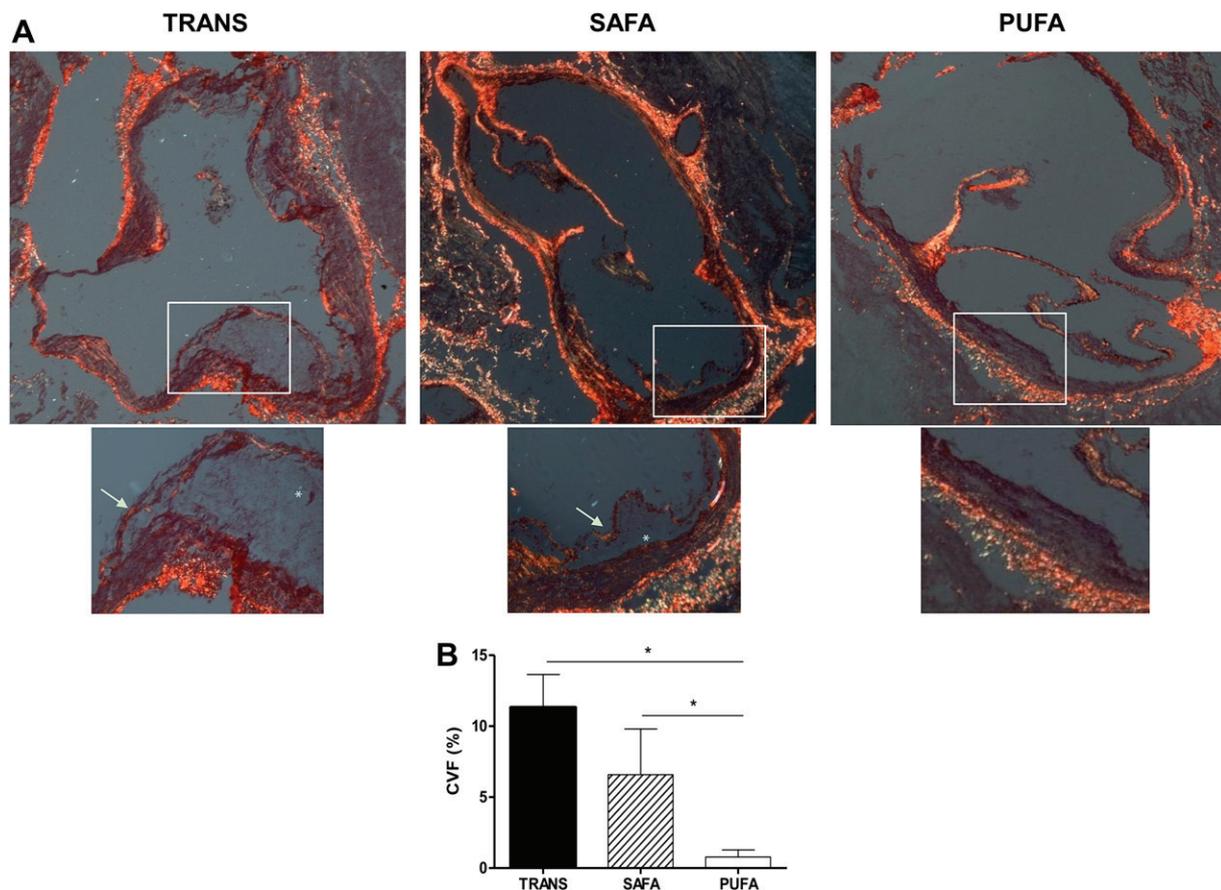


Fig. 5. Plasma inflammatory profile and macrophage inflammatory response. Peritoneal macrophages isolated from mice fed one of the three fatty diets for 16 weeks, and cultured in RPMI medium for 48 h. After this period the cells were washed remaining only adhered macrophages in the plaque. Cells ( $0.5 \times 10^6$ /well) were stimulated with 1 μg/mL lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*, for 24 h, and inflammatory factors (TNF-α, IL-6 and IL-10) released into the culture medium were measured using a commercial ELISA kit. (A) plasma IL-6 (n = 4); (B) plasma TNF-α (n = 4); (C) culture medium cytokines (n = 4).



**Fig. 6.** Collagen content of the atherosclerotic lesion. Atherosclerotic plaque collagen content in LDLr-KO mice fed high fat diets enriched with TRANS, SAFA or PUFA fatty acids for 16 weeks was analyzed. (A) Picrosirius-red (PSR)-stained sections show the presence of a fibrous cap (arrows) with depleted collagen contents and necrotic cores (\*) indicative of an unstable plaque. (B) Quantification of the collagen volume fraction (CVF) expressed as a percentage (%) of the total plaque area ( $n = 5$ ).

group presented a higher plasma TNF- $\alpha$  concentration as compared to SAFA-fed mice, but similar to TRANS group. In accordance to plasma findings, peritoneal macrophages from animals fed PUFA and TRANS diets elicited higher secretions of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in the medium compared to animals on a SAFA diet. The anti-inflammatory mediator, IL-10, was lower in the PUFA group compared to TRANS and SAFA groups. Even with an inflammatory response similar to the TRANS group, the PUFA group presented the lowest degree of atherosclerosis, arterial lipid content, macrophage infiltration and ABCA1 content as compared to TRANS and SAFA groups.

This study was performed in LDLr-KO mice which are moderately hypercholesterolemic and widely used to investigate the development of atherosclerosis. When submitted to a high fat diet, these animals become hypercholesterolemic and develop atherosclerosis, even in the absence of cholesterol in the diet. In a recent study [24], the plasma cholesterol concentration observed in LDLr-KO mice, submitted to a high cholesterol diet was similar to our results in TRANS fed-mice. This indicates that a high fat diet is sufficient to elevate plasma cholesterol concentration and bring about atherosclerotic lesions. In another study [25], mice submitted to a normal cholesterol high fat diet developed a more severe hypercholesterolemia and larger lesions in the aortic origin cross sections than those submitted to a normal fat high cholesterol diet. Moreover the addition of cholesterol to the diet would blunt the biological effect of each fatty acid on the development of atherosclerosis.

Our data corroborate the results of epidemiological trials in which the cardiovascular endpoint benefits of polyunsaturated

fatty acids are demonstrated [26,27]. These data reinforce the notion that some unfavorable actions of these fatty acids should be cautiously interpreted. Regarding inflammation,  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids are known for their pro-inflammatory capacity [28]. Arachidonic acid is a substrate for eicosanoid synthesis which is enrolled on the control of intensity and duration of inflammatory responses [2]. Dietary fatty acids are incorporated into the plasma membranes including on inflammatory cells, and therefore can modulate their responses [2].

Despite the pro-inflammatory effect, the PUFA group presented the lowest plasma TG and TC concentrations compared to the TRANS and SAFA groups. Moreover, in the PUFA group 25% of total plasma cholesterol is carried by HDL, compared with 19% on SAFA and 6% on TRANS group, as shown in the lipid profile (Table 1). This suggests that HDL is efficiently delivering the cholesterol to the liver so it can be excreted in to the bile. The improvement in the lipid profile due to PUFA administration supplanted the detrimental effect that inflammation might have caused.

Dietary fatty acids modulate the composition of cell membrane, which resembles the fatty acids on the diet. This composition will result in a difference in membrane fluidity that can interfere on proteins activity and cell signalization. Another effect of dietary fatty acids is related to Toll-Like Receptors (TLR). TLR 4, for example, binds lipopolysaccharide (LPS) and can also recognize molecules that are not derived from bacteria, such as heat shock protein 60, fibronectin, fibrinogen and certain types of fatty acids. Saturated fatty acids are able to induce secretion of inflammatory markers in a manner analogous to LPS [16]. Animals and humans can develop endotoxin tolerance to LPS after chronic exposition [29]. Similarly,

saturated fatty acids might have stimulated TLR4 during the feeding period, and thus peritoneal macrophages when exposed to LPS treatment have a lower pro-inflammatory response. At this time, this hypothesis cannot be supported by our data. Another interesting point that should be further investigated is the presence of T cells and cytokines in the plaque, which would give a better characterization of the inflammatory status in the lesion. Unfortunately we did not have sufficient material to answer this point. The TRANS diet induced severe hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, probably as a result of a higher synthesis and secretion of apoB-lipoproteins in this group. It has been shown that *trans* fatty acids increase the liver lipogenic capacity [18]. Moreover, the TRANS diet presented a pro-atherogenic profile, as confirmed in other studies [1,3] with ApoB particles largely enriched with cholesterol. Like all industrialized hydrogenated fats, the TRANS diet was also rich in stearic acid. However, the results obtained in this study group can be attributed to the *trans* fatty acid content because in the liver, stearic fatty acid is rapidly converted to oleic acid by the action of stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) [30].

Hepatic ABCA1 content has a major impact on the development of atherosclerosis due to its role in HDL formation; therefore, the reduction of hepatic ABCA1 can contribute to lesion progression. It has been demonstrated that unsaturated fatty acids lowered the ABCA1 protein level by increasing its degradation rate, an action that has been noted by some authors to be undesirable [11,12]. Although the biological function of this down-regulation remains unclear, several clinical and epidemiological studies have highlighted the beneficial effects of unsaturated fatty acid consumption [26,27]. In the present study, liver ABCA1 mRNA expression did not differ among the groups, suggesting that the dietary fatty acids exerted similar modulation on the ABCA1 transcription level. According to the present study, whichever mechanism is involved in the increased degradation of ABCA1 by polyunsaturated fatty acids in the *in vitro* studies, it does not impact in cardiovascular risk.

A well design study, performed in mouse macrophage or human monocyte-derived macrophage, demonstrated that elaidic acid reduced the ABCA1-mediated cholesterol efflux, likewise palmitic acid [31]. This effect was not at the ABCA1 transcription, stability or protein level, once the ABCA1 mRNA expression and cell-surface protein content were not altered. Moreover, the authors suggest that these results are likely due a decrease of membrane fluidity [31]. These results help to explain why, despite the large ABCA1 content on the atherosclerotic lesion, TRANS and SAT groups were not able to prevent the lesion progression.

Another novel finding presented here is that ABCA1 and macrophages did not co-localize in the atherosclerotic lesion, as clearly demonstrated by confocal microscopy. These results indicate that besides macrophages, different cell types appear to be involved in ABCA1 plaque expression. Smooth muscle cells (SMC) migrate from the media into the intimal layer in response to cytokines and inflammatory mediators, which also induce their proliferation and change from a quiescent contractile state to an active synthetic condition [32]. Under a cholesterol loading condition, SMCs are converted to macrophage-like cells and acquire macrophage function by increasing the expression of macrophage-related genes and by losing markers of the SMC phenotype [33]. Intima phenotype-SMCs present lower ABCA1 expression, apoAI binding, HDL formation and also an impaired apoAI-mediated cholesterol efflux [34]. We are currently investigating the contribution of SMCs on the atherosclerosis development and its ABCA1 expression. Although this answer might be very important, at this point these results would not modify our conclusions.

In the current study, the collagen content of the PUFA-fed mice was barely discernible. The TRANS- and SAFA-fed mice developed atheroma with a thin fibrous cap shielding a necrotic core,

characterizing unstable plaques that are more prone to disruption and frequently precede thrombosis-mediated events [35].

It has been shown that ABCA1 expression in macrophages located in the lesion area may exert a secondary role against the progression of atherosclerosis when compared to the severity of hyperlipidemia [22]. Our results corroborate these findings, and additionally, we demonstrated that polyunsaturated fatty acids diminished the ABCA1 content in the atherosclerotic lesion. Moreover, in the PUFA group, this effect has been associated with an inflammatory profile and the lowest CT and TG concentrations that culminate in atherosclerotic prevention. However, despite a pro-inflammatory status similar to PUFA feeding, *trans* fatty acid consumption induces severe hyperlipidemia, which had a remarkable atherogenic impact.

In conclusion, this work reinforces the “Lipid Hypothesis” [23], where the plasma cholesterol plays a crucial role in the development of atherosclerosis even in the presence of an inflammatory profile as observed in the PUFA group.

### Acknowledgments

The authors' responsibilities were as follows: RMM and AMPL contributed to the study concept and design, conducted the experiments, data analyses, interpretation of the results and writing of the manuscript; ERN and ECRQ contributed to the study design, interpretation of the results and the writing of the manuscript; PMC, MKK, VSN, FDF, MSA, RPAB, AML and FGS conducted the experiments and data analyses; SC contributed by providing animals. All authors reviewed the final manuscript, and none of the authors had a financial or personal conflict of interest.

The authors would like to thank the technical assistance of Denise F. Barbeiro from the Department of Medicine Division of Emergency Medicine, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo (LIM 51), and Tatiana M. Venâncio from the Endocrinology and Metabolism Division, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, Lipids Laboratory (LIM 10).

The authors are in debt with Dr. Francisco R. Laurindo, from the Vascular Biology Laboratory, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, for the important contributions on the design of this study and also for the Zeiss LSM 510 Meta confocal laser-scanning microscope utilization and technical support.

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP #06/55516-8). The fats were provided by UNILEVER (SP, Brazil) and analyzed by gas-liquid chromatography by Cognis Brasil LTDA.

### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.059>.

### References

- [1] Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1146–55.
- [2] Calder PC. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* 2011;668:S50–8.
- [3] Bassett CM, McCullough RS, Edel AL, et al. Trans-fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. *Metabolism* 2009;58:1802–8.
- [4] Seo T, Qi K, Chang C, et al. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest* 2005;115:2214–22.
- [5] Rioux V, Legrand P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:752–8.

- [6] Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009;50:S189–94.
- [7] Woollett LA, Spady DK, Dietschy JM. Regulatory effects of the saturated fatty acids 6:0 through 18:0 on hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. *J Clin Invest* 1992;89:1133–41.
- [8] Matthan NR, Welty FK, Barrett PH, et al. Dietary hydrogenated fat increases high-density lipoprotein apoA-I catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1092–7.
- [9] Gatto LM, Sullivan DR, Samman S. Postprandial effects of dietary trans fatty acids on apolipoprotein(a) and cholesteryl ester transfer. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1119–24.
- [10] Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res* 2006;47:2433–43.
- [11] Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* 2002;277:5692–7.
- [12] Hu YW, Ma X, Li XX, et al. Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis* 2009;204:e35–43.
- [13] Buonacorso V, Nakandakare ER, Nunes VS, Passarelli M, Quintão EC, Lottenberg AM. Macrophage cholesterol efflux elicited by human total plasma and by HDL subfractions is not affected by different types of dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1270–7.
- [14] Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab* 2009;55:123–39.
- [15] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95.
- [16] Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276:16683–9.
- [17] Mozaffarian D, Rimm EB, King IB, Lawler RL, McDonald GB, Levy WC. Trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1521–5.
- [18] Machado RM, Stefano JT, Oliveira CP, et al. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J Nutr* 2010;140:1127–32.
- [19] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68:231–40.
- [20] Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, Shah R, Wilson MD. Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDLreceptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1818–27.
- [21] Ragozin S, Niemeier A, Laatsch A, et al. Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1433–8.
- [22] Brunham LR, Singaraja RR, Duong M, et al. Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:548–54.
- [23] Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res* 2006;47:1339–51.
- [24] Penumetcha M, Song M, Merchant N, Parthasarathy S. Pretreatment with n-6 PUFA protects against subsequent high fat diet induced atherosclerosis – potential role of oxidative stress-induced antioxidant defense. *Atherosclerosis* 2012;220:53–8.
- [25] Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:878–85.
- [26] Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:585–94.
- [27] Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 2008;197:12–24.
- [28] Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL, Lichtenstein AH. Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis* 2009;204:147–55.
- [29] Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 2002 Jul;4(9):903–14.
- [30] Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med* 1988;318:1244–8.
- [31] Fournier N, Attia N, Rousseau-Ralliard D, et al. Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated cholesterol efflux from mouse and human macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:303–12.
- [32] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 2007;39:86–93.
- [33] Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13531–6.
- [34] Choi HY, Rahmani M, Wong BW, et al. ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation* 2009;119:3223–31.
- [35] Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657–71.

## APROVAÇÃO

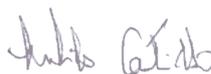
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23. .06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa **nº 670/06**, intitulado: **“Efeito dos ácidos graxos saturados, poliinsaturados e trans sobre o conteúdo de ABCA1 e no desenvolvimento de lesão aterosclerótica na artéria aorta de camundongos com ablação gênica do receptor LDL”** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra “c”)

Pesquisador (a) Responsável: **PROFA. DRA. ANA MARIA PITA LOTTENBERG**

Pesquisador (a) Executante: **SRA. ROBERTA MARCONDES MACHADO FIGUEIREDO**

CAPPesq, 23 de novembro de 2006.



**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa