

EDENIL COSTA AGUILAR

Suplementação oral com Butirato de Sódio reduz o desenvolvimento da Aterosclerose e aumenta a estabilidade da placa em camundongos ApoE^{-/-}

BELO HORIZONTE

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2014

EDENIL COSTA AGUILAR

Suplementação oral com Butirato de Sódio reduz o desenvolvimento da Aterosclerose e aumenta a estabilidade da placa em camundongos ApoE-/-

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

BELO HORIZONTE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2014



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE EDENIL COSTA AGUILAR. Aos dezoito dias do mês de fevereiro de 2014 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Suplementação oral com Butirato de Sódio reduz o desenvolvimento da Aterosclerose e aumenta a estabilidade da placa em camundongos ApoE -/-", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof.^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Patrícia Torres Bozza (Fiocruz - Rio de Janeiro/RJ), aprovado; Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (Universidade Federal de Viçosa), aprovado; Dra. Virgínia Soares Lemos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Denise Carmona Cara Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2014.

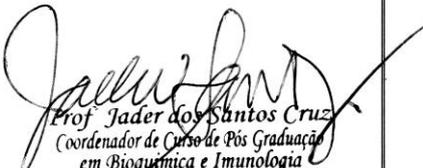

 Dra. Patrícia Torres Bozza (Fiocruz - Rio de Janeiro/RJ)


 Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (Universidade Federal de Viçosa)


 Dra. Virgínia Soares Lemos (UFMG)


 Dr. Denise Carmona Cara Machado (UFMG)


 Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

“... E a ciência se multiplicará”.

Daniel 12:4

Aos meus amados pais, Dalvany A. Aguilár e Adenito da C. Aguilár,
à minha querida irmã Edinalva A. Aguilár, de um amor singular,
e a minha *amadíssima* sobrinha Débora A. Fagundes,
dedico.

Agradecimentos

À minha orientadora professora Jacqueline I. Alvarez Leite, que me acolheu desde o mestrado. Sou grato pelo grande apoio e direcionamento, pelos muitos ensinamentos e pela paciência e compreensão em minhas muitas limitações.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia, pelos ensinamentos na singular disciplina Bases Moleculares da Estrutura e Função da Célula. E aos funcionários, pelo serviço prestado.

À Maria Helena, Rafael e Letícia, pelo essencial cuidado com os animais utilizados nos experimentos.

À minha grande amiga e colaboradora Alda. Foi como uma irmã nessa trajetória. Uma pessoa companheira e compreensiva comigo.

À minha *super* amiga e colaboradora Lílian. Ela é *super* não somente *na palavra*, mas na pessoa que é (ela e os labinianos me entendem).

À Lana e Lorryne que prestaram sua essencial ajuda em meus experimentos finais. E suscitou-se uma grande amizade, e que será duradoura.

À Analina, de colaboração mútua à amizade. “Você é dez!”.

A duas colaboradoras que contribuíram preciosamente neste trabalho: Juliana e Joseane, pessoas inteligentíssimas e solícitas.

Ao Luciano Capettini pela especial colaboração que enriqueceu grandiosamente o trabalho, pelos ensinamentos e pela paciência e compreensão.

À Bárbara, uma colaboradora fundamental em meus experimentos com macrófagos e uma pessoa muito competente e solícita.

Às duas ICs Carol e Ana Carina, cujas mãos destras me prestaram grande ajuda, especialmente no cuidado com os animais. Ao Marllon, que por curto espaço de tempo me acompanhou em alguns experimentos, mas hoje é um grande amigo e o será por longos anos. Também ao Renan pelos cuidados finais com meus animais.

À Eneida, nossa “madrinha” que sempre proveu o socorro em diversos momentos, e nasceu uma grande amizade.

Aos grandes amigos do LABiN, em especial à Fabiola e Solange, pelo companheirismo e pelas diversas demonstrações de amizade. À Aline, Paola, Rachel, Gisele e Luciana pelo apoio e torcida por mim. À labinianos que sempre serão inesquecíveis Rafael (grande Rafa), Marco, Tati, Ceci e Talita, essas três moram num lugar especial em meu coração. À Juliana, alguém que tem um espírito investigativo inspirador. À Sabrina e Dani, pessoas de palavras sábias e agradáveis, e à Maísa, minha conterrânea.

À amiga Poly, nossa polivalente que cuida com tanto zelo dos nossos materiais e é uma pessoa muito especial por sua simplicidade e grandeza de coração.

À secretária Celise, pelo auxílio em questões do departamento.

Aos laboratórios deste e de outros departamentos que abriram as portas, sendo fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Jamil, pela sua competência e prestatividade. Sempre tão disposto a ajudar, mesmo com suas “pegadinhas”.

Às instituições financiadoras FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

À minha família, que é muito especial para mim e, embora longe, está sempre perto, dentro do meu coração. Minha mãe e meu pai que exercem um amor incondicional e minha irmã que é sempre tão amiga e fraternalmente amorosa.

Agradeço especialmente Àquele que é o responsável por tudo acima alcançado: Deus.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	XI
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Figuras.....	XV
Resumo	XIX
Abstract	XXI
1- INTRODUÇÃO.....	23
2- REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1- Aterosclerose	25
2.2- Butirato	30
2.2.1- Absorção do butirato: MCT1	31
2.2.2- Efeito do butirato mediado por GPR	33
2.2.3- Propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do butirato	34
2.2.4- Butirato e sensibilidade à insulina	38
2.2.5- Butirato inibe HDAC	40
2.3- Metabolismo lipídico e aterosclerose	41
2.4- Associação da resistência à insulina e Diabetes com a aterogênese....	43
2.5- Estresse oxidativo.....	44
I- Espécies Reativas de Oxigênio.....	44
II- Danos das ROS ao organismo.....	45
III- Estresse oxidativo e aterosclerose	45
IV- Sistema antioxidante.....	48
2.6- Apoproteína E (apoE) e Modelo murino de aterosclerose	49
3- Justificativa.....	52

4- Objetivos	53
4.1- Objetivo geral.....	53
4.2- Objetivos específicos	53
5- Materiais e Métodos	55
5.1- Animais e grupos experimentais	55
5.2- Preparo das dietas	56
5.3- Verificação do consumo da dieta	57
5.4- Avaliação da variação ponderal	57
5.5- Verificação de possíveis alterações hepáticas	57
5.6- Avaliação do perfil lipídico sérico	58
5.7- Avaliação da homeostase da glicose	58
5.8- Contagem total e diferencial de leucócitos	59
5.9- Avaliação da aterosclerose	60
5.9.1- <i>Percentual da aorta acometida por lesão aterosclerótica</i>	60
5.9.2- <i>Lesões ateroscleróticas na válvula aórtica</i>	61
5.9.3- <i>Avaliação da deposição de colágeno e presença de MMP-2 na válvula aórtica</i> ..	62
5.9.4- <i>Avaliação do infiltrado de macrófagos (MOMA), presença de moléculas quimiotáticas para monócitos (CCL2) e moléculas de adesão VCAM-1 na válvula aórtica</i>	62
5.10- Avaliação da peroxidação lipídica e atividade de SOD e Catalase hepática	63
5.10.1- <i>Peroxidação lipídica</i>	64
A- <i>Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS</i>	64
B- <i>Dosagem de hidroperóxidos</i>	65
5.10.2- <i>Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes</i>	67
A- <i>Determinação da atividade de superóxido dismutase</i>	67
B- <i>Determinação da atividade de catalase</i>	67
5.11- Avaliação da produção sérica de autoanticorpos anti-LDL oxidada	68

I- Separação da LDL.....	68
II- Oxidação da LDL.....	69
III- Ensaio de ELISA para detecção de IgG anti-LDLox.....	69
5.12- Avaliação <i>ex vivo</i> da suplementação com butirato na produção de ROS por macrófagos peritoneais.....	70
5.13- Avaliação da inflamação <i>in vitro</i>	71
I- Cultura de células.....	71
A- Distribuição das células.....	72
B- Pré-incubação com butirato e estímulo.....	72
C- Avaliação da expressão de CCL2, VCAM-1 e CD36 em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato.....	72
D- Determinação da secreção de citocinas por células EA.hy926 pré-incubadas com butirato.....	73
E- Expressão proteica de NF- κ B e I κ B em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato.....	74
F- Atividade de NF- κ B em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato.....	75
II- Cultura de macrófagos peritoneais.....	76
A- Avaliação da expressão de CD36 e captação de LDLox em macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato.....	76
B- Avaliação da produção de óxido nítrico e expressão de iNOS em macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato.....	76
5.14- Avaliação do estresse oxidativo <i>in vitro</i>	77
A- Detecção da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato.....	77
B- Avaliação da expressão da NADPH oxidase em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato.....	77

C- Avaliação da expressão de SOD e Catalase em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato	78
5.15- Métodos estatísticos de tratamento dos dados	78
6- Resultados	80
6.1- Consumo alimentar, peso corporal e avaliação de alterações hepáticas	80
6.2- Metabolismo lipídico e homeostase da glicose	81
6.2.1- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo.....	81
6.2.2- Tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina.....	82
6.3- Contagem total e diferencial de leucócitos	83
6.4- Avaliação da aterosclerose	84
6.4.1- Medida da lesão aterosclerótica na aorta e válvula aortica	84
6.4.2- Análise qualitativa da lesão aterosclerótica.....	85
6.4.3- Estresse oxidativo na válvula aórtica.....	88
6.5- Avaliação do estresse oxidativo sistêmico	89
6.5.1- Peroxidação lipídica hepática.....	89
6.5.2- Atividade de catalase hepática	89
6.5.3- Produção de autoanticorpos anti-LDLox.....	90
6.5.4- Produção de ROS por macrófagos peritoneais ex vivo.....	91
6.6- Avaliação da inflamação <i>in vitro</i>	91
6.6.1- Expressão de CCL2 e VCAM-1 em células EA.hy926 estimuladas com LDLox..	92
6.6.2- Expressão de CD36 em células EA.hy926 estimuladas com LDLox.....	93
6.6.3- Citocinas pró-inflamatórias e IL-10 no sobrenadante da cultura celular.....	93
6.6.4- Expressão de CD36 e a captação de LDLox em macrófagos peritoneais	94
6.6.5- Produção de óxido nítrico e a expressão de iNOS em macrófagos peritoneais ..	96
6.6.6- Atividade do NF-κB em células endoteliais.....	97

6.7- Avaliação do estresse oxidativo <i>in vitro</i>	98
6.7.1- Produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em macrófagos.....	99
6.7.2- Expressão de NADPH oxidase-p22phox em células endoteliais EA.hy926.....	100
6.7.3- Expressão de SOD1 e catalase em células EA.hy926.....	101
7- DISCUSSÃO	102
8- CONCLUSÃO	115
9- REFERÊNCIAS:	116
10- ANEXO.....	131
10.1- Comprovante de publicação	131

Lista de abreviaturas e siglas

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{mol/g}$	Micromol por grama
$\mu\text{mol/L}$	Micromol por litro
μM	Micro molar
AIN-93M	American Institute of Nutrition-93 Maintain
apo	Apoproteínas
<i>ApoE</i> ^{-/-}	Deficiente na apoproteína E
BHT	Hidroxitolueno butilado
°C	Grau centigrade
CCL2	Molécula quimiotática para monócito
CD36	Cluster of Differentiation
CEMEL	Centro de Microscopia Eletrônica
CETEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CT	Colesterol total
Cu_2^+	Íon cuproso
CuCl_2	Cloreto de cobre
DAPI	4,6-diamidine-2-phenylindole, dihydrochloride
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DCFH	2,7-dichlorodihydrofluorescein
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EA.hy926	Células endoteliais da veia umbilical humana
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
FFA	Receptor de ácidos graxos
FOX	Ferrous oxidation in xylenol orange

Gama GT	Gama glutamil transpeptidase
GPR	Receptores acoplados à proteína G
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
HDAC	Histonas desacetilase
HDL-c	HDL-colesterol
HUVEC	Células endoteliais umbilicais humanas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfurico
ICAM	Molécula-1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma de peso
MDA	Malondialdeído
MCP1	Moléculas quimiotáticas para monócitos
MCT1	Transportador de monocarboxilado-1
MMP2	Metaloproteinase 2 de matriz extracelular
MnSOD	Superóxido dismutase mitocondrial
MOMA	Monócitos/macrófagos
MTT	brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Fator de transcrição nuclear–kappa B
n-HDL	Colesterol Não-HDL
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PMN	Células polimorfonucleares

PPAR- α	receptor- α ativado por proliferador de peroxissomas
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
QM	Quilomícrons
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minute
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SOD	Superóxido dismutase
SR-A	Scavenger receptor – A
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TPP	Trifenilfostina
TSI	Teste de Sensibilidade à insulina
TTOG	Teste de Tolerância Oral à Glicose
U/mg	Unidades por miligrama
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula-1 de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VSMC	Células musculares lisas

Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição das dietas ofertadas aos animais, baseadas na dieta padrão (AIN-93M), controle ou suplementada com 1% de butirato de sódio	56
Tabela 2- Consumo alimentar, peso inicial, peso final, ganho de peso e gama GT dos animais ApoE ^{-/-} submetidos a dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas	80
Tabela 3- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo dos animais ApoE ^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas.....	82
Tabela 4- Leucograma sanguíneo dos animais apoE ^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. n=8/7.	84

Lista de Figuras

Figura 1- Formação da aterosclerose.....	27
Figura 2- Absorção de função do butirato.....	32
Figura 3 - Mimetismo molecular entre epítomos da LDL oxidada, célula apoptótica e fosforilcolina (PC – Phosphorylcholine) de patógenos.....	46
Figura 4- Desenho experimental.	55
Figura 5- Fórmula molecular do aduto formado na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído na técnica de TBARS. Sua coloração róseo-alaranjada é detectável espectrofotometricamente a 535nm.	64
Figura 6- Evolução ponderal dos animais ApoE ^{-/-} submetidos a dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas (n= 8/7).....	81
Figura 7- Teste de tolerância oral à glicose (TTOG - A) e Teste de sensibilidade à insulina (TSI- B) dos animais <i>apoE^{-/-}</i> submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Área sob a curva do TSI (C). n=7. *Diferença estatística (p<0,05, teste t).....	83
Figura 8- Desenvolvimento da aterosclerose em animais <i>apoE^{-/-}</i> submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. (A) Aortas contendo lesões ateroscleróticas coradas com Sudan IV. (B) Representação gráfica da área de lesão na aorta. (C) Histologia da válvula aórtica mostrando a área de lesão aterosclerótica (setas). Cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina: aumento de 100x. (D) Gráfico da área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica. Os valores nos gráficos são apresentados como média ± Erro padrão (n=7/6). *Diferença estatística (p<0,05, teste t).....	85
Figura 9- Deposição de colágeno (A) e presença de metaloproteinase 2 de matriz (MMP2 - B) na válvula aórtica dos animais <i>apoE^{-/-}</i> submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Representação gráfica dos	

valores de intensidade de fluorescência apresentados como média \pm Erro padrão (n=5/6). As setas indicam as lesões onde pode-se observar a intensidade de fluorescência. *Diferença estatística ($p < 0,05$, test t).....86

Figura 10- Infiltrado de monócitos/macrófagos (MOMA - A), moléculas quimiotáticas para monócitos CCL2 (B) e de adesão VCAM-1 (C) na válvula aórtica dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Representação gráfica dos valores de intensidade de fluorescência apresentados como média \pm Erro padrão (n=5/6). As setas indicam as lesões onde pode-se observar a intensidade de fluorescência. *Diferença estatística ($p < 0,05$, test t).....87

Figura 11- Produção de superóxido (DHE - A) e nitrotirosina na válvula aórtica dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Representação gráfica dos valores de intensidade de fluorescência apresentados como média \pm Erro padrão (n=4). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t). IF: intensidade de fluorescência.88

Figura 12- Peroxidação lipídica no fígado dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).....89

Figura 13- Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase no fígado dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).90

Figura 14- Autoanticorpos anti-LDLox no soro dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).....90

Figura 15- Produção de ROS (*ex vivo*) por macrófagos peritoneais (estimulados com Zymosan) obtidos de animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por 4 semanas. Os valores são apresentados como média \pm

Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t). RLU (Relative Light Unit): Unidade Relativa de Luz.....91

Figura 16- Imunofluorescência para CCL2 (A e C) e VCAM-1 (B e D) em células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas (2 horas) com diferentes concentrações de butirato de sódio (0,1; 0,5 e 1,0mM) e estimuladas com LDLox (50 μ M) por 4 horas. Os gráficos representam a média da razão da IF para CCL2/VCAM-1 em células pré-tratadas com butirato dividida pela IF em células sem pré-tratamento (Controle) x 100. (B) Imagem representativa da imunofluorescência de CCL2 das células pré-tratadas com 0,5mM de butirato. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. IF: Intensidade de Fluorescência. *Diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA). 92

Figura 17- Intensidade de CD36 expressa por células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50 μ M), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).....93

Figura 18- Secreção de citocinas por células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50 μ M), por 4 ou 24 horas. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. Letras diferentes identificam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA). n=8.94

Figura 19- Expressão de CD36 (Imunofluorescência) e captação de LDLox (fluorescência com Vermelho de Nilo) em macrófagos peritoneais (de camundongos ApoE^{-/-}) pré-tratados ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50 μ M), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato (Controle) e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão. * $p \leq 0.05$ (Teste t).95

Figura 20- Produção de óxido nítrico (NO) e de iNOS (*in vitro*) em macrófagos peritoneais (de camungongos ApoE^{-/-}) pré-tratados ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50 μ M), por 4 horas. Gráfico da

intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato (Controle) e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t)....96

Figura 21- Expressão do NF-kB e de IκB por células endoteliais humanas EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Western blot para p65 e IκB Os dados são reportados como media ± erro padrão. * $p \leq 0.05$ (teste t).97

Figura 22- Atividade do NF-kB em células endoteliais humanas EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Imunofluorescência para as subunidades p65 e p50 do NF-kB e IκB. Imagem representativa da imunofluorescencia para p65, p50 e IκB. Os dados são reportados como media ± erro padrão. * $p \leq 0.05$ (teste t).98

Figura 23- Produção de ROS (*in vitro*) em macrófagos peritoneais (de camungongos ApoE^{-/-}) pré-tratados ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato (Controle) e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).99

Figura 24- Expressão de NADPH oxidase (p22phox) em células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).100

Figura 25- Expressão de SOD e catalase em células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).....101

Figura 26- Hipótese da ação do butirato no endotélio.111

Figura 27- Hipótese da ação do butirato em macrófagos.114

Resumo

A aterosclerose é uma importante doença cardiovascular associada à elevada mortalidade em todo o mundo. Na busca pela prevenção ou tratamento de eventos cardiovasculares, estudos utilizando nutrientes tem se destacado fortemente. O butirato é produzido no organismo pela fermentação bacteriana de fibras e carboidratos não digeridos no cólon e constitui a principal fonte energética para os colonócitos. Diversos estudos têm mostrado que o butirato possui efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes, anti-carcinogênicos, bem como outras propriedades. Uma vez que a aterosclerose é uma doença de etiologia multifatorial onde inflamação e estresse oxidativo são fatores importantes, as propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes do butirato o tornam um nutriente promissor para o estudo do seu efeito sobre a aterogênese. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da ingestão de butirato de sódio no desenvolvimento da aterosclerose utilizando camundongos deficientes na apoproteína E (*ApoE*^{-/-}). Para tanto, foram utilizados animais machos, com 6-8 semanas de idade, divididos nos grupos Controle e Butirato, recebendo dieta padrão para camundongos, sem ou suplementada com butirato de sódio, respectivamente, por dez semanas. Previamente à eutanásia, foram realizados Teste de Tolerância Oral à Glicose e Teste de Sensibilidade à Insulina. Os resultados mostraram que o butirato não alterou o perfil lipídico e glicêmico nem a tolerância oral à glicose. No entanto, a sensibilidade à insulina foi melhorada no grupo Butirato. Apesar da ausência de efeito sobre a colesterolemia, houve uma importante redução da aterosclerose na aorta do grupo Butirato. Embora esta redução não tenha sido encontrada na válvula aórtica, essa apresentou menor presença de moléculas inflamatórias (CCL2 e

VCAM1) nas lesões, assim como maior estabilidade da placa, uma vez que apresentou menor quantidade de metaloproteinase-2 de matriz extracelular acompanhada de maior conteúdo de colágeno. A peroxidação lipídica no fígado dos animais tratados também foi reduzida, apresentando menores concentrações de malondialdeído e de hidroperóxidos, associado ao aumento da atividade da catalase. Foram realizados, também, experimentos *in vitro* com células endoteliais (EA.hy926) pré-tratadas com butirato por 2h e, em seguida, estimuladas com LDL oxidada. O pré-tratamento com butirato atuou de maneira benéfica, reduzindo a secreção das moléculas pró-inflamatórias CCL2, VCAM1, TNF, IL-6 e IL-1 β , bem como aumentando a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10. O tratamento com butirato também reduziu a atividade do NF-kB e a expressão de NADPH oxidase-p22phox. Os resultados sugerem, portanto, que os efeitos antiaterogênicos do butirato de sódio podem resultar das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes desse nutriente.

Palavras-chave: Aterosclerose, Butirato de sódio, Colesterolemia, Inflamação e Estresse oxidativo.

Abstract

Atherosclerosis is a major cardiovascular disease associated with high mortality worldwide. In the search for prevention or treatment of cardiovascular events, studies using nutrients has emerged strongly. Butyrate is produced in the body by the bacterial fermentation of fiber and undigested carbohydrates in the colon and is the main energy source for colonocytes. Butyrate has anti-inflammatory, anti-oxidants, anti-carcinogenic effects and other properties. Since atherosclerosis is a multifactorial disease in which inflammation and oxidative stress are important factors, anti-inflammatory and anti-oxidant properties of butyrate make it a promising nutrient for the study of its effect on atherogenesis. Therefore, the objective of this work was to study the effect of intake of butyrate in the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-}). Male animals (6-8 weeks old) were fed a control diet or butyrate-supplemented diet (1%) for 10 weeks; control and Butyrate group, respectively. Before euthanasia, Oral Glucose Tolerance Test and Insulin Sensitivity Test were performed. Butyrate did not affect the lipid and glycemic profiles or oral glucose tolerance. However, the insulin sensitivity was improved in the butyrate group. Despite the absence of effect on serum cholesterol, there was a significant reduction of atherosclerosis in the aorta of the butyrate group. Although this reduction was not found at the aortic valve, this had less inflammatory molecules (VCAM1 and CCL2) in the lesions, as well as increased stability of the plate, since showed less matrix metalloproteinase-2 and increased collagen content. Lipid peroxidation in the liver of treated animals was also reduced, with lower concentrations of malondialdehyde and hydroperoxide associated with increased catalase activity. We also performed *in vitro* experiments to study the effect of pre-

treatment of endothelial cells (EA.hy926) with butyrate. EA.hy926 cells were pre-incubated with butyrate for 2h and then stimulated with oxidized LDL. The pretreatment reduced production of proinflammatory molecules CCL2, VCAM1, TNF, IL-6 and IL-1 β , and increased secretion of anti-inflammatory cytokine IL-10. Butyrate also reduced the NF-kB activity and NADPH oxidase-p22phox expression. Therefore, the results suggest that the anti-atherogenic effects of butyrate may result from anti-inflammatory and antioxidant properties of this nutrient.

Keywords: Atherosclerosis, Sodium butyrate, cholesterol, inflammation and oxidative stress.

1- INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são importantes causadoras de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A principal característica dessas doenças é a ocorrência da aterosclerose, que é caracterizada pelo acúmulo de placas de gordura nas artérias podendo, progressivamente, reduzir o diâmetro do vaso ou mesmo obstruí-lo. A obstrução causada pelos ateromas leva à falta de suprimento sanguíneo, ou isquemia, podendo ocasionar a morte tecidual. Neste contexto, a aterosclerose está altamente associada às isquemias cardíacas e cerebrais, relacionadas ao infarto agudo do miocárdio e à acidentes vasculares cerebrais, respectivamente.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial, podendo-se citar diversos fatores de risco como dislipidemias, hipertensão, diabetes, obesidade, tabagismo, uso excessivo de álcool e sedentarismo. Esses fatores sozinhos ou associados são precursores de uma resposta inflamatória crônica causadora da disfunção endotelial, sendo, esse, um processo chave para o início e progressão da doença vascular aterosclerótica.

A dieta possui um papel importante na ocorrência bem como na prevenção da aterosclerose. Os cuidados na alimentação vão desde um controle visando melhora no perfil lipídico e glicêmico sanguíneo a uma ingestão calórica adequada para controle do peso corporal, principalmente em caso de obesidade. Assim, o tipo de alimento consumido contribui de maneira expressiva para a obtenção de nutrientes que possam auxiliar na prevenção da aterosclerose. Neste contexto, a busca de nutrientes que possam ser suplementados na alimentação tem se destacado em diversos estudos para prevenção e/ou tratamento da aterosclerose.

O butirato é um nutriente encontrado em queijos e manteiga, mas sua principal fonte no organismo é pela fermentação bacteriana de fibras e amido não digerido no cólon. O butirato é a principal fonte energética para os colonócitos, mas também influencia uma ampla rede de funções celulares afetando benéficamente a saúde intestinal, principalmente devido ao seu potencial anti-inflamatório, anticarcinogênico e antioxidante. Essas propriedades fazem do butirato um nutriente promissor no estudo de seus possíveis efeitos no desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que inflamação e estresse oxidativo são características intrínsecas dessa doença.

O presente estudo, portanto, estuda os efeitos que a suplementação de butirato na dieta conferem ao desenvolvimento da aterosclerose e os seus possíveis mecanismos de ação.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença multifatorial crônica e progressiva com um importante componente inflamatório associado a mudanças no perfil lipídico. Pode ser considerada uma forma de inflamação crônica resultante da interação entre lipoproteínas modificadas oxidativamente, macrófagos e outras células do sistema imune. Tal resposta inflamatória ocorre em estímulo à presença de um agente inflamatório, sendo esse, frequentemente, a LDL oxidada. A agregação de lipoproteínas na íntima arterial tem sido proposta como sendo primordial na aterosclerose (Casos *et al.*, 2008; Hansson *et al.*, 2006; Mallika *et al.*, 2007; Rosenson, 2004).

O fluxo sanguíneo gera importantes forças físicas que agem nas células endoteliais, denominadas forças de cisalhamento ou *shear stress*, que tem efeito sobre a morfologia dessas células. Em regiões da ramificação arterial ou curvatura, onde o fluxo é perturbado (baixo *shear stress*), as células têm formas poligonais e sem orientação específica e estas áreas mostram aumento da permeabilidade a macromoléculas, tais como LDL sendo locais preferenciais para a formação de lesões ateroscleróticas (Lusis, 2000).

Concentrações elevadas de LDL na corrente sanguínea aumentam sua migração por entre as células endoteliais e a interação com proteoglicanos da matriz subendotelial resulta em sua retenção. A ação de espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos residentes, células musculares lisas e células endoteliais leva à oxidação das LDL aprisionadas (Steffens *et al.*, 2004). As LDLs oxidadas

estimulam a síntese de moléculas quimiotáticas para monócitos (MCP1/CCL2) e a expressão de moléculas de adesão celular como P-Selectinas, VCAM e ICAM. As moléculas CCL2, então, atraem os monócitos que se ligam às selectinas aumentando o rolamento e, por fim, se aderem firmemente às demais moléculas de adesão, levando à sua migração via endotélio para a camada íntima do vaso (Casos *et al.*, 2008). Os monócitos diferenciam-se, então, em macrófagos que expressam receptores *scavenger* CD36 e SR-A que se ligam às LDLs oxidadas e as endocitam levando à formação de células espumosas devido ao acúmulo de lipídeos nesses macrófagos. Isso ocorre porque não há uma regulação negativa, ou seja, a expressão desses receptores não é regulada pelo conteúdo de partículas captadas (Manning-Tobin *et al.*, 2009). Assim, dá-se início a formação da estria gordurosa, que constitui a primeira fase da lesão (Figura 1) (Mitchinson *et al.*, 1987).

Na evolução da placa ocorre uma transição de estria gordurosa, relativamente simples, para lesão fibrogordurosa, caracterizada pela migração de células musculares lisas da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial. Estas células podem proliferar e também captar lipoproteínas modificadas formando células espumosas. As células musculares lisas sintetizam proteínas da matriz extracelular como colágeno, elastina e proteoglicanos, que levam à formação da capa fibrosa (Hansson *et al.*, 2006; Mallika *et al.*, 2007; Rosenson, 2004). O conteúdo de colágeno compreende cerca de 60% das proteínas situadas na placa aterosclerótica e exerce um papel chave na estabilidade das lesões (Adiguzel *et al.*, 2009). Essas lesões, em estágio intermediário, desenvolvem um núcleo de material rico em lipídeos, sugerindo que elas representam um precursor para lesões mais avançadas (Ross, 1995).

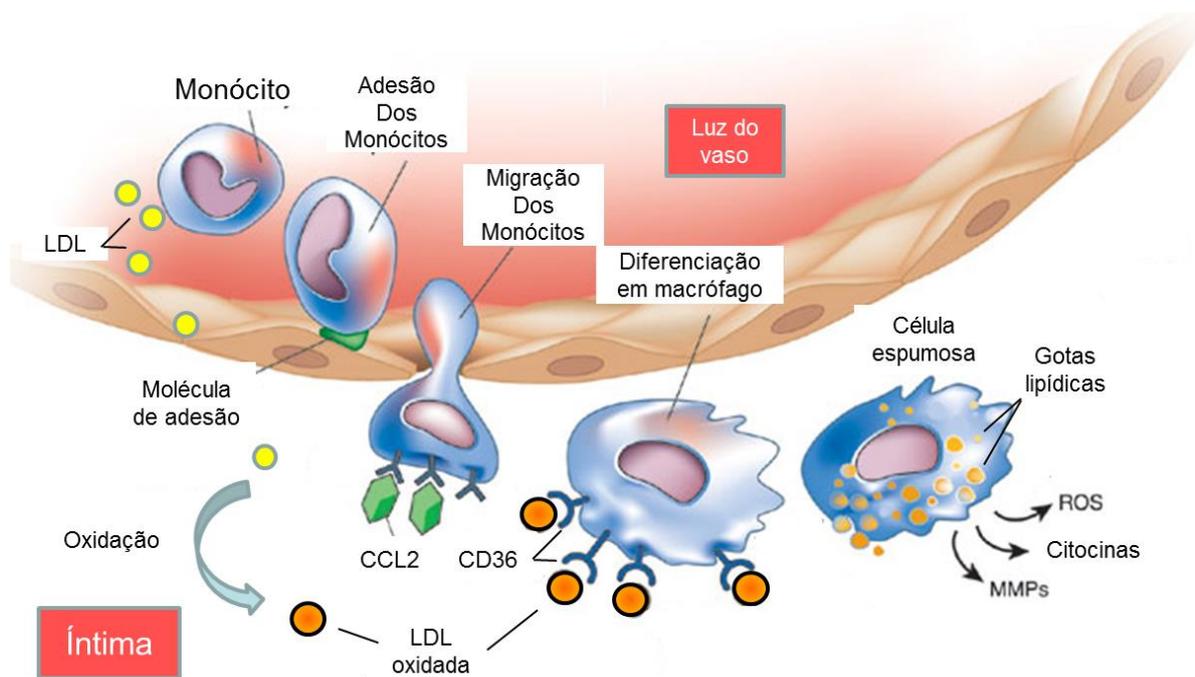


Figura 1- Formação da aterosclerose

As partículas de LDL modificada oxidativamente na cama íntima da artéria iduzem a secreção de moléculas quimiotáticas para monócitos (CCL2) e a expressão de moléculas de adesão celular que levam à adesão endotelial de monócitos e sua posterior migração para a camada íntima onde se diferenciam em macrófagos. Estes por meio de receptores *scavenger* (como CD36) captam as partículas de LDL oxidadas formando as células espumosas (*foam cell*) e o conseqüente desenvolvimento da placa aterosclerótica. Os macrófagos, assim como outras células, secretam citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros mediadores de ação próinflamatória, como metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) que degradam colágeno, desestabilizando a placa. Fonte: Adaptado de Libby 2002 (Libby, 2002).

As placas maduras ou fibrosas apresentam uma estrutura mais complexa. No centro da placa estão as células espumosas, os lipídeos extracelulares derivados de células que sofreram apoptose, cristais de colesterol e as células necróticas, envolvidos por uma capa de células musculares lisas e fibras de colágeno. Células dendríticas, mastócitos e poucas células B também estão presentes na placa, sendo a região de interface do centro e capa fibrosa abundante em células T. Calcificações são frequentemente encontradas próximas ao centro necrótico (Andres *et al.*, 2012; Hansson *et al.*, 2006; Ross, 1995).

Diversos componentes moleculares estão envolvidos na aterogênese e muitos deles têm sua produção estimulada por LDLox. As partículas de LDLox também estimulam a expressão de CD36, contribuindo de maneira importante para aumentar sua captação (D'Archivio *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2000). O CD36 é expresso em vários tipos celulares como células endoteliais, adipócitos, células dendríticas, células musculares lisas, dentre outras, mas os monócitos/macrófagos possuem um papel de destaque para o início do processo aterosclerótico via expressão desse receptor (Collot-Teixeira *et al.*, 2007; Nicholson *et al.*, 2004). A deficiência em CD36 reduz acentuadamente a captação de LDLox por macrófagos peritoneais e reduz o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} (Febbraio *et al.*, 1999; Febbraio *et al.*, 2000), sugerindo ser o principal receptor para lipoproteínas modificadas (Nicholson *et al.*, 2004). Além de atuar na captação de LDLox, estudos tem mostrado que o CD36 pode estar envolvido na retenção dos macrófagos no sítio da lesão, pois a sinalização do CD36 em resposta à LDLox altera o citoesqueleto dos macrófagos aumentando sua adesão e inibindo sua migração (Park *et al.*, 2009).

Sequencialmente à ativação dos macrófagos residentes pela LDLox, estes, juntamente com células endoteliais, secretam CCL2 que induzem o recrutamento de monócitos, atuando de maneira importante para aumentar o infiltrado de macrófagos na íntima arterial (Harrington, 2000). A expressão de CCL2 contribui de maneira expressiva para a gênese e evolução da aterosclerose, sendo que sua deficiência em modelo murino de aterosclerose possui efeito ateroprotetor (Gu *et al.*, 1998). Além do recrutamento causado por CCL2, a participação de moléculas de adesão é fundamental para a migração dos monócitos atraídos. As LDLox também estimulam a expressão dessas moléculas pelo endotélio. A expressão de VCAM-1, por

exemplo, tem um efeito crítico na aterosclerose, particularmente nos primeiros estágio de formação de lesões (Cybulsky *et al.*, 2001; Ley *et al.*, 2001).

Durante a progressão da aterosclerose, outros componentes inflamatórios surgem e contribuem para a progressão das lesões. Citocinas próinflamatórias como TNF e IL-1 β possuem efeito proaterogênico, como, por exemplo, induzindo a secreção de outros fatores nocivos que aumentam ou agravam a aterosclerose (Tedgui *et al.*, 2006). As citocinas próinflamatórias aumentam a expressão de CCL2, VCAM-1 e ICAM-1, acelerando o crescimento das lesões, e de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), que reduz a estabilidade da placa. MMPs são secretadas por células ativadas, como macrófagos e células musculares lisas, e causam a degradação do colágeno tornando a placa vulnerável à ruptura (Adiguzel *et al.*, 2009; Tedgui *et al.*, 2006). MMP2 e MMP9 são as principais proteases envolvidas na aterosclerose, sendo sua expressão e atividade aumentadas em estágios avançados da placa ateromatosa (Wagsater *et al.*, 2011). A deficiência dessas MMPs em animais ApoE^{-/-} foi associada com redução na aterosclerose (Kuzuya *et al.*, 2006; Luttun *et al.*, 2004).

A ativação do fator de transcrição-kappa B (NF-kB) é potencialmente uma das principais vias próinflamatórias na aterogênese. NF-kB ativado tem sido identificado em células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e outras células imunes em lesões ateroscleróticas (Brand *et al.*, 1996). Essas células são essencialmente susceptíveis à ativação próinflamatória pela via do NF-kB nos eventos de iniciação e progressão da aterosclerose. Nos primeiros estágios, a via do NF-kB exerce papel importante na ativação endotelial e no recrutamento de monócitos, por regular a expressão gênica de moléculas de adesão, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, e de moléculas quimiotáticas, como CCL2. Outros fatores proaterogênicos como TNF,

IL-1 β , IL-6, MMPs, iNOS, dentre outros, também tem sua regulação gênica mediada pela via do NF-kB, exercendo efeito chave na evolução da placa (Monaco *et al.*, 2004).

Além dos eventos inflamatórios, a patofisiologia da aterosclerose aponta o estresse oxidativo como fator chave associado às alterações fisiológicas desencadeadoras dessa doença, por atuar na oxidação de LDL, como já anteriormente comentado (Kinoshita *et al.*, 2013; Libby *et al.*, 2011). No entanto, o estresse oxidativo também é importante na progressão das lesões ateroscleróticas podendo aumentar a vulnerabilidade da placa e consequente ruptura (Parthasarathy *et al.*, 2008). Aspectos sobre o estresse oxidativo e a oxidação de LDL serão melhores abordados posteriormente, bem como suas implicações no desenvolvimento da aterosclerose.

2.2- Butirato

Ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), principalmente acetato, propionato e butirato, são ácidos orgânicos, produzidos no cólon por fermentação bacteriana de fibras dietéticas ou amido resistente. Essa fermentação permite a recuperação de energia de fontes alimentares que não foram digeridas no intestino delgado, e estima-se que este processo contribua com 5 a 15% do requerimento calórico total em humanos (Hamer *et al.*, 2008).

O butirato é um componente encontrado em alimentos como queijo e manteiga, adicionalmente à sua produção pela fermentação bacteriana no cólon (Hamer *et al.*, 2008).

Além de sua função nutricional no cólon, tem-se encontrado diversos outros efeitos exercidos pelo butirato. O butirato destaca-se como componente fundamental para a saúde intestinal, particularmente pela prevenção e inibição do câncer de cólon (Hamer *et al.*, 2008). Uma redução na produção de agentes pro-inflamatórios aponta esse ácido graxo como anti-inflamatório e, além do efeito imunomodulatório, o butirato promove apoptose em células com elevada proliferação e/ou ativação (Bailón *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2002; Vinolo *et al.*, 2011a; Vinolo *et al.*, 2011b). Outra propriedade benéfica que tem sido atribuída ao butirato é o efeito antioxidante que, inclusive tem sido apontado como parte do mecanismo para redução da inflamação (Hamer *et al.*, 2008; Leonel *et al.*, 2012a; Russo *et al.*, 2012). Assim, a seguir abordaremos as características e propriedades do butirato com maiores detalhes.

2.2.1- Absorção do butirato: MCT1

A absorção dos ácidos graxos de cadeia curta ocorre por diferentes mecanismos. A forma protonada dos SCFA pode ser absorvida por difusão, já que as formas não-dissociadas são lipossolúveis, podendo atravessar a membrana livremente. No entanto, os SCFA são ácidos fracos, apresentando pKa em torno de 4.8, e por isso mais de 90% apresentam-se na forma iônica (dissociada) no lúmen colônico. Assim, outras vias de absorção são reportadas, como troca iônica, que medeiam a troca SCFA:HCO₃ através da membrana citoplasmática, e proteínas transportadoras. Tem sido descrito um importante agente transportador envolvido no influxo dos SCFA através da membrana, o transportador de monocarboxilato-1 (monocarboxylate transporter 1 - MCT1) que depende do gradiente de H⁺ (Figura 2)

(Cook *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 2011; Hadjiagapiou *et al.*, 2000; Hamer *et al.*, 2008). Transportadores de monocarboxilatos são proteínas contendo 12 domínios α -hélice transmembrana com C- e N-terminal localizado no citoplasma. Eles são conhecidos carreadores de piruvato, lactato e corpos cetônicos para dentro das células (Halestrap, 2012) e, adicionalmente, MCTs também transportam os produtos de fermentação no cólon: ácidos graxos de cadeia curta (Hadjiagapiou *et al.*, 2000).

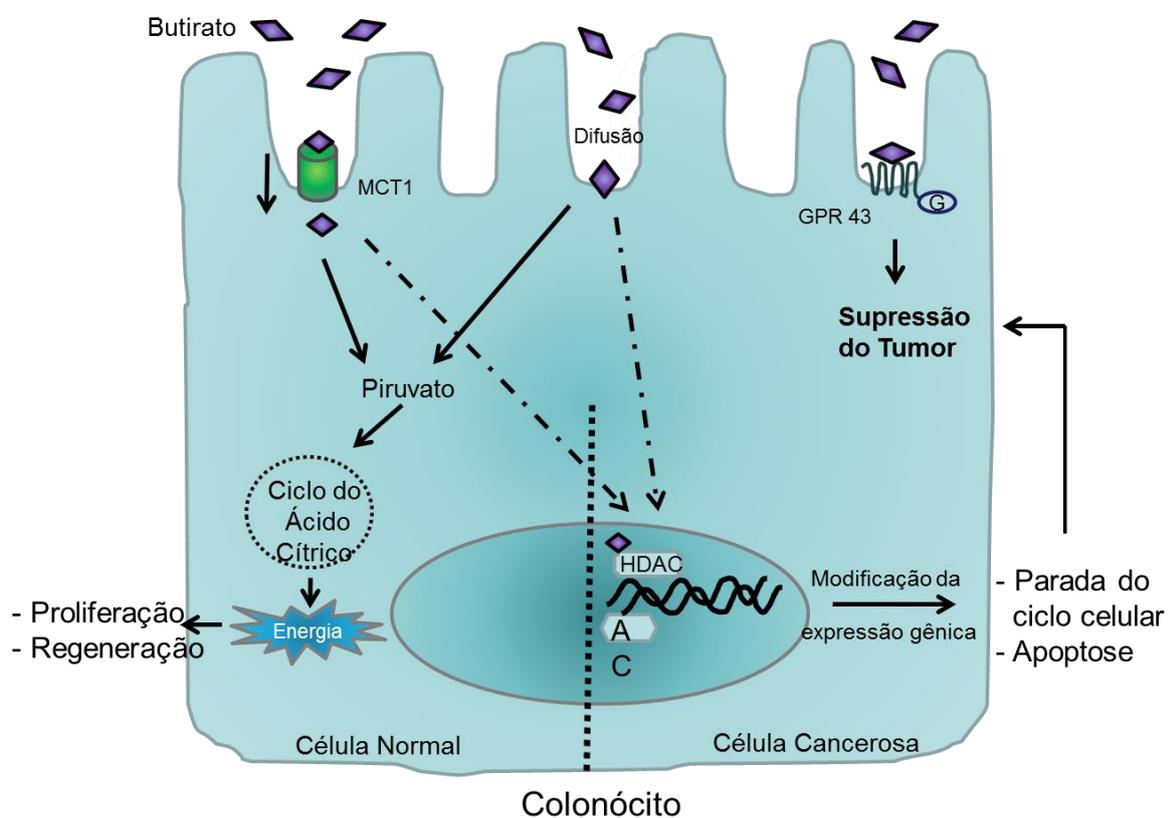


Figura 2- Absorção de função do butirato.

O transporte de butirato para dentro da célula ocorre por difusão (forma protonada) e, principalmente, via transportador de monocarboxilato-1 (MCT1), forma dissociada. Em colonócitos normais (não cancerosos) o butirato é o principal nutriente utilizado como fonte energética e aumenta a proliferação e regeneração celular. Em colonócitos cancerosos, no entanto, o butirato não é utilizado no metabolismo energético e apresenta atividade inibidora de histona desacetilase (HDAC), induzindo hiperacetilação gênica. A inibição de HDAC por butirato tem sido associada à parada do ciclo celular e apoptose em células malignas, por modificação na expressão gênica. O efeito supressor de tumor por butirato também tem sido descrito via ativação de receptores acoplados à proteína G, como o GPR43.

O transporte do butirato é importante também para a homeostase dos colonócitos, através da regulação da expressão gênica. MCT1, exerce um papel importante para os efeitos anticarcinogênico e anti-inflamatórios do butirato (Cuff *et al.*, 2004; Thibault *et al.*, 2010)

2.2.2- Efeito do butirato mediado por GPR

Além do efeito após sua absorção, os ácidos graxos de cadeia curta têm sua interação com as células do organismo também por meio de receptores acoplados à proteína G (GPR, ou receptor de ácidos graxos - free fat acid receptor - FFA), principalmente GPR41 (FFA3) e GPR43 (FFA2), presentes na membrana plasmática celular (Ulven, 2012). A expressão desses receptores tem sido descrita em diversas células do organismo, como colonócitos, células enteroendócrinas, adipócitos, células da medula óssea, dentre outras como as células do sistema imune (Brown *et al.*, 2003; Karaki *et al.*, 2006; Karaki *et al.*, 2008; Tazoe *et al.*, 2009). GPR43 possui maior especificidade, sendo encontrado em altos níveis em células polimorfonucleares (PMN), principalmente em neutrófilos, e em menores níveis em células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cells - PBMC). RNA mensageiro para GPR43 também já foi detectado na medula óssea e baço. A expressão GPR41 parece ser mais amplamente distribuída com significativa expressão no baço, linfonodo, medula óssea e PBMC (Le Poul *et al.*, 2003).

GPR43 está altamente envolvido no câncer de cólon (Figura 2). Esse receptor tem expressiva redução e, em alguns casos, completa perda da expressão, em

linhagens de células de câncer de cólon. Interessantemente, a restauração da expressão do receptor GPR43 em linhagem celular de câncer de cólon (HCT8), transfectadas com um vetor de GPR43, potencializou o efeito da atividade antitumorigênica do butirato, aumentando a apoptose nessas células (Tang *et al.*, 2011).

Além do câncer, a via de ação extracelular do butirato também tem sido abordada na inflamação. Estudos realizados em camundongos deficientes em GPR43 (*Gpr43*^{-/-}) mostraram que esses animais apresentaram exacerbada inflamação em modelo de colite, artrite e asma, havendo aumentada produção de mediadores inflamatórios e recrutamento de leucócitos. Adicionalmente, animais selvagens reconstituídos com medula óssea deficiente deste receptor também tiveram inflamação similar aos animais *Gpr43*^{-/-} (Maslowski *et al.*, 2009).

2.2.3- Propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do butirato

O efeito do butirato sobre doenças inflamatórias intestinais tem sido o principal foco da literatura científica ao abordar os efeitos desse ácido graxo. O butirato tem mostrado sua ação protetora particularmente por reduzir a inflamação e, portanto, a evolução de condições patológicas como colite e mucosite intestinal (Ferreira *et al.*, 2012; Hamer *et al.*, 2010; Leonel *et al.*, 2012a; Vieira *et al.*, 2012). Além disso, esse efeito anti-inflamatório tem sido bastante evidenciado nos diferentes tipos celulares do sistema imune.

A capacidade do butirato em atuar no sistema imune atenuando a inflamação indica que a possibilidade deste nutriente exercer efeitos sobre o sistema vascular prevenindo ou melhorando doenças é promissora. Neste contexto, podemos citar

importantes propriedades anti-inflamatórias do butirato que vão desde a redução na quimiotaxia e adesão de monócito bem como a redução na produção de citocinas por macrófagos (Park *et al.*, 2007; Zapolska-Downar *et al.*, 2004).

A redução no recrutamento de leucócitos ocasionada pelo butirato resulta principalmente de sua capacidade em diminuir a quimiotaxia e a adesão dessas células, como demonstrado em vários estudos (Meijer *et al.*, 2010; Vinolo *et al.*, 2011b). O butirato tem mostrado ser eficaz em reduzir a expressão/secreção de CCL2 em várias condições experimentais de inflamação. Cox *et al.* (2009) demonstraram que o butirato reduziu a secreção de CCL2 de maneira concentração-dependente por monócitos estimulados com lipopolisacarídeo (LPS). CCL2 também foi inibida por butirato (10mM) em células Caco-2 estimuladas com *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Saegusa *et al.*, 2007). O tratamento com butirato igualmente reduziu a secreção de CCL2 num experimento em que macrófagos foram co-incubados com adipócitos *in vitro*. Este resultado demonstrou uma ação importante do butirato já que a interação entre macrófagos e adipócitos é comum na obesidade, uma condição altamente associada a doenças cardiovasculares (Ohira *et al.*, 2013).

Após a atração dos leucócitos por quimiocinas, a expressão de moléculas de adesão vascular, tais como moléculas de adesão vascular (*Vascular cell adhesion molecule* - VCAM) e molécula de adesão intercelular (*Intercellular adhesion molecule* - ICAM), é importante para a firme adesão celular e posterior migração para a camada íntima arterial (Behrendt *et al.*, 2002; Galkina *et al.*, 2007; Smith, 2008). Estudos têm mostrado que o butirato também é capaz de reduzir a adesão endotelial de leucócitos. Zapolska-Downar *et al.* (2004) mostraram que a expressão proteica de VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais umbilicais humanas (*Human umbilical*

vascular endothelial cells - HUVEC) estimuladas com TNF- α e IL-1 β foi reduzida após pré-incubação com butirato, sendo essa inibição também observada na expressão gênica. Esse efeito foi acompanhado pela redução na adesão de monócitos e linfócitos às células endoteliais também estimuladas com TNF- α e IL-1 β . Os mecanismos envolvidos na inibição da expressão gênica das moléculas de adesão nesse estudo foram associados à redução na atividade do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) nas células HUVEC após pre-incubação com butirato, assim como o aumento na atividade do receptor- α ativado por proliferador de peroxissomas (Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α)). A capacidade do butirato em reduzir a expressão de moléculas de adesão, assim como a adesão monocítica em células endoteliais, também foi confirmada por outros autores (Menzel *et al.*, 2004). Além disso, o butirato possui efetiva capacidade inibidora da secreção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de induzir a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Liu *et al.*, 2012) em macrófagos, que exercem papel chave na aterogênese.

Elevadas concentrações de óxido nítrico (NO) produzidas pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS) podem exercer efeitos adversos à saúde vascular (Kibbe *et al.*, 1999; Stathopoulos *et al.*, 2001). Aumentada produção de NO por iNOS está associada à elevada formação de peroxinitrito (por sua reação com radicais superóxidos), que induz peroxidação proteica (formação de nitrotirosina), e também contribui com disfunção no miocárdio e falência cardíaca (Feng *et al.*, 2001). Interessantemente, tem sido descrito que butirato reduz a produção de NO derivado de iNOS *in vivo* e *in vitro* (Liu *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2010). Chakravortty e colaboradores (Chakravortty *et al.*, 2000) mostraram que o butirato reduziu a produção de NO por macrófagos murinos RAW 264.7 sob estímulo inflamatório com LPS e

este efeito foi ocasionado pela inibição da expressão de iNOS via redução da atividade do fator de transcrição NF- κ B. O efeito redutor do butirato sobre produção de NO também foi confirmado por outros trabalhos em macrófagos murinos RAW 264.7 (Liu *et al.*, 2012), em macrófagos peritoneais extraídos de camundongos C57BL/6 (Ramos *et al.*, 2002) e em células microgliciais (Kim *et al.*, 2004; Huuskonen *et al.*, 2004).

A produção de NO induzida por iNOS em macrófagos está envolvida em várias disfunções no sistema vascular (Kajita *et al.*, 2011). Além disso, a iNOS também está associada à oxidação de LDL e formação de células espumosas na aterogênese (Li *et al.*, 2002) e sua expressão em lesões ateroscleróticas já foi descrita (Buttery *et al.*, 1996; Depre *et al.*, 1999). Esses dados reforçam que o efeito inibidor de iNOS pelo butirato descrito em macrófagos possa exercer efeito modulador na produção de NO por essas células durante o desenvolvimento da aterosclerose.

Além da atividade anti-inflamatória, o butirato possui propriedades antioxidantes importantes que também são responsáveis por seus efeitos benéficos, muitas vezes envolvendo a indução de enzimas antioxidantes. O tratamento de colonócitos humanos e de células de linhagens cancerosas (HT20 e HT29 19A) com butirato promoveu proteção contra danos ao DNA induzido por H₂O₂ (Rosignoli *et al.*, 2001). O efeito protetor do butirato em células musculares lisas de artérias de rato contra hiperóxia, por exemplo, foi associado ao aumento na atividade da enzima antioxidante catalase (Yano *et al.*, 1989). O envolvimento do sistema glutatona/glutationa S-transferase (GST) foi avaliado em células musculares lisas (VSMC) incubadas com butirato, onde se pode observar que o tratamento de VSMC em proliferação induziu expressão de GST que foi associada à redução de espécies

reativas de oxigênio e inibição da proliferação celular (Ranganna *et al.*, 2007). Adicionalmente, o butirato reduziu a produção de ROS em células Caco-2 e em biopsias de pacientes com doença inflamatória intestinal sob estímulo com LPS e restaurou os níveis de GST (Russo *et al.*, 2012) O efeito antioxidante do butirato via aumento em moléculas não enzimáticas como glutathiona (GSH) também tem sido descrito (Hamer *et al.*, 2009).

2.2.4- Butirato e sensibilidade à insulina

A resistência à insulina constitui um fator importante para o desenvolvimento de hipertensão e doença cardiovascular e a regulação da sensibilidade à insulina, bem como o metabolismo da glicose, é essencialmente mediado por Receptores- α ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR- α) (Newaz *et al.*, 2009; Tordjman *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005).

Sumariamente, os diversos estudos tem mostrado o butirato como agente indutor de apoptose, anti-inflamatório, antioxidante, dentre outros efeitos. No entanto, pouco foi estudado sobre seu papel no metabolismo energético. Um estudo relacionando butirato e alterações metabólicas foi publicado por Gao e colaboradores (Gao *et al.*, 2009). Nesse estudo, os autores examinaram o papel do ácido butírico (5%) na regulação da sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica. Os resultados mostraram que, na dieta rica em gordura, a suplementação com butirato impediu o desenvolvimento da resistência à insulina e obesidade em camundongos C57BL/6. Glicemia de jejum, insulina de jejum e resistência à insulina foram todos preservados nos animais tratados. Interessantemente, o butirato foi também capaz de reduzir a

colesterolemia. O conteúdo de gordura corporal foi mantido em 10% do peso total, embora a ingestão de alimentos não tenha sido alterada. Os autores também estudaram a termogênese adaptativa e oxidação dos ácidos graxos que foram aumentadas após tratamento com butirato. Houve também aumento da função mitocondrial no músculo esquelético e tecido adiposo marrom. A fibra do tipo I (de oxidação aeróbica) foi aumentada no músculo esquelético dos animais alimentados com butirato. Os autores concluíram que a suplementação com butirato pode impedir ou mesmo tratar a resistência à insulina induzida pela dieta e que seu mecanismo de ação está relacionado com o aumento do gasto energético e indução da função mitocondrial.

A melhora na sensibilidade à insulina pelo butirato foi associada a um aumento na expressão gênica e proteica do PPAR- α (Gao *et al.*, 2009). O PPAR- α possui importante efeito na função endotelial e na proteção contra o desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica (Dolezalova *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004; Zandbergen *et al.*, 2007) e agonistas de PPAR- α estão associados à melhora na sensibilidade à insulina (Ye *et al.*, 2001). Outros estudos também tem confirmado o efeito do butirato em aumentar a expressão do PPAR- α . Em células endoteliais HUVEC o butirato induziu aumento na ativação de PPAR- α e este resultado foi associado à redução na expressão de moléculas de adesão e atividade do NF- κ B (Zapolska-Downar *et al.*, 2004). Este foi um resultado interessante uma vez que a ação inibitória de PPAR- α sobre a ativação do NF- κ B tem sido sugerida (Delerive *et al.*, 1999; Fruchart *et al.*, 1999). Coletivamente, esses dados apontam para mais uma propriedade antiaterogênica do butirato: aumentar atividade PPAR- α .

A inflamação no tecido adiposo tem uma importante associação entre a obesidade e a resistência à insulina associada ao diabetes mellitus tipo 2, e suas

consequências ao sistema cardiovascular (McFarlane *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2008). O infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, associado à secreção de citocinas pró-inflamatórias, tem sido descrito na obesidade (Lumeng *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Weisberg *et al.*, 2003). Interessantemente, o efeito anti-inflamatório do butirato apresenta efeitos protetores também no tecido adiposo modulando a inflamação. Ohira e colaboradores (Ohira *et al.*, 2013) mostraram que adipócitos em co-cultura com macrófagos apresentaram elevada expressão proteica e gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e CCL2. Porém, na presença de butirato a expressão genica e secreção dessas citocinas foram marcadamente reduzidas.

2.2.5- Butirato inibe HDAC

Vários estudos têm mostrado que o butirato é capaz de inibir a atividade de histonas desacetilase (HDAC) (Gill *et al.*, 2011; Vinolo *et al.*, 2011b). Este mecanismo induz hiperacetilação de histonas, alterando a expressão gênica positiva ou negativamente. A inibição das HDAC pelo butirato em células cancerosas, por exemplo, aumenta a expressão de genes que promovem a parada do ciclo celular, como p21, e de genes pro-apoptóticos, como Bak, mas também reduz a expressão de genes anti-apoptóticos, como BclxL (Davie, 2003; Gill *et al.*, 2011; Hinnebusch *et al.*, 2002; Ni *et al.*, 2010). Na inflamação, a hiperacetilação de histonas ocasionada pelo butirato altera negativamente a expressão de genes inflamatórios diminuindo a produção e secreção de citocinas de ação pró-inflamatórias, mas também aumenta a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (Bailón *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2010; Säemann *et al.*, 2000).

O efeito inibidor da atividade de HDAC pelo butirato, reduzindo mediadores pro-inflamatórios e/ou induzindo apoptose, além de classicamente mostrado em células cancerosas do epitélio colônico, tem ganhado atenção especial em células do sistema imune. No estudo de Aoyama e colaboradores (Aoyama *et al.*, 2010), o butirato induziu apoptose em neutrófilos por meio da atividade de caspases-8 e caspases-9, dependentemente da inibição da atividade de HDAC pelo butirato.

2.3- Metabolismo lipídico e aterosclerose

Os lipídeos são compostos apolares e, por isso, insolúveis em água. Sendo assim, a associam-se com proteínas e são constituídas as lipoproteínas (chamadas apoproteína) para o transporte de lipídeos no plasma sanguíneo (Champe *et al.*, 2009; Franssen *et al.*, 2008).

As lipoproteínas diferem em tamanho e composição. Os quilomícrons (QM) têm menor densidade e maior tamanho. As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e as lipoproteínas de densidade baixa (LDL) são sucessivamente mais densas, com maiores proporções de proteínas em relação aos lipídeos. As lipoproteínas de densidade alta (HDL) são as partículas mais densas (Champe *et al.*, 2009).

Lipoproteínas ricas em TGs são secretadas na circulação sanguínea pelo fígado como VLDL e pelo sistema digestivo como QM. Sendo estes, oriundos dos lipídeos da dieta (Franssen *et al.*, 2008). A ação da enzima lipase lipoproteica presente na membrana das células endoteliais dos vasos sanguíneos leva à remoção dos triglicerídeos das lipoproteínas. A remoção dos TG dos QM gera os quilomícrons remanescentes que são removidos da circulação pelo fígado. Já a

remoção dos triglicerídeos das VLDL leva à formação das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Cerca de 50% das IDL são removidas da circulação pelo fígado e o restante é convertido em LDL pela lipase lipoprotéica ou após a perda de apoproteína-E, dentre outras modificações (Alvarez-Leite, 1995).

A principal função das partículas de LDL é fornecer o colesterol aos tecidos periféricos. Por meio dos receptores nas superfícies celulares que reconhecem a apoproteína B-100, as LDL entram em contato com os tecidos e ocorre a deposição de colesterol nas membranas (Champe *et al.*, 2009).

A remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos e lipoproteínas, e subsequente depósito no fígado (podendo ser posteriormente secretado na bile) é chamado transporte reverso de colesterol (Alvarez-Leite, 1995).

A quantidade e qualidade da gordura ingerida na dieta influenciam diretamente a concentração do colesterol na corrente sanguínea, cujos níveis elevados aumentam o risco de doenças cardiovasculares (Morais *et al.*, 2003). A composição em ácidos graxos dos lipídeos ingeridos é um importante fator na modulação do metabolismo lipídico do organismo. Uma maior ingestão de ácidos graxos saturados aumenta os níveis de LDL e reduz HDL, o que constitui uma conhecida condição para o desenvolvimento de doença arterial coronariana, pois o HDL é inversamente relacionado à aterosclerose, enquanto o LDL é um importante fator de risco para eventos cardiovasculares (Águila *et al.*, 2002; German *et al.*, 2004; Puiggrós *et al.*, 2002).

2.4- Associação da resistência à insulina e Diabetes com a aterogênese

A associação entre Diabetes Mellitus tipo 2 e resistência à insulina com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares é bastante evidente clinicamente. O envolvimento da resistência à insulina e acelerado desenvolvimento da aterosclerose em pacientes com diabetes tipo 2 tem sido mostrado em diversos estudos prospectivos (DeFronzo, 2010; Semenkovich, 2006). Vários fatores ocorrem em consequência à resistência à insulina que levam à aterogênese, como dislipidemia, hipertensão, intolerância à glicose, disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo, assim como uma disfunção na via de sinalização da insulina em células que participam da aterosclerose como células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas (Bornfeldt *et al.*, 2011; Cannizzo *et al.*, 2012; Shoelson *et al.*, 2006).

Cannizzo e colaboradores (Cannizzo *et al.*, 2012) mostraram que resistência à insulina promovida por dieta rica em frutose em camundongos deficientes em apolipoproteína E aumentaram o desenvolvimento da aterosclerose. Os animais apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia acompanhada de inflamação vascular e estresse oxidativo que culminaram numa maior evolução das lesões ateroscleróticas. A melhora na sensibilidade à insulina proporcionada pela ingestão de butirato por Gao e colaboradores (2009), indica um promissor efeito desse ácido graxo na sensibilidade à insulina em animais ApoE^{-/-} que possa resultar em implicações benéficas no desenvolvimento da aterosclerose.

2.5- Estresse oxidativo

Fisiologicamente, a produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) é parte integrante do metabolismo do organismo. No entanto, a produção exacerbada de compostos oxidantes e produção insuficiente dos mecanismos de defesa do organismo, gerando um desequilíbrio no sistema pró e antioxidante, culmina numa condição denominada estresse oxidativo. Este pode, então, causar dano aos tecidos e órgãos e está envolvido em grande número de doenças (Buonocore *et al.*, 2007; Goetz *et al.*, 2008). Quando o sistema antioxidante é suficiente para balancear o ataque das ROS, o organismo evita o estresse oxidativo (Monaghan *et al.*, 2009; Powers *et al.*, 2008).

I- Espécies Reativas de Oxigênio

O radical ânion superóxido (O_2^-) é produzido em sistemas biológicos por meio de uma redução de oxigênio catalisada enzimaticamente pela NADPH oxidase. Uma vez gerado, o O_2^- pode agir como radical livre fraco, como elétron redutor ou como elétron oxidante. Possui uma longa meia-vida que permite a difusão dentro da célula e, conseqüentemente, o aumento do número dos alvos potenciais (Goetz *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2008). A ativação da NADPH oxidase por mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e LDLox, gera uma produção exacerbada de ROS que age sobre diversas proteínas alvo estimulando a inflamação, como metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), cicloxigenases, dentre outras (Heinloth *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto reativo que pode facilmente gerar radicais livres como a hidroxila (OH^-), que é altamente reativa. H_2O_2 pode ser

gerado a partir da ação da superóxido dismutase (SOD), é estável, permeável às membranas, e tem uma meia-vida relativamente longa. É citotóxico, mas é considerado um agente oxidante relativamente fraco (Goetz *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2008).

II- Danos das ROS ao organismo

As ROS podem causar danos a biomoléculas como a oxidação de proteínas e aminoácidos, podendo induzir mudanças conformacionais que levam ao aumento da hidrofobicidade e subsequente desnaturação, agregação e precipitação. Eventualmente, esse processo contribui para a inflamação tecidual e morte celular (Goetz *et al.*, 2008).

Danos aos lipídeos causados pelas ROS possuem grande significância particularmente pelo fato de que a peroxidação lipídica nas membranas celulares podem causar lesões que podem culminar no início da morte celular. Esses danos podem ser diretos, por meio da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, ou indiretamente através da inibição da síntese de lipídeos ou ativação de lípases (Goetz *et al.*, 2008; Monaghan *et al.*, 2009).

Modificações oxidativas podem também ocorrer ao DNA por ação das espécies reativas de oxigênio. Além do DNA nuclear, o mitocondrial é alvo desses danos, sendo ainda mais vulnerável, pois pertence a um sítio de geração das ROS (Monaghan *et al.*, 2009).

III- Estresse oxidativo e aterosclerose

O estresse oxidativo está associado a várias doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, sendo a oxidação das LDL um fator importante para o

desenvolvimento dessa doença (Heistad, 2006; Kato *et al.*, 2009). A oxidação das LDL leva à exposição de moléculas de fosforilcolina oxidada gerando um mimetismo molecular capaz de ativar o sistema imune (Figura 3) e o consequente reconhecimento pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, desencadeando os processos envolvidos na formação da aterosclerose (Binder *et al.*, 2002). As LDL oxidadas também se constituem como um fator desencadeante da produção de ROS por macrófagos contribuindo para aumentar ainda mais a oxidação das LDL que migrarem para o sítio de início da lesão (Gao *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2006).

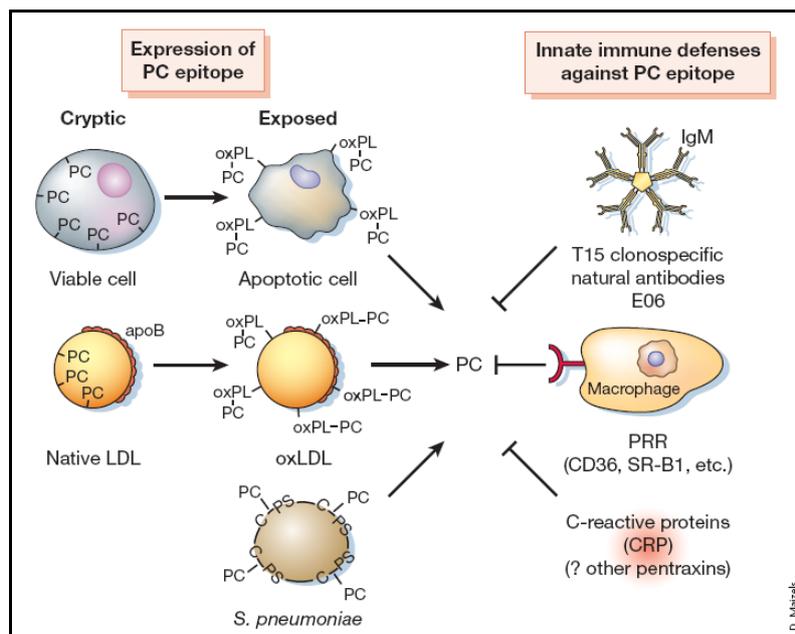


Figura 3 - Mimetismo molecular entre epítotos da LDL oxidada, célula apoptótica e fosforilcolina (PC – Phosphorylcholine) de patógenos. Fosforilcolina quando oxidada fica exposta podendo ser reconhecida pelo sistema imune (Binder *et al.*, 2002).

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na disfunção endotelial, que também está associada à aterosclerose. Ânions superóxidos inativam óxido nítrico, que é um potente vasodilatador, levando à disfunção endotelial. Essa

condição favorece a entrada das partículas de LDL (Heistad, 2006; Mallika *et al.*, 2007). Vale ressaltar que a LDLox também constitui um fator causador da disfunção endotelial, pois além de ativar os macrófagos a produzirem ROS, contribuindo para aumentar o estado pro-oxidativo no subendotélio, induz a produção de citocinas pro-inflamatórias, moléculas quimiotáticas para monócitos (CCL2) e moléculas de adesão resultando num estado de ativação endotelial. Essa ativação endotelial, por sua vez, precede a disfunção endotelial. Assim, a LDLox também é reconhecidamente indutora do estresse oxidativo, particularmente por promover a produção de ROS (Gao *et al.*, 2013; Mudau *et al.*, 2012).

O aumento das citocinas inflamatórias desencadeado pela LDLox pode também ativar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), desencadeando um aumento excessivo de óxido nítrico. O óxido nítrico produzido pela iNOS está altamente envolvido com a disfunção endotelial e aterogênese. Associado à elevada síntese de NO, a produção de superóxido também é elevada por estímulo da LDLox, devido a ativação da NADPH oxidase. Nos primeiros estágios da aterosclerose, a NADPH oxidase localizada no endotélio é a principal fonte de superóxidos. Os radicais superóxidos reduzem a biodisponibilidade de NO por promover sua oxidação, formando peroxinitrito (ONOO^-) que, por sua vez, constitui-se um poderoso agente oxidante. Desse modo, a LDLox pode ser responsável não somente pelo aumento do NO a concentrações excessivas, mas também pela sua oxidação e geração de peroxinitrito vascular (Kawashima *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009).

IV- Sistema antioxidante

O organismo contém antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam como uma unidade complexa de regulação das ROS. Enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase são importantes para a remoção de espécies reativas a fim de evitar o estresse oxidativo (Powers *et al.*, 2008; Trachootham *et al.*, 2008).

A superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido (O_2^-), transformando-os em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Existem três isoformas nos mamíferos que catalisam a reação de dismutação dos íons superóxidos sendo todas ligadas a um metal de transição no sítio ativo para realizar sua ação. A CuZnSOD está localizada no citoplasma, a MnSOD na mitocôndria e a SOD extra celular (ecSOD) localiza-se no espaço extra celular e também apresenta como cofator Cu e Zn. As três isoformas também são conhecidas como SOD1, SOD2 e SOD3, respectivamente (Afonso *et al.*, 2007; Heistad, 2006; Powers *et al.*, 2008).

A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos para água e álcool. A redução do H_2O_2 , ocorre pela conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSH) que é catalisada pela GPx. A ação da GPx é particularmente importante na mitocôndria, uma vez que outra enzima capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio, a catalase, encontra-se nos peroxissomos (Lu, 2009; Powers *et al.*, 2008; Trachootham *et al.*, 2008).

2.6- Apoproteína E (apoE) e Modelo murino de aterosclerose

A apoproteína E (apoE) é uma glicoproteína sintetizada principalmente no fígado (mas também em macrófagos e no cérebro) e está presente em todas lipoproteínas plasmáticas, com exceção da LDL, e serve como ligante de receptores de lipoproteínas na superfície celular. Esses receptores pertencem à família de Receptores de LDL (LDLr), sendo que os receptores que se ligam à apoE são os receptores 2 de apoE (apoEr2), VLDLr e LDLr. A apoE, então, participa da captação de partículas aterogênicas como remanescentes de VLDL e Quilomícrons demonstrando sua importância no *clearance* de colesterol e, portanto, na proteção cardiovascular (Imaizumi, 2011; Meir *et al.*, 2004). Além do transporte reverso de colesterol, a apoE também é antioxidante e anti-inflamatória, reduz a agregação plaquetária, aumenta o efluxo de colesterol de macrófagos e está envolvida na inibição da proliferação de linfócitos T (Greenow *et al.*, 2005).

Um número substancial de estudos em aterosclerose tem sido realizado em diferentes modelos animais, particularmente, em camundongos geneticamente modificados (Ohashi *et al.*, 2004). Os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose, tendo como principal fator as elevadas concentrações sanguíneas das lipoproteínas HDL, uma vez que são responsáveis pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático em camundongos, o que difere dos seres humanos nos quais as principais carreadoras de colesterol são as LDL, com 65-85% (Breslow, 1996; Fazio *et al.*, 2001; Hofker *et al.*, 1998; Neuzil *et al.*, 1998). Outras características que diferem os camundongos dos humanos são: ausência da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) no plasma de camundongos (em humanos, essa proteína transfere ésteres

de colesterol da HDL para VLDL e transfere triglicerídeos na direção oposta), lipase lipoprotéica solúvel em camundongos ligada a membrana em humanos, reduzida síntese de apo B-100 em camundongos, alta eficiência da apo E murina no que diz respeito à remoção de lipoproteínas remanescente, quando comparada à apo E humana (Fazio *et al.*, 2001). Apesar dessas diferenças, camundongos e humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Hofker *et al.*, 1998).

A deficiência da apo E em camundongos modificados geneticamente leva ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. A ausência desta apoproteína resulta em níveis elevados de colesterol devido à remoção defeituosa das QM e VLDL remanescentes. Assim, a elevação dessas lipoproteínas remanescentes no plasma constitui o estímulo aterogênico nesses animais (Breslow, 1996; Meir *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1992). Essas lesões têm sido extensivamente caracterizadas e apresentam semelhanças com as encontradas em humanos (Palinski *et al.*, 1994).

Os animais *apoE*^{-/-} possuem elevada hipercolesterolemia e desenvolvem estrias gordurosas na aorta espontaneamente. As lesões são exacerbadas pelo consumo de dietas aterogênicas, ricas em gorduras e colesterol (Breslow, 1996; Zhang *et al.*, 1992). Nos animais alimentados com dieta comercial, as lesões aparecem como nódulos amarelados em 10 semanas de idade (células espumosas), porém, com 8 semanas, a adesão de células mononucleares e a formação de células espumosas já podem ser observadas. A placa fibrosa aparece com 20 semanas de vida e, em alguns casos, com até 30 semanas ainda predominam as células espumosas (Nakashima *et al.*, 1994).

Os camundongos *apoE*^{-/-} contêm componentes celulares e uma sucessão de lesões similares às observadas durante a aterogênese humana, tornando-se um

modelo importante para o estudo dos vários fatores que controlam ou influenciam o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Moghadasian *et al.*, 2001; Nakashima *et al.*, 1994). Além disso, a ausência da apoE confere a esses animais um elevado estado oxidativo e inflamatório basal o que propicia um bom modelo para estudo do estresse oxidativo e inflamação envolvida no desenvolvimento da aterosclerose (Pereira *et al.*, 2012; Vasquez *et al.*, 2012).

3- Justificativa

Estudos realizados no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) têm confirmado as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do butirato de sódio em modelo experimental de doença intestinal (colite ulcerativa) e de mucosite intestinal (Ferreira *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2012), bem como da tributirina que é um triglicérideo constituído de três moléculas de ácido butírico (Leonel *et al.*, 2012b). Adicionalmente, a propriedade do butirato em induzir apoptose foi demonstrada em macrófagos murinos (Ramos *et al.*, 2002).

O conjunto de propriedades do butirato abordadas aqui apontam para vários possíveis efeitos benéficos desse nutriente no sistema cardiovascular. Dentre eles estão seu efeito hipocolesterolêmico, anti-inflamatório, antioxidante e no aumento da sensibilidade à insulina. Diante disso, percebe-se ser promissora a capacidade desse ácido graxo em atuar benéficamente no desenvolvimento da aterosclerose.

4- Objetivos

4.1- Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação oral com butirato de sódio no desenvolvimento da aterosclerose *in vivo*, em camundongos deficientes na apoproteína E (ApoE^{-/-}), bem como os mecanismos de tais efeitos *in vitro*.

4.2- Objetivos específicos

A- In Vivo

Com a finalidade de comparar os efeitos da ingestão de butirato em relação ao controle, os objetivos específicos *in vivo* são:

- Acompanhar o consumo alimentar e a evolução ponderal dos animais;
- Avaliar o perfil lipídico;
- Avaliar a homeostase da glicose;
- Verificar o número total e diferencial de leucócitos sanguíneos;
- Avaliar o desenvolvimento da aterosclerose;
- Verificar a estabilidade da placa aterosclerótica (deposição de colágeno e MMP2);
- Avaliar o infiltrado de macrófagos e a presença de moléculas quimiotáticas para monócitos (CCL2) e moléculas de adesão (VCAM-1) na válvula aórtica;
- Mensurar a formação de superóxido e peroxidação proteica na válvula aórtica
- Analisar a peroxidação lipídica no fígado, bem como a atividade das enzimas antioxidantes;

- Verificar a produção sérica de autoanticorpos anti-LDLox;
- Avaliar o efeito *ex vivo* da suplementação com butirato sobre a produção de ROS por macrófagos peritoneais.

B- In vitro

Com a finalidade de comparar os efeitos do pré-tratamento com butirato sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo *in vitro*, os objetivos específicos são:

- Avaliar a expressão e secreção de moléculas inflamatórias em células endoteliais;
- Analisar a expressão e atividade do NF-kB em células endoteliais;
- Verificar a expressão de CD 36 e captação de LDLox em macrófagos peritoneais;
- Analisar a produção de ROS e NO, bem como a expressão de iNOS em macrófagos peritoneais;
- Avaliar a expressão de NADPH oxidase-p22phox em células endoteliais;
- Verificar a expressão da superóxido dismutase e catalase em células endoteliais.

5- Materiais e Métodos

5.1- Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos machos deficientes na apolipoproteína E (*ApoE*^{-/-}), com 6-8 semanas de idade, divididos em dois grupos: grupo Controle e Butirato. O experimento foi desenvolvido durante dez semanas, sendo a dieta e água disponibilizadas *ad libitum* (Figura 4).

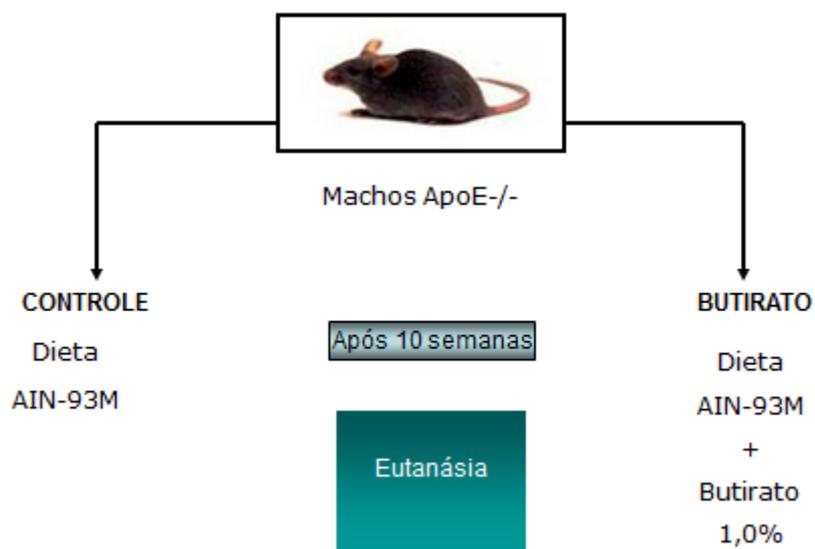


Figura 4- Desenho experimental.

Os animais foram obtidos do Biotério Ênio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde também foram mantidos durante o período experimental.

Os animais foram separados homogeneamente de acordo com peso inicial. Ao término do período experimental e jejum noturno, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (xilazina-quetamina, 12mg/kg e 75mg/kg de peso corporal, respectivamente) para coleta de sangue pelo plexo inguinal e distribuído em tubo sem anticoagulante, para obtenção de soro, e com anticoagulante (contendo fluoreto

de sódio como antiglicolítico), para obtenção de plasma. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 6.000rpm durante 5 minutos para a separação do soro e plasma.

Após a eutanásia, foram retirados fígado, coração e aorta, após perfusão com salina tamponada com fosfato (PBS), e os mesmos foram armazenados a -80°C, para análises posteriores.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): n° do protocolo 47/2010.

5.2- Preparo das dietas

Foi utilizada dieta padrão para camundongos AIN-93M sem butirato de sódio (Grupo Controle) ou suplementada com 1% de butirato de sódio (Grupo Butirato), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Composição das dietas ofertadas aos animais, baseadas na dieta padrão (AIN-93M), controle ou suplementada com 1% de butirato de sódio

INGREDIENTES	AIN Controle (gramas)	AIN Butirato (gramas)
Amido de milho ¹	465,692	465,692
Caseína ²	140,0	140,0
Sacarose	100,0	100,0
Matodextrina	155,0	155,0
Óleo de soja ³	40,0	40,0
Celulose	50,0	50,0
Mix de minerais ⁴	35,0	35,0
BHT	0,008	0,008
Mix de vitaminas ⁴	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Metionina	1,8	1,8
Butirato de sódio	-	10,0

¹ Milhena, Emifor Indústria de Alimentos S.A.

² Proquimios

³ Liza, Cargill Agrícola S.A.

⁴ Rhoster, Indústria e Comércio LTDA

O butirato de sódio adicionado à dieta foi preparado com ácido butírico (Sigma Chemical). Uma solução aquosa (100mL) contendo 10,0g de ácido butírico teve o pH ajustado para 7,2, com hidróxido de sódio e, então, adicionada a 1kg de dieta.

5.3- Verificação do consumo da dieta

Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas foram pesadas semanalmente. O restante de dieta ofertada foi quantificado pela soma da sobra e o resto no fundo da gaiola (obtido por peneiração da maravalha). A diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido forneceu o consumo semanal de dieta. O valor obtido foi, então, dividido pelo número de animais por gaiolas. O número de animais por gaiola variou entre 1 e 2.

5.4- Avaliação da variação ponderal

Os camundongos foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução ponderal. O ganho de peso corporal total foi obtido pela diferença entre peso final e peso inicial. O ganho de peso foi também calculado em percentual.

5.5- Verificação de possíveis alterações hepáticas

A enzima gama glutamil transpeptidase (Gama GT) é um sensível indicador de alterações hepáticas. Portanto foram medidos os níveis séricos de Gama GT a fim de avaliar se a dose ingerida de butirato poderia causar dano hepático. A dosagem foi realizada utilizando kit comercial (Bioclin, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

5.6- Avaliação do perfil lipídico sérico

O perfil lipídico dos animais foi avaliado por meio da obtenção dos níveis bioquímicos séricos do Colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c), Colesterol não-HDL (n-HDL), razão n-HDL/HDL-c e Triglicerídeos (TG).

O CT, HDL-c e TG foram dosados utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil) segundo orientações do fabricante. O Colesterol n-HDL foi obtido pela diferença entre CT e HDL-c.

5.7- Avaliação da homeostase da glicose

Devido a associação entre Diabetes e Resistência à Insulina com o desenvolvimento da aterosclerose, nós investigamos a homeostase da glicose após a ingestão ou não de butirato. A homeostase da glicose foi avaliada pela dosagem da glicemia de jejum ao término do experimento, Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG) e Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI). O TTOG e o TSI foram realizados previamente à eutanásia dos animais.

Os níveis de glicose no plasma foram dosados por meio do kit enzimático Labtest (Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

O TTOG, juntamente com o TSI, é usado para estimar a resistência insulínica, e foi realizado conforme descrito anteriormente por Santos e colaboradores (Santos *et al.*, 2008). Para o TTOG os animais foram deixados em jejum, por 6 horas. Em seguida, os animais receberam solução de D-glicose, 2g/kg de peso corporal, por gavagem. Foi feita a leitura da glicemia, com auxílio de um glicosímetro Advantage,

nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem. Para tal, foi retirada uma gota de sangue caudal. A glicemia foi dada em mg/dL.

O TSI foi realizado com os animais em estado alimentado. Foi injetado intraperitonealmente 0,75 unidades de insulina por kg de peso do animal e, em seguida feita a leitura da glicemia, com auxílio de um glicosímetro Advantage (Accu-CHEC Performa), nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos após a injeção, retirando-se uma gota de sangue caudal. A glicemia foi dada em mg/dL.

5.8- Contagem total e diferencial de leucócitos

No dia do sacrifício foi retirado sangue caudal para contagem de leucócitos totais no sangue. Ao sangue retirado foi adicionado o corante Turk, responsável pela lise de eritrócitos, numa diluição de 1:10 e a contagem foi feita em câmara de Neubauer, sendo contadas as células presentes nos quatro quadrantes externos. Após a contagem, o número total de leucócitos foi dado pela fórmula:

$$n^{\circ} \text{ total de leucócitos} = \text{somatório do } n^{\circ} \text{ de células nos quadrantes} \times 2,5 \times 10$$

Sendo 10 o fator de diluição e 2,5 o fator relacionado à área e altura da câmara.

Para a contagem diferencial de leucócitos no sangue foi feito o esfregaço e, em seguida, corado pelo kit Panótico Rápido (LaborClin, Pinhais, PR), e levado ao microscópio para observação. A avaliação da lâmina foi feita com objetiva de 100x. A contagem de células foi realizada da metade para o fim da borda do esfregaço, em zigue-zague, totalizando a contagem de 100 células, entre neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos.

5.9- Avaliação da aterosclerose

Para avaliar o desenvolvimento da aterosclerose foi quantificado o percentual da área da aorta acometida pela lesão aterosclerótica e a área da lesão na válvula aórtica. Na válvula foi feita também a caracterização das lesões quanto à presença de MMP2 e deposição de colágeno. Como parâmetros inflamatórios foi quantificado a presença de CCL2, quimiotática para monócitos, e da molécula de adesão VCAM-1 na válvula aórtica.

5.9.1-Percentual da aorta acometida por lesão aterosclerótica

Para avaliação da deposição lipídica, cada aorta foi cuidadosamente retirada, dissecada removendo toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca e, em seguida, lavada em PBS e armazenada a -80° para quantificação da placa através da coloração em Sudan IV.

Para a coloração, as aortas foram abertas longitudinalmente e fixadas *overnight* com solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 μ mol/L de BHT, e 2 μ mol/l EDTA, pH 7,4) a 4 $^{\circ}$ C. Depois de fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante cinco minutos para desidratação e, posteriormente, coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, e 50% de acetona. Em seguida, as aortas foram descoradas por cinco minutos em solução de etanol 80%, de maneira que apenas as placas de gordura permanecem coradas, devido à afinidade do Sudan IV por lipídeos (Palinski *et al.*, 1994).

As imagens das aortas coradas com Sudan IV foram capturadas por scanner e digitalizadas em computador. O programa analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA) foi utilizado para obtenção das medidas.

O cálculo das lesões nas aortas foi realizado considerando a porcentagem da lesão em relação à área total da aorta.

5.9.2-Lesões ateroscleróticas na válvula aórtica

Os corações foram retirados e cortados na linha mediana, sendo utilizada a parte proximal, onde se localiza a válvula aórtica. Esta foi primeiramente fixada em solução de formol 10% por cinco horas e, em seguida, transferida para uma solução de sacarose a 30% em salina fisiológica por 24 horas, para desidratação do tecido. O tecido foi, então, incluído em Tissue Freezing Medium (Jung **Tissue Freezing Medium**; Leica Microsystems, Wetzlar - Germany) e cortados em criostato (secções de 10µm). Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina. Esse material foi, então, codificado, examinado e submetido à análise morfométrica das lesões. Para isso, foram selecionados 10 cortes, amostrando uma extensão média de 250-300µm, com as estruturas anatômicas referenciais da válvula aórtica, cujas imagens foram capturadas (aumento de 100x) e a medida das áreas de lesão feita com o auxílio do software analisador de imagens Image-Pro Plus. O cálculo da lesão média/animal foi feito somando-se todas as medidas dos 10 cortes, representando o valor da área da lesão.

5.9.3- Avaliação da deposição de colágeno e presença de MMP-2 na válvula aórtica

A deposição de colágeno e presença de metaloproteinase-2 de matriz extracelular (MMP-2) na válvula aórtica foram analisadas por imunofluorescência. Simplificadamente, o procedimento consistiu em fixar os cortes com acetona por 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavar as lâminas com PBS, foi realizado a permeabilização e bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA a 4% em PBS 1x), por 1h à temperatura ambiente. Procedeu-se, então a incubação com o Anticorpo primário (overnight a 4°C). No dia seguinte, após lavar as lâminas, foi aplicado os anticorpos secundários (incubação por 2h, no escuro à temperatura ambiente). As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência NIKON do Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG (CEMEL) e a intensidade de fluorescência analisada com o auxílio do software analisador de imagens Image-J. A quantidade de colágeno e MMP2 é dada em porcentagem por área de lesão.

5.9.4- Avaliação do infiltrado de macrófagos (MOMA), presença de moléculas quimiotáticas para monócitos (CCL2) e moléculas de adesão VCAM-1 na válvula aórtica

A válvula aórtica foi analisada quanto ao infiltrado da monócitos/macrófagos, e à presença de CCL2 e VCAM-1 na placa aterosclerótica por imunofluorescência. O procedimento foi realizado como descrito no item anterior.

5.9.4- Avaliação da formação de superóxido e peroxidação proteica na válvula aórtica

Como parâmetros de estresse oxidativo, foi realizada a análise da produção de superóxido nas lesões por fluorescência com Dihydroethidium (DHE, 10mM), que forma o composto fluorescente ethidium após oxidação por O_2^- (Carter *et al.*, 1994), bem como a formação de nitrotirosina, por imunofluorescência. Para a fluorescência, os cortes foram lavados 3x com PBS e, em seguida, colocado a sonda DHE (10mM) por 45min. à 37°C. Para a imunofluorescência, os cortes foram fixados em acetona gelada por 20 minutos. A permeabilização e bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA a 4% em PBS 1x) foram feitas por 1h antes da incubação overnight com o anticorpo primário (*mouse*-monoclonal anti-nitrotirosina, Santa Cruz). Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário por 2h no escuro e, após lavagem com PBS 1x, recobertas com meio de montagem contendo DAPI. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência NIKON e analisadas com o auxílio do software analisador de imagens Image-J. O resultado foi expresso como intensidade de fluorescência por área de lesão.

5.10- Avaliação da peroxidação lipídica e atividade de SOD e Catalase hepática

Para avaliação do estresse oxidativo, foi analisada a peroxidação lipídica no fígado, e dosadas a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase.

5.10.1- Peroxidação lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica, procedeu-se a determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais, na qual é possível realizar a medida de malondialdeído (MDA). Foi também realizada a dosagem de hidroperóxidos.

A- Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS

A formação de malondialdeído (MDA), resultante da quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é um conveniente índice para se determinar o grau de peroxidação lipídica. O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA, formando um aduto na proporção de 2:1, sendo este detectado espectrofotometricamente a 535nm (Figura 5).

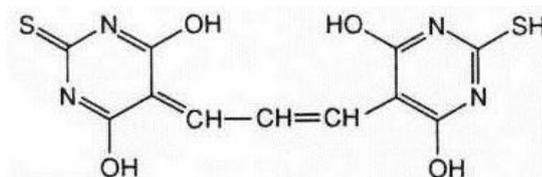


Figura 5- Fórmula molecular do aduto formado na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído na técnica de TBARS. Sua coloração róseo-alaranjada é detectável espectrofotometricamente a 535nm.

Fonte: (Buege *et al.*, 1978).

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo o método já anteriormente descrito (Buege *et al.*, 1978; Wallin *et al.*, 1993). Para tal, o homogenato do fígado foi obtido triturando-se 100mg de tecido em 1mL de PBS (pH = 7,4). Uma alíquota de 500 μ L do homogenato foi misturada a 1mL da solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0.38% (p/v) e

HCl a 0.25N. A mistura foi aquecida em banho-maria fervente por um período de 15 minutos. Após resfriamento em água corrente, adicionou-se 1,5mL de butanol, para extração do cromóforo, e a mistura foi centrifugada a 3.000rpm por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 535nm e o resultado foi normalizado pela concentração de proteínas, dosada pela técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

B- Dosagem de hidroperóxidos

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (Banerjee *et al.*, 2002; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994). O indicador utilizado é o Xilenol Orange, que se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado. Os homogenatos de tecidos foram centrifugados a 12000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise de hidroperóxidos. A mensuração foi realizada em microplaca. No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX (ferrous oxidation in xylene orange - preparada pela dissolução do xilenol orange e do sulfato ferroso amoniacal em 250mM de H_2SO_4 para uma concentração final de 1 e 2,5mM, respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol grau-HPLC contendo 4,4mM de BHT, obtendo-se o reagente FOX-2.

Para as dosagens, foram utilizados 20 μL de amostra acrescida de 180 μL do reagente FOX-2 (diretamente na microplaca) em triplicata, seguidos de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a absorbância foi lida a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Adicionalmente, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com Trifenilfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (não-H₂O₂), já que a presença ou a ausência de TPP indica o teor de H₂O₂ da amostra (Banerjee *et al.*, 2002; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994).

Em 15µL de amostra foram adicionados 5µL de TPP a 10mM (a TPP foi diluída em metanol), diretamente na microplaca, em duplicata e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foram acrescentados 180µL do reagente para FOX-2 em cada poço. Após 30 min., a absorbância foi lida a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

O Xilenol Orange ao se ligar aos íons férricos produz um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção de $1,5 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$ a 560nm. A concentração de hidroperóxidos pode ser estimada uma vez que o coeficiente de extinção dos hidroperóxidos é de $4,3 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$ a 560nm. Concentrações inferiores a 1µM podem ser detectadas.

Para quantificar os hidroperóxidos da amostra foram subtraídas as dosagens com TPP daquelas sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra) que pode ser expressa em absorbância ou em µmolar. O resultado foi normalizado pela quantidade de proteínas (por amostra) dosadas pela técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

5.10.2 -Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes

Para avaliar se o efeito antioxidante da dieta contendo butirato de sódio teve alguma relação com a atividade de enzimas antioxidante, foi quantificada a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase nos fígados dos animais.

A- Determinação da atividade de superóxido dismutase

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em catalisar a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-), à H_2O_2 e O_2 , diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogallol (Dieterich *et al.*, 2000).

A técnica consiste em homogeneizar o tecido em tampão fosfato (50mM). 30 μ L de homogenato foi plaqueado em placa de 96 poços e acrescido de 99 μ L de tampão fosfato, 6 μ L de MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 μ L de pirogallol. Para o branco, o pirogallol foi substituído por tampão fosfato e para o padrão, a amostra foi substituída por tampão fosfato. Após cinco minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada com 150 μ L de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância foi lida a 570nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a autooxidação de 50% de pirogallol do padrão. O resultado foi expresso em Unidades por mg de proteína (U/mg proteínas).

B- Determinação da atividade de catalase

A dosagem da atividade de catalase se baseia no decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – (A_{240}) pela decomposição deste pela catalase ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (Nelson *et al.*, 1972).

Resumidamente, 25µL de homogenato de tecido em tampão fosfato (50mM) diluído (1:25) foram acrescentados a 1mL de tampão fosfato 50mM em uma cubeta de quartzo. Foram acrescentados 25µL de solução de H₂O₂ 0,3M e lida a absorbância (A₂₄₀) durante um minuto. Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado é expresso por concentração de proteína (Atividade/mg de proteína), dosada pelo método de Lowry et al. (1951).

5.11- Avaliação da produção sérica de autoanticorpos anti-LDL oxidada

Como medida indireta da oxidação sérica de LDL, foi investigada a produção de autoanticorpos anti-LDLox no soro dos animais. Primeiramente, procedeu-se o isolamento e oxidação da LDL para a realização do ensaio.

I- Separação da LDL

Após a coleta de 10mL do sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante, em tubo *vacutainer* com EDTA 10%, procedeu-se a centrifugação a 3.000rpm por dez minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Excelsa Baby, mod. 205N). O plasma foi coletado e adicionado os conservantes: aprotinina, benzamidina 2mM, solução de azida sódica 5% com EDTA 5% e clorafenicol 0,1% e, por fim, o PMSF 0,5mM em DMSO. O plasma teve sua densidade elevada para 1,21 (densidade da lipoproteína HDL) com solução de Brometo de potássio (KBr). Três mililitros deste plasma foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10mL, próprios para ultracentrífuga Sorvall Ultra pro-80/Du Pont, utilizando o rotor

875T. Após o plasma, foi adicionada a solução de KBr de densidade 1,006 até completar o volume total do tubo, formando assim o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos devidamente equilibrados foram colocados para centrifugação por duas horas e meia a 50.000rpm e 4^oC, para separação das lipoproteínas de alta densidade. Terminada a rodada, foi retirada a camada composta pela LDL e a amostra foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS), por um período de vinte e quatro horas a 4^oC, com três trocas do tampão. Em seguida, o material foi filtrado e guardado estéril em atmosfera de nitrogênio a 4^oC, em recipiente protegido da luz (Chung *et al.*, 1986).

II- Oxidação da LDL

Para a oxidação da LDL foi acrescido CuCl₂ a 1mM, para concentração final de 5µM. Após 3 horas e 30 minutos de oxidação, a 37^oC, sob agitação constante e envolto em papel alumínio, a reação foi finalizada com EDTA 0,5M (proporção de 2 EDTA: 1 CuCl₂).

III- Ensaio de ELISA para detecção de IgG anti-LDLox

As Imunoglobulinas foram dosadas pelo ensaio de ELISA (Lee *et al.*, 1999), descritos resumidamente:

Microplacas de poliestireno (Nunc, Maxisorp, Denmark) foram incubadas 24 horas, em temperatura ambiente, com 100µL/poço de solução do antígeno (LDL oxidada e nativa, com concentração proteica de 50µg/mL). Após o período de sensibilização, as placas foram incubadas por uma hora à 37^o, com 200µL de uma

solução BSA 1,0% em PBS, por poço, para bloqueio. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas foram lavadas 5 vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA). Em seguida, 100µL/poço das amostras de soro (diluído 1:10) foram incubadas a temperatura ambiente, overnight. As placas foram lavadas cinco vezes com salina-Tween 0,05% e incubadas, por duas horas a 37°C, com 100µL de uma solução de IgG conjugado à peroxidase, na diluição 1:5000. As placas, após serem lavadas, foram incubadas no escuro, com 100µL de uma solução de tampão citrato (10mL, pH=5,0) contendo 40µl de H₂O₂ e 10mg do substrato ortofenileno-diamino (OPD). Após trinta minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 30µL/poço de H₂SO₄ 1:20. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492nm por leitor automático (Model 450 microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Os resultados foram obtidos pelo cálculo da média das repetições da LDL oxidada subtraída pela LDL nativa em cada grupo experimental, sendo o resultado final dado em unidades arbitrárias.

5.12- Avaliação *ex vivo* da suplementação com butirato na produção de ROS por macrófagos peritoneais

Para verificar o efeito do butirato na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais, foi realizado um estudo *ex vivo* (Aguilar et al., 2012).

Camundongos ApoE^{-/-} foram submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato por 4 semanas. Após esse período, foi injetado tioglicolato (2mL, a 3%), intraperitonealmente, nos animais e após 4 dias, os mesmos foram sacrificados e os

macrófagos peritoneais retirados com RPMI incolor gelado e estéril. Após centrifugação, o RPMI sobrenadante foi descartado e os macrófagos ressuspensos em 3 mL de meio de cultura para contagem das células. Para medir a produção de ROS, os macrófagos foram plaqueados em triplicata/animal numa concentração de 1×10^6 células por poço, e submetidos a estímulo com zymosan (partículas derivas da parede celular de fungo, ricas em β -glucana, que são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos ativando a produção de ROS). Como reagente foi utilizado luminol e a luminescência foi lida por 90 minutos em intervalos de 60 segundos. A produção basal de ROS também foi acompanhada plaqueando os macrófagos sem uso de estímulo. Após subtração da absorbância do estimulado pelo basal, a área sob a curva da produção de ROS foi calculada.

5.13- Avaliação da inflamação *in vitro*

Como a inflamação é parte fundamental no desenvolvimento da aterosclerose, foi investigado o efeito anti-inflamatório do butirato de sódio *in vitro* em células endoteliais e macrófagos peritoneais estimulados com LDL oxidada, agente fundamental desencadeador da aterogênese.

I- Cultura de células

Células endoteliais da veia umbilical humana (EA.hy926) foram utilizadas para a realização de experimentos *in vitro* como o objetivo de investigar o efeito do estímulo com LDLox nessas células pré-tratadas com butirato de sódio. Foram realizados experimentos *in vitro* para Imunofluorescência e *Western blot* das células e o sobrenadante utilizado para dosagem de citocinas por ELISA.

A- Distribuição das células

Foram utilizadas placas para cultura celular de 6 poços. Lamínulas estéreis foram colocadas em cada poço. Em seguida as células foram distribuídas na placa numa concentração de 1×10^6 células/poço, em meio de cultura DMEM completo e com estreptomicina e penicilina (10unid/mL).

B- Pré-incubação com butirato e estímulo

As células foram incubadas com solução de butirato de sódio (esterilizada em filtro de $0,45\mu\text{m}$) nas concentrações 0,1; 0,5 e 1,0mM nos respectivos poços, por 2h. Após 2h, o meio de cultura foi substituído pelo meio sem butirato e efetuado o estímulo por 4h com LDLox ($50\mu\text{g/mL}$). Após o período de estímulo o sobrenadante foi coletado e foi, então, realizada imunofluorescência nas células ou western blot no lisado celular.

C- Avaliação da expressão de CCL2, VCAM-1 e CD36 em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato

Simplificadamente, o procedimento consistiu em fixar as células (na própria placa de cultura) com paraformaldeído 4% em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente. Após lavar com PBS, foi fixado com metanol gelado por 1min. para ajudar na permeabilização das células. Foi, então, realizada a permeabilização e bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA a 4% em PBS 1x), por 10min. à temperatura ambiente.

Procedeu-se, então a incubação com o Anticorpo primário por 1h à temperatura ambiente. Foram utilizados anticorpos anti-VCAM-1 (camundongo anti-humano, Santa Cruz), anti-CCL2 (coelho anti-humano; Santa Cruz) e CD36 (camundongo anti-humano; BioSource). Em seguida (após lavar com a solução de bloqueio) foi aplicado os anticorpos secundários (Alexa 488 anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho, respectivamente) e mantido por 30min. no escuro à temperatura ambiente). As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência NIKON do Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG (CEMEL) e analisadas com o auxílio do software analisador de imagens Image-J. A expressão das proteínas analisadas é dada em porcentagem.

D- Determinação da secreção de citocinas por células EA.hy926 pré-incubadas com butirato

Para confirmar o efeito anti-inflamatório do butirato de sódio em células estimuladas com LDLox, foram determinadas as concentrações de TNF, IL-6, IL-1 β e IL-10 no sobrenadante da cultura celular, por Elisa. Os experimentos foram conduzidos com estímulo por 4 e 24h com LDLox (50 μ g/mL), após pré-incubação com butirato (0,5mM). Para os ensaio de ELISA foram utilizados kits comerciais (BD Biosciences – BD OptEIA), seguindo as instruções do fabricante.

E- Expressão proteica de NF- κ B e I κ B em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato

A cultura celular para determinação da expressão proteica da subunidade p65 do NF- κ B e do I κ B por *Western blot* foi realizada como descrita anteriormente. No entanto, o pré-tratamento com butirato de sódio foi realizado apenas na concentração de 0,5mM e estímulo com LDLox por 4 horas.

Western blot: Após o período de incubação, as células foram lisadas em tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de *cocktail* de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma), na proporção de 10⁶ células para 150 μ l de tampão de lise enriquecido com o *cocktail* de inibidores de proteases. O lisado celular foi aliquoteado e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS, pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 20 μ g de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 10%. Após serem separadas no gel de poliácrlamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45 μ m. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (solução de albumina (3%) e Tween (0,1%) em TBS). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico, diluído em 3% de albumina em TBS-Tween

(solução de bloqueio). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: p65 e I κ B (1:1000; monoclonal feito em coelho e cabra, respectivamente; Santa Cruz) e anti- β -actina (diluição 1:2000; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000, IgG-HRP; Sigma, St. Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD®, CA, USA).

F- Atividade de NF- κ B em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato

Para melhor compreender os mecanismos de ação do butirato, além da expressão do NF- κ B e I κ B, foi medida a atividade do fator de transcrição por análise de sua migração para o núcleo. Foi realizada imunofluorescência para p65, p50 e I κ B em células endoteliais EA.hy 926 após pré-incubação com butirato e estímulo com LDLox por 4 horas, segundo protocolos descritos anteriormente. Anticorpo: anti-p65, feito em coelho; p50, feito em camundongo; anti-I κ B, feito em cabra – BioSource)

II- Cultura de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais extraídos de camundongos deficientes em ApoE, 4 dias após injetados intraperitonealmente com tioglicolato (Ramos *et al.*, 2002), foram cultivados em RPMI completo em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço) recobertas com lamínulas estéreis, em cada poço. As células foram pre-tratadas com butirato (0,5mM) por 2h e, então, estimulados com LDLox (50 μ g/mL) por 4h. Após o período de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1x.

A- Avaliação da expressão de CD36 e captação de LDLox em macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato

Após a pré-incubação e estímulo, prosseguiu-se a imunofluorescência (como descrito anteriormente) para detecção de CD36 (*mouse* monoclonal - Santa Cruz, USA) e fluorescência com Vermelho de Nilo (Nile Red) para análise da captação de LDLox (Nile Red: Sigma, Brazil, Ltda).

B- Avaliação da produção de óxido nítrico e expressão de iNOS em macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato

Macrófagos peritoneais foram pré-incubados com butirato por 2h e estimulados com LDLox por 4h. Após fixação, as células foram incubadas com a sonda 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM, 5mM) (Planchet *et al.*, 2006), para mensuração da produção de NO. A oxidação do DAF-FM por NO origina o composto fluorescente triazole. Concomitantemente, macrófagos peritoneais foram também

analisados quanto à expressão de iNOS, por imunofluorescência, após pré-incubação com butirato e estímulo com LDLox. Anticorpo: *mouse* monoclonal anti-iNOS, Santa Cruz.

5.14- Avaliação do estresse oxidativo *in vitro*

Além da inflamação, o estresse oxidativo é outro fator essencial na aterogênese. Assim, foi averiguado o papel do butirato no *status oxidativo* em cultura celular após estímulo com LDLox.

A- Detecção da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato

Após pré-incubação com butirato e estímulo com LDLox (como já descrito), os macrófagos foram investigados quanto à produção de superóxido (O_2^-), com a sonda fluorescente DHE (10mM) (Carter *et al.*, 1994), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH, 10mM) (Carter *et al.*, 1994). A oxidação do DHE por O_2^- forma o composto fluorescente ethidium e a oxidação do DCFH por H_2O_2 origina o composto fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF, 5mM).

B- Avaliação da expressão da NADPH oxidase em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato

Como a produção de ROS durante a explosão respiratória/oxidativa (respiratory/oxidative burst) ocorre por meio da ativação da NADPH oxidase, foi

verificada a expressão protéica da subunidade regulatória p22phox em células endoteliais por western blot (metodologia descrita anteriormente), como medida indireta da atividade dessa enzima. Anticorpos: anti-p22, monoclonal feito em camundongo, e anti- β -actina, policlonal feito em cabra (1:1000, Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, EUA).

C- Avaliação da expressão de SOD e Catalase em células EA.hy926 pré-incubadas com butirato

Devido a associação entre a atividade antioxidante das enzimas SOD e catalase e a proteção contra o estresse oxidativo, a expressão dessas enzimas foi avaliada nas células endoteliais pré-incubadas ou não com butirato e estimuladas com LDLox. Foi, então realizado western blot utilizando os anticorpos anti-SOD1 (policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology), anti-catalase (monoclonal feito em camundongos; Sigma-Aldrich) e anti- β -actina (monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology).

5.15- Métodos estatísticos de tratamento dos dados

Para detecção de *outliers* foi realizado o teste de *Grubbs*. Os dados foram analisados quanto à distribuição pelo teste de *D'Agostino and Pearson*, sendo, posteriormente, os paramétricos submetidos ao teste T de *student*, considerado como significante $p < 0,05$, e os não-paramétricos ao teste de *Mann Whitney*. Os

dados dos experimentos de cultura celular foram submetidos teste *One-way analysis of variance* (One-way ANOVA) com pós teste de Newman-Keuls.

As análises foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego California - USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, para os dados com distribuição normal, e como mediana, quando não paramétricos.

6- Resultados

6.1- Consumo alimentar, peso corporal e avaliação de alterações hepáticas

O consumo semanal de dieta foi avaliado em cada grupo durante o período experimental. Não foi encontrada diferença no consumo entre os grupos Controle e Butirato (Tabela 2).

Tabela 2- Consumo alimentar, peso inicial, peso final, ganho de peso e gama GT dos animais ApoE^{-/-} submetidos a dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas

Parâmetro	Controle	Butirato
Ingestão diária/animal (g)	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,2
Peso inicial (g)	19,4 ± 1,8	19,0 ± 1,2
Peso final (g)	27,5 ± 1,6	27,1 ± 1,8
Ganho de peso (g)	8,1 ± 1,3	9,4 ± 1,2
Gama GT (U/L)	17.6 (4.4)	12.5 (4.4)

Os valores são apresentados como Média ± Erro padrão (n=8/7). (Teste t)

Para acompanhamento da evolução ponderal, os animais foram pesados semanalmente e, ao término do experimento, o ganho de peso total foi obtido pela diferença entre peso final e inicial. Não houve diferença no peso corporal dos camundongos durante o período experimental (Figura 6). O ganho de peso total também foi semelhante entre os grupos Controle e Butirato (Tabela 2).

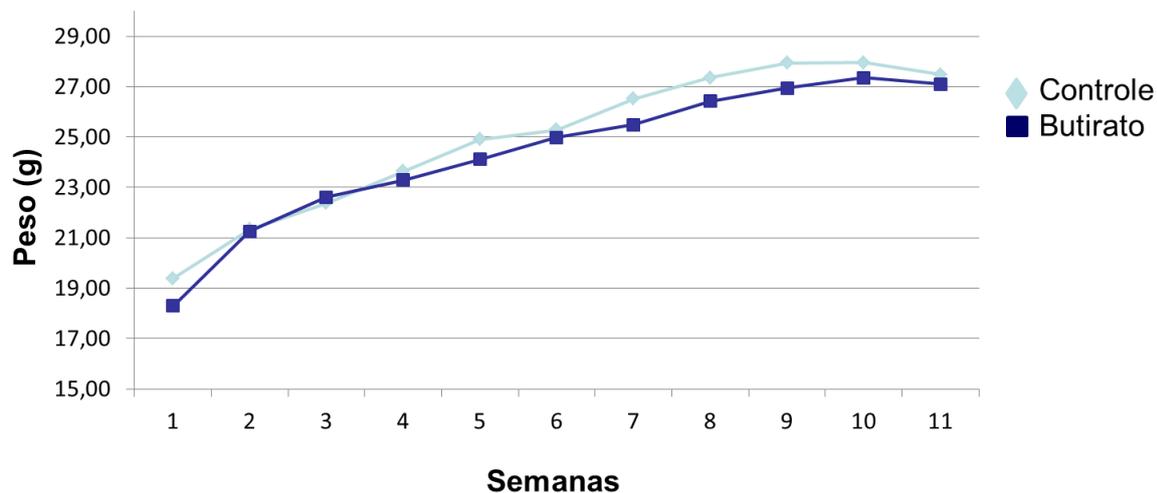


Figura 6- Evolução ponderal dos animais ApoE^{-/-} submetidos a dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas (n= 8/7).

A enzima Gama glutamil transpeptidase, utilizada como marcador de dano hepático também foi semelhante entres os grupos, confirmando que a ingestão de butirato nas doses utilizadas neste estudo são seguras (Tabela 2).

6.2- Metabolismo lipídico e homeostase da glicose

Para avaliação do metabolismo lipídico, foi analisado o perfil lipídico sérico dos animais ao final do experimento. A avaliação da glicemia foi obtida por meio da dosagem dos níveis de glicose no plasma sanguíneo dos animais em jejum. Foi também avaliada a tolerância oral à glicose e a sensibilidade à insulina.

6.2.1- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo

Os níveis elevados de colesterol total nos animais confirmaram o desenvolvimento de hipercolesterolemia em ambos os grupos. Os parâmetros

lipídicos analisados foram iguais entre os grupos Controle e Butirato. A glicemia de jejum também não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo dos animais ApoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas

Parâmetro	Controle	Butirato
Colesterol total (mg/dL)	525 ± 40,2	513 ± 74,6
HDL-colesterol (mg/dL)	24 ± 3,8	22 ± 2,9
Colesterol não-HDL^a (mg/dL)	498 ± 40,7	490 ± 73,9
Razão n-HDL/HDL-c^b	21,5 ± 3,7	23,5 ± 3,8
Triglicerídeos (mg/dL)	58 ± 12,3	70 ± 11,9
Glicose (mg/dL)	113 ± 17,6	121 ± 8,5

Valores apresentados como média ± Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

^a CT – HDL-c (Fração aterogênica). ^bn-HDL/HDL-c.

6.2.2- Tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina

Os animais de ambos os grupos não apresentaram diferença na tolerância oral à glicose. No entanto, o grupo butirato apresentou maior sensibilidade à insulina (Figura 7).

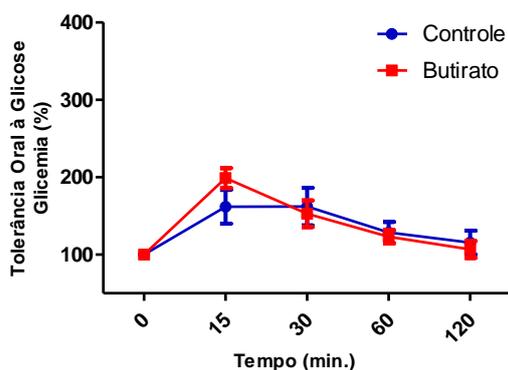
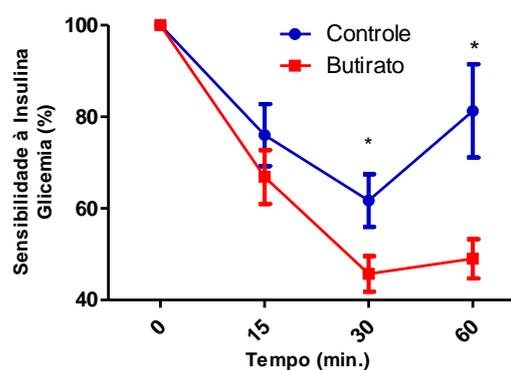
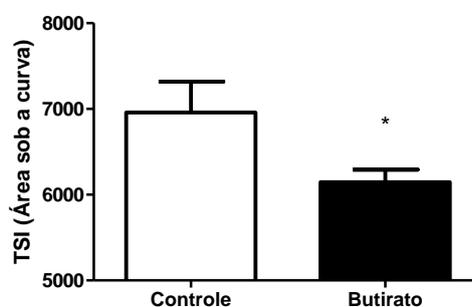
A**B****C**

Figura 7- Teste de tolerância oral à glicose (TTOG - A) e Teste de sensibilidade à insulina (TSI- B) dos animais *apoE*^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Área sob a curva do TSI (C). n=7. *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

6.3- Contagem total e diferencial de leucócitos

O número total de leucócitos não apresentou diferença entre os grupos. A contagem diferencial de leucócitos mostrou que apenas os monócitos estavam aumentados no grupo Butirato em comparação ao grupo Controle (Tabela 4).

Tabela 4- Leucograma sanguíneo dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. n=8/7.

Parâmetro	Controle	Butirato
Leucócitos totais (células/mm³)	19228 ± 2019	20632 ± 2309
Monócitos (%)	3,7 ± 0,9	6,4 ± 0,8*
Neutrófilos (%)	10,4 ± 2,0	13,4 ± 2,3
Linfócitos (%)	73,3 ± 5,6	70,9 ± 3,4
Basófilos (%)	5,0 ± 0,8	5,5 ± 1,0
Eosinófilos (%)	2,5 ± 0,9	2,5 ± 0,8

*Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).

6.4- Avaliação da aterosclerose

O desenvolvimento da aterosclerose foi avaliado por meio da quantificação da área de lesão na aorta e na válvula aórtica.

6.4.1- Medida da lesão aterosclerótica na aorta e válvula aórtica

Na aorta foi encontrada uma relevante redução na área de lesões ateroscleróticas, em cerca de 50%. No entanto, o tamanho das lesões na válvula aórtica foi semelhante entre os grupos Controle e Butirato, podendo-se notar lesões em estágio intermediário, com presença de capa fibrosa e áreas isoladas de deposição de cristais de colesterol (Figura 8).

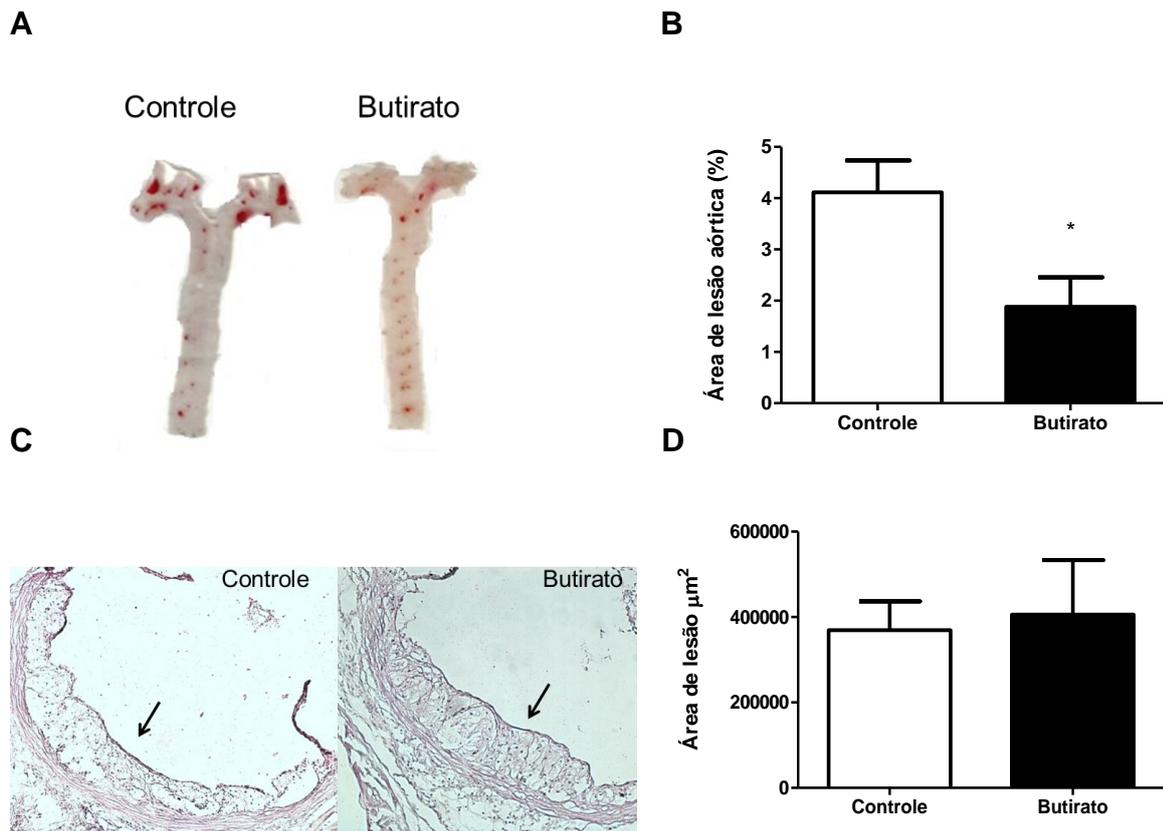


Figura 8- Desenvolvimento da aterosclerose em animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. (A) Aortas contendo lesões ateroscleróticas coradas com Sudan IV. (B) Representação gráfica da área de lesão na aorta. (C) Histologia da válvula aórtica mostrando a área de lesão aterosclerótica (setas). Cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina: aumento de 100x. (D) Gráfico da área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica. Os valores nos gráficos são apresentados como média ± Erro padrão (n=7/6). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).

6.4.2- Análise qualitativa da lesão aterosclerótica

Embora a área de lesão na válvula aórtica seja semelhante, outros parâmetros associados ao desenvolvimento da placa foram analisados.

A presença de colágeno nas lesões ateroscleróticas é um fator importante, principalmente pela constituição da capa fibrosa que confere estabilidade à placa. As metaloproteinases de matriz extracelular possuem efeito prejudicial às lesões ateroscleróticas uma vez que essas enzimas degradam o colágeno, reduzindo, portanto, a estabilidade da placa. Assim, com a finalidade de avaliar a estabilidade das lesões na válvula aórtica foi realizada imunofluorescência para colágeno e metaloproteinase 2 de matriz extracelular (MMP2). Foi observado que o grupo Butirato apresentou maior deposição de colágeno nas lesões que foi associada à redução de MMP2 em comparação ao grupo Controle (Figura 9), sugerindo sua menor degradação.

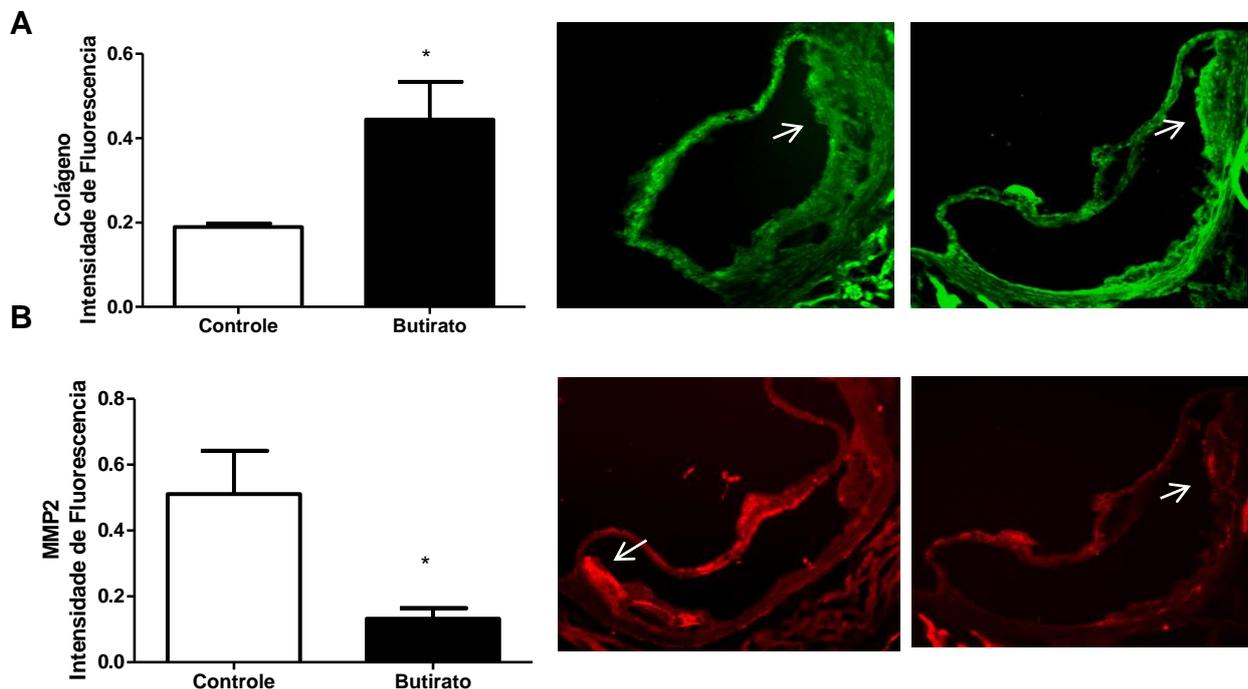


Figura 9- Deposição de colágeno (A) e presença de metaloproteinase 2 de matriz (MMP2 - B) na válvula aórtica dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Representação gráfica dos valores de intensidade de fluorescência apresentados como média ± Erro padrão (n=5/6). As setas indicam as lesões onde pode-se observar a intensidade de fluorescência. *Diferença estatística (p<0,05, test t).

Parâmetros inflamatórios também foram avaliados na válvula aórtica. Foi realizada imunofluorescência para detecção do infiltrado de monócitos/macrófagos, moléculas quimiotáticas para monócito CCL2 e molécula de adesão VCAM-1 nas lesões ateroscleróticas. O grupo Butirato apresentou um perfil menos inflamado já que o infiltrado inflamatório, a presença de CCL2 e VCAM-1 foi menor em relação ao grupo Controle (Figura 10).

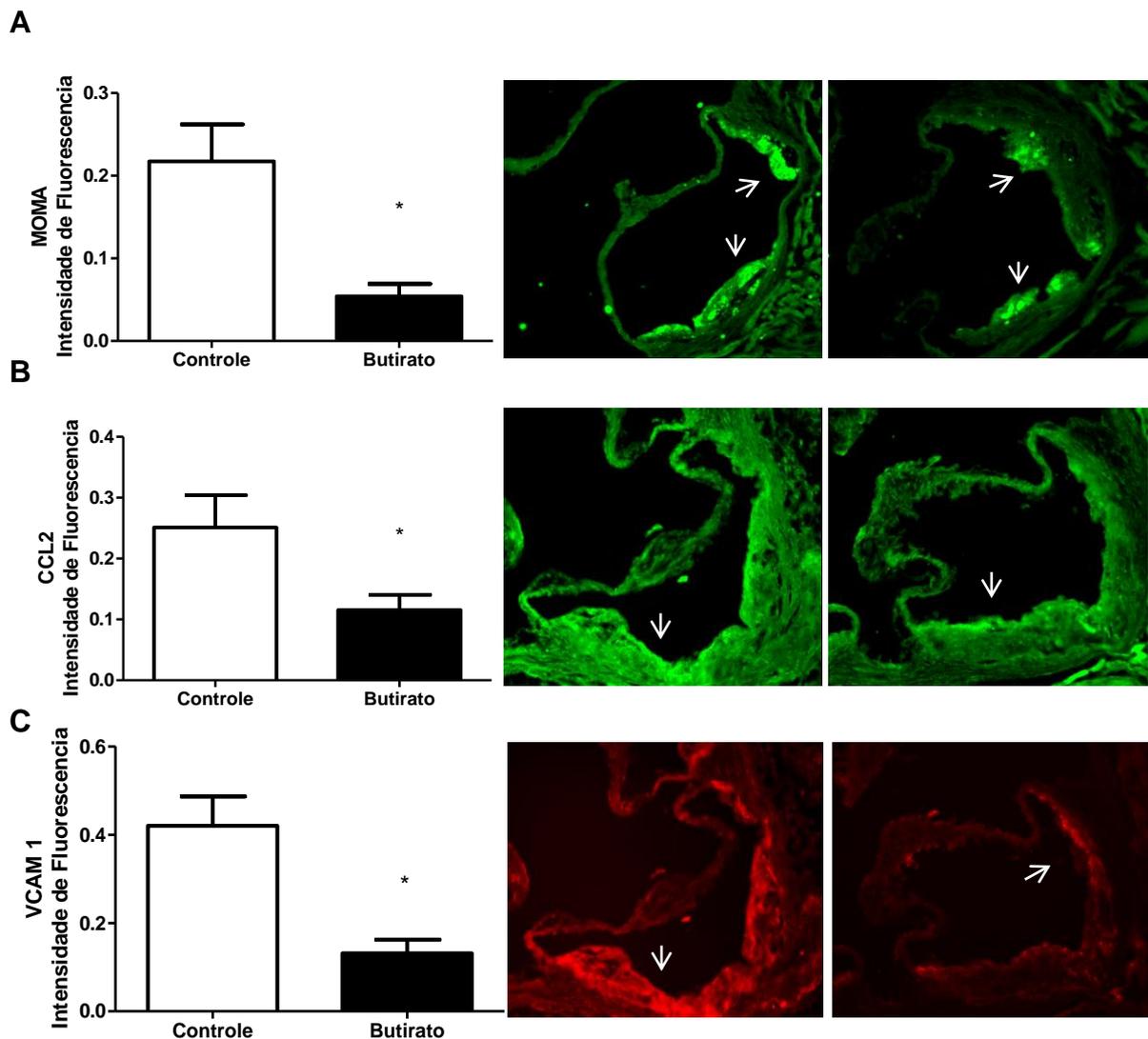


Figura 10- Infiltrado de monócitos/macrófagos (MOMA - A), moléculas quimiotáticas para monócitos CCL2 (B) e de adesão VCAM-1 (C) na válvula aórtica dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Representação gráfica dos valores de intensidade de fluorescência apresentados como média \pm Erro padrão (n=5/6). As setas indicam as lesões onde pode-se observar a intensidade de fluorescência. *Diferença estatística (p<0,05, test t).

6.4.3- Estresse oxidativo na válvula aórtica

Além da inflamação, o estresse oxidativo também foi avaliado nas lesões da válvula aórtica. Notavelmente, a produção de superóxido foi menor nas lesões do grupo Butirato em relação ao Controle. Corroborando esse dado, a formação de nitrotirosina também foi reduzida nas lesões do grupo suplementado (Figura 11), indicando uma menor peroxidação proteica.

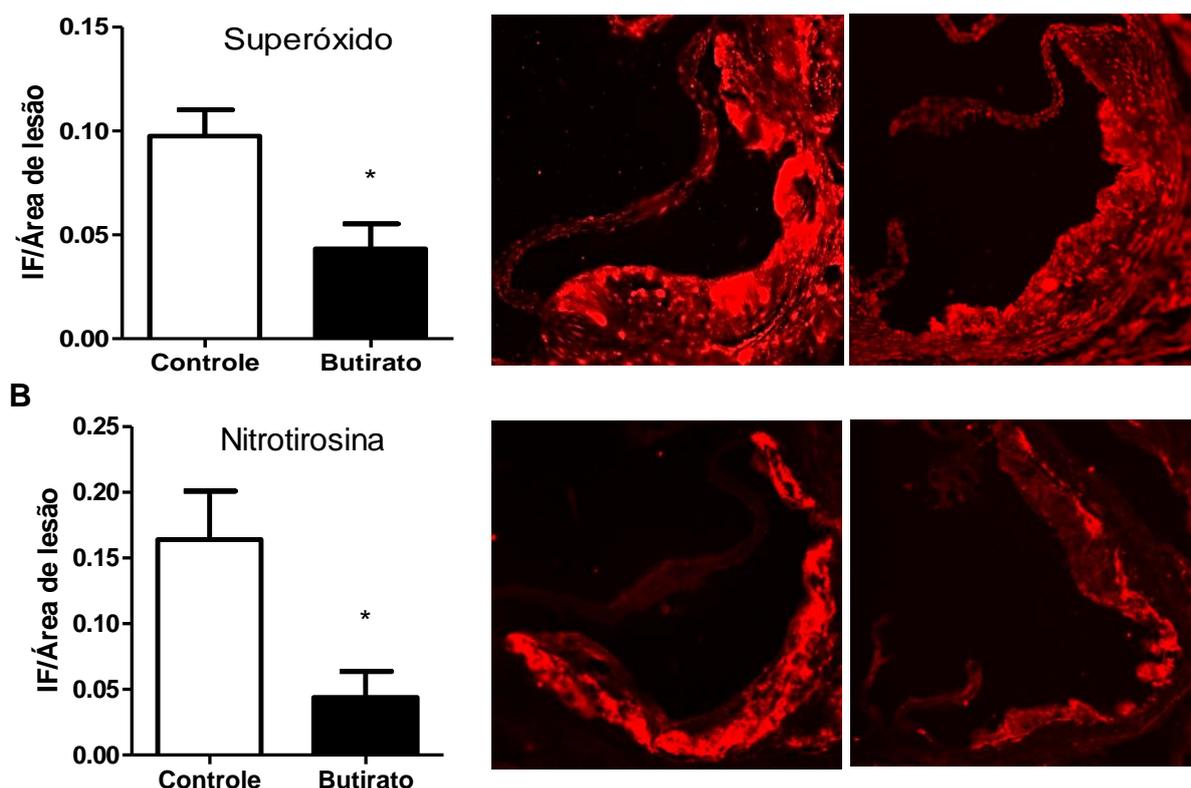


Figura 11- Produção de superóxido (DHE - A) e nitrotirosina na válvula aórtica dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Representação gráfica dos valores de intensidade de fluorescência apresentados como média \pm Erro padrão (n=4). *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t). IF: intensidade de fluorescência.

6.5- Avaliação do estresse oxidativo sistêmico

6.5.1- Peroxidação lipídica hepática

A análise da concentração de malondialdeído (MDA) e de hidroperóxidos mostrou que a suplementação com butirato de sódio na dieta resultou em uma significativa diminuição da peroxidação lipídica hepática avaliada (Figura 12).

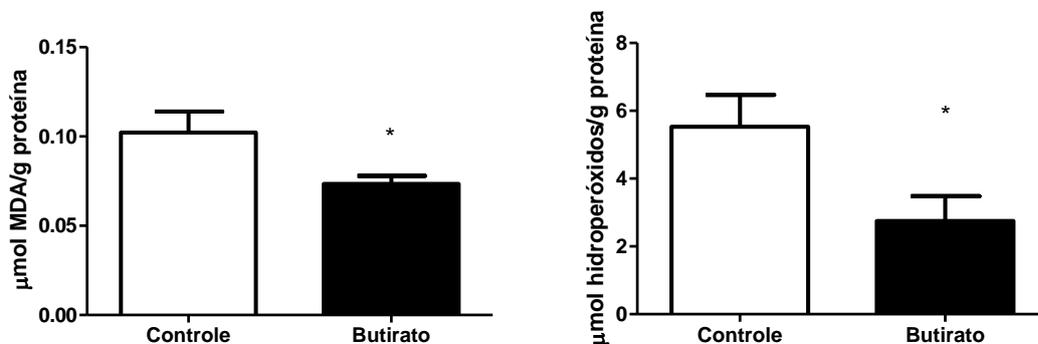


Figura 12- Peroxidação lipídica no fígado dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

6.5.2- Atividade de catalase hepática

Foi avaliada uma possível relação entre o efeito antioxidante da dieta contendo butirato de sódio e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no tecido hepático. Não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à atividade enzimática da superóxido dismutase. No entanto, a atividade da catalase mostrou aumentada no grupo Butirato (Figura 13).

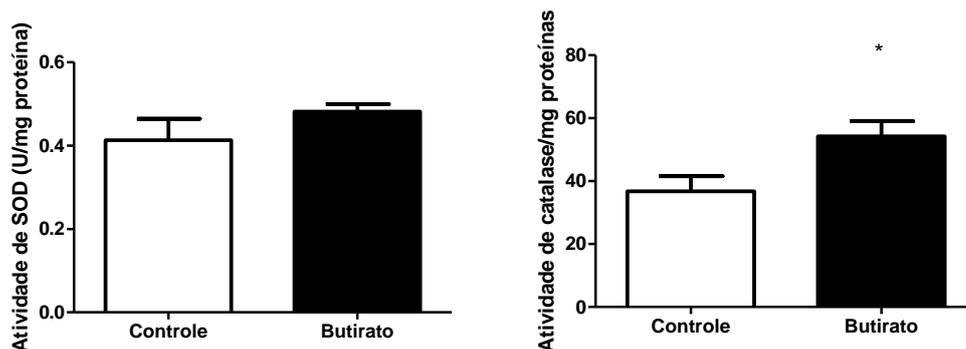


Figura 13- Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase no fígado dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

6.5.3- Produção de autoanticorpos anti-LDLox

A presença de autoanticorpos anti-LDLox representa uma medida indireta da oxidação de LDL, uma vez que a concentração de seus anticorpos específicos pode aumentar com o aumento da concentração de LDL oxidada no soro (Aguilar *et al.*, 2012; Tsimikas *et al.*, 2001). Neste estudo, foi observado que os animais alimentados com butirato apresentaram concentração de IgG anti-LDLox menor em comparação aos animais do grupo controle (Figura 14), sugerindo efeito benéfico sobre a oxidação de LDL na corrente sanguínea.

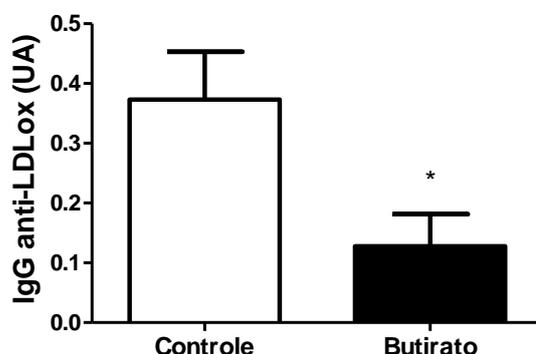


Figura 14- Autoanticorpos anti-LDLox no soro dos animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por dez semanas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

6.5.4- Produção de ROS por macrófagos peritoneais *ex vivo*

Para estudarmos o efeito do butirato sobre estresse oxidativo em células vivas, nós conduzimos um experimento *ex vivo* com macrófagos peritoneais extraídos de animais suplementados ou não com butirato, para avaliação da cinética de produção de ROS após estímulo com zymozan. Nós encontramos que os macrófagos obtidos do grupo suplementado com butirato apresentaram menor produção de ROS em comparação ao grupo controle (Figura 15), sugerindo que a ingestão de butirato foi capaz de reduzir a ativação dos macrófagos induzida por zymozan.

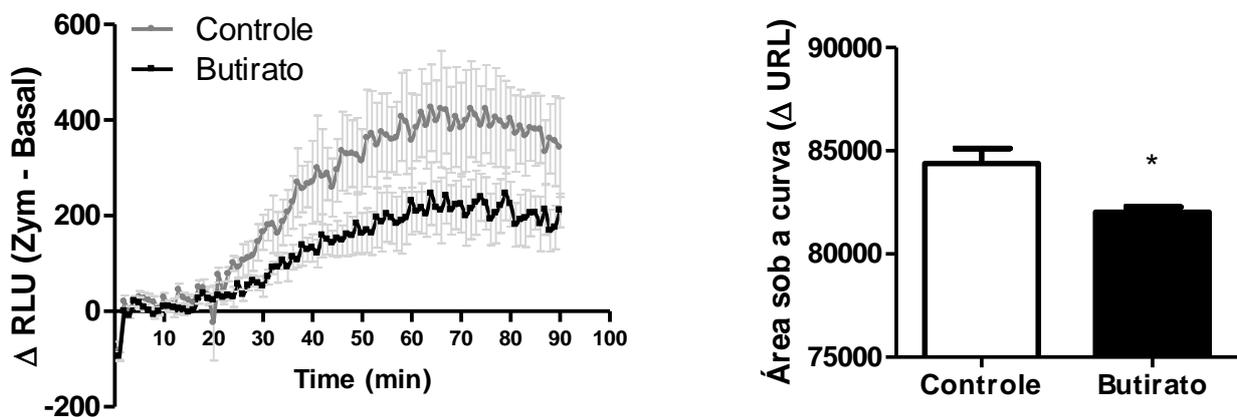


Figura 15- Produção de ROS (*ex vivo*) por macrófagos peritoneais (estimulados com Zymosan) obtidos de animais apoE^{-/-} submetidos à dieta controle ou suplementada com butirato de sódio por 4 semanas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão (n=8/7). *Diferença estatística (p<0,05, teste t). RLU (Relative Light Unit): Unidade Relativa de Luz.

6.6- Avaliação da inflamação *in vitro*

Com o objetivo de estudar o comportamento imunomodulatório do butirato de sódio frente ao estímulo com LDLox, foram realizados experimentos *in vitro*

utilizando células endoteliais e macrófagos pré-tratados com butirato e estimulados com LDL oxidada.

6.6.1- Expressão de CCL2 e VCAM-1 em células EA.hy926 estimuladas com LDLox

A avaliação da presença de CCL2 e VCAM-1 por imunofluorescência, mostrou que o pré-tratamento com butirato de sódio foi capaz de reduzir essas moléculas inflamatórias em células endoteliais estimuladas com LDLox, a partir da concentração de 0,5mM (Figura 16).

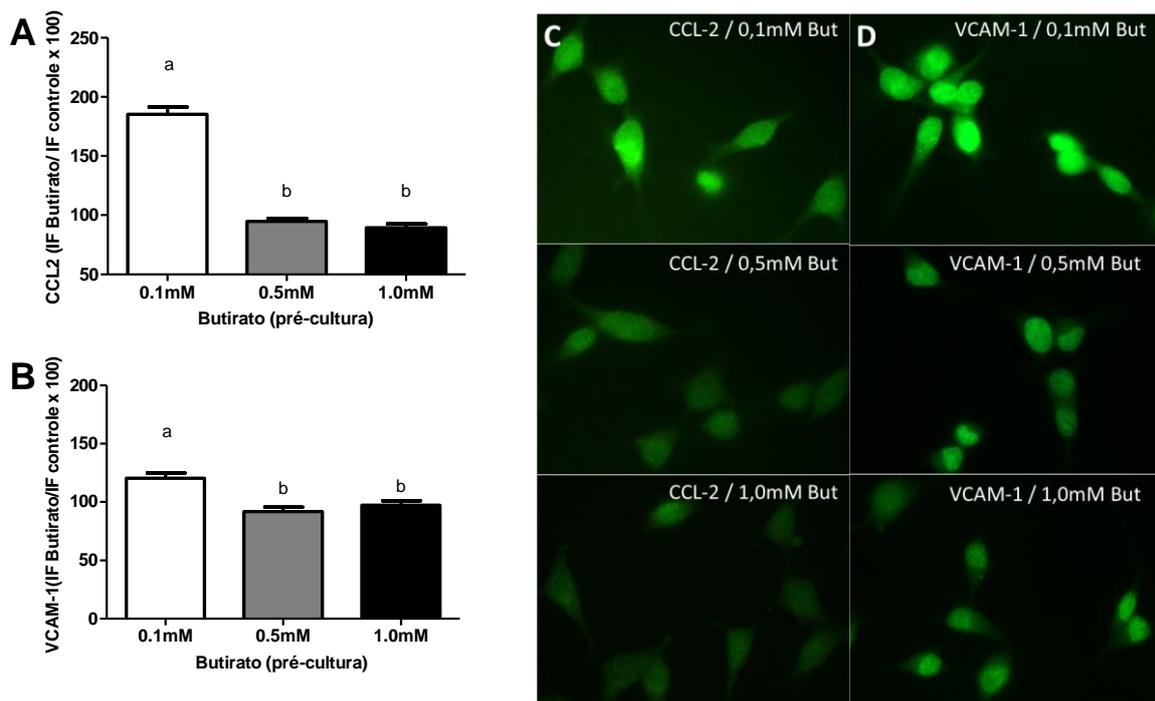


Figura 16- Imunofluorescência para CCL2 (A e C) e VCAM-1 (B e D) em células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas (2 horas) com diferentes concentrações de butirato de sódio (0,1; 0,5 e 1,0mM) e estimuladas com LDLox (50µM) por 4 horas. Os gráficos representam a média da razão da IF para CCL2/VCAM-1 em células pré-tratadas com butirato dividida pela IF em células sem pré-tratamento (Controle) x 100. (B) Imagem representativa da imunofluorescência de CCL2 das células pré-tratadas com 0,5mM de butirato. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. IF: Intensidade de Fluorescência. *Diferença estatística (p<0,05, ANOVA).

6.6.2- Expressão de CD36 em células EA.hy926 estimuladas com LDLox

A expressão de CD36 constitui um importante meio de aumentar a captação das partículas de LDLox. O butirato mostrou-se capaz de reduzir a expressão de CD36 nas células endoteliais estimuladas com LDLox (Figura 17).

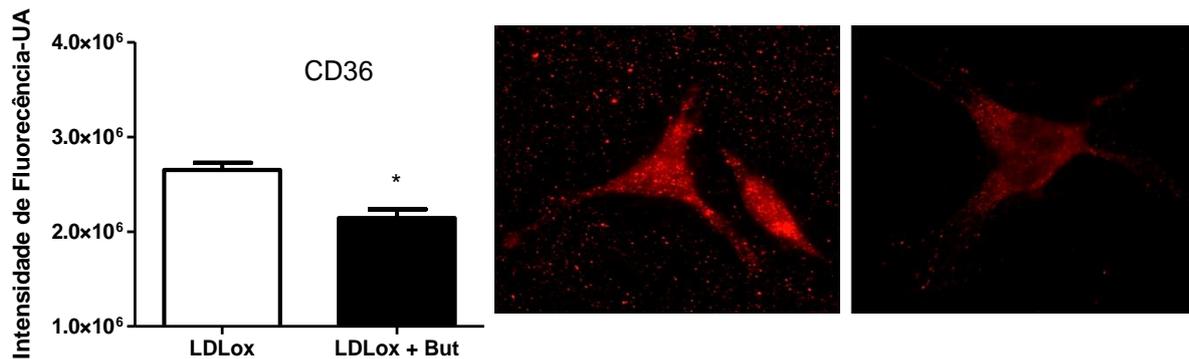


Figura 17- Intensidade de CD36 expressa por células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50µM), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).

6.6.3- Citocinas pró-inflamatórias e IL-10 no sobrenadante da cultura celular

Para elucidar o efeito do butirato de sódio sobre a secreção de citocinas foi realizada a dosagem de TNF, IL-6, IL-1 β , reconhecidamente pró-inflamatórias, e de IL-10, anti-inflamatória, no sobrenadante da cultura celular, após estímulo com LDLox. As células foram pré-incubadas com butirato na concentração de 0,5mM, concentração mínima já capaz de exercer efeito anti-inflamatório (como visto na expressão de CCL2 e VCAM-1, Figura 18). Foi observada a capacidade do pré-tratamento com butirato em reduzir significativamente a concentração das citocinas pró-inflamatórias, bem como o aumento de IL-10 (Figura 18).

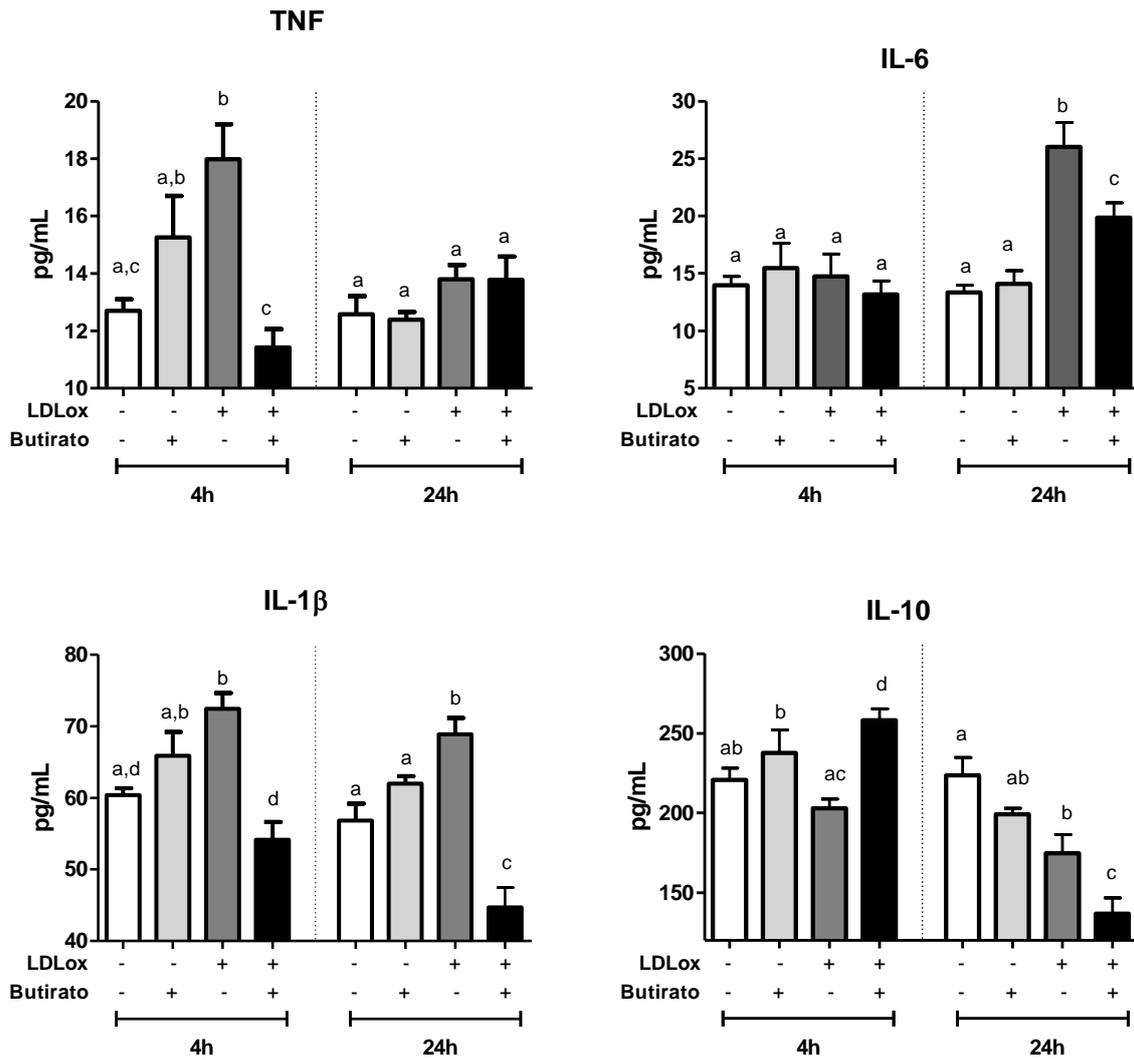


Figura 18- Secreção de citocinas por células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50µM), por 4 ou 24 horas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. Letras diferentes identificam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA). $n=8$.

6.6.4-Expressão de CD36 e a captação de LDLox em macrófagos peritoneais

Para determinar a capacidade do butirato em reduzir a formação de células espumosas, foi realizada cultura de macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato e estimulados com LDLox, a fim de analisar o seu efeito sobre a expressão

proteica do receptor scavenger CD36 e a captação de LDLox. Foi observado que o butirato reduziu a expressão de CD36 o que também resultou numa menor captação de LDLox pelos macrófagos (Figura 19) estando, portanto, em conformidade com a menor presença de células espumosas nas lesões da válvula aórtica.

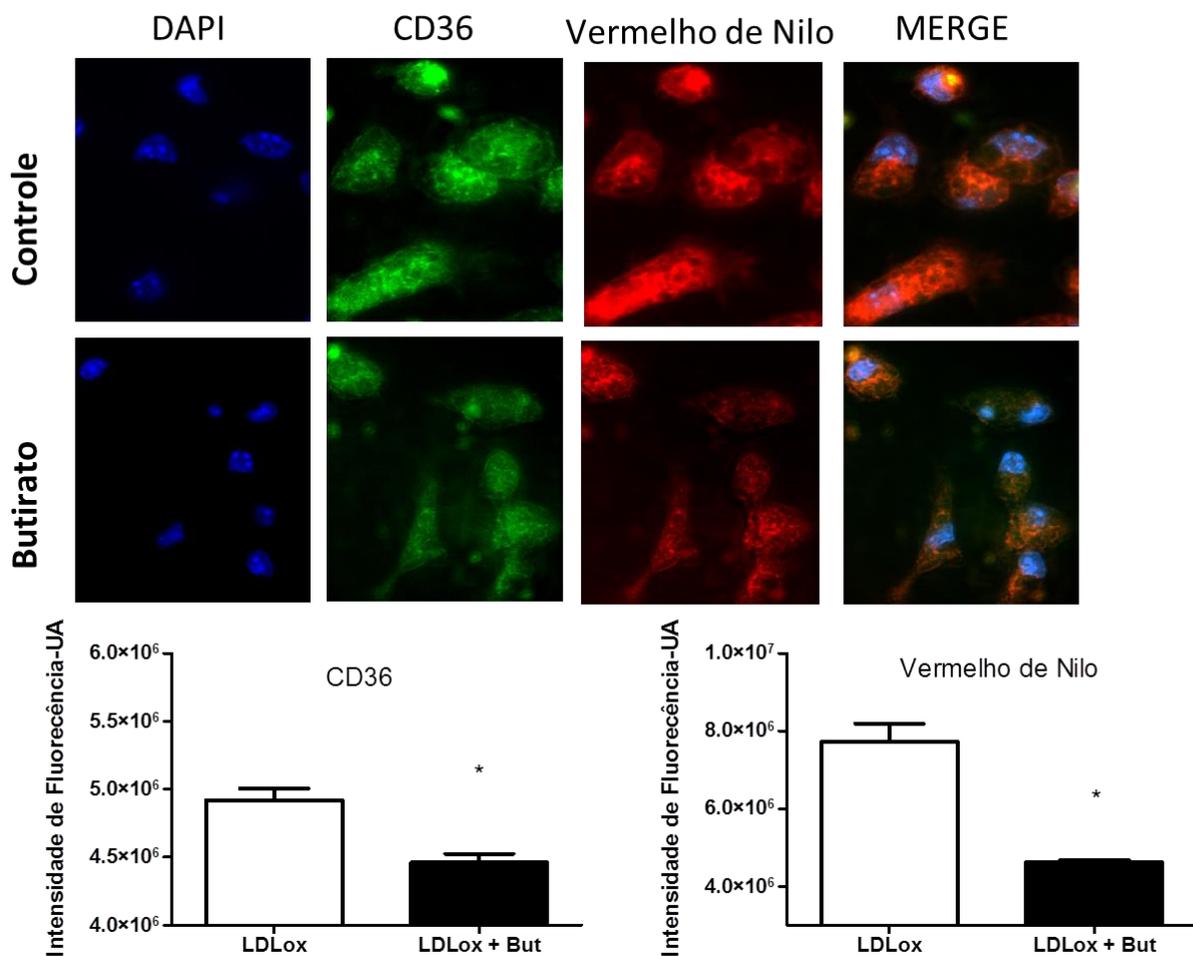


Figura 19- Expressão de CD36 (Imunofluorescência) e captação de LDLox (fluorescência com Vermelho de Nilo) em macrófagos peritoneais (de camundongos ApoE^{-/-}) pré-tratados ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50µM), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato (Controle) e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *p≤0.05 (Teste t).

6.6.5- Produção de óxido nítrico e a expressão de iNOS em macrófagos peritoneais

Sob estímulo inflamatório, os macrófagos ativados também aumentam a produção de óxido nítrico a concentrações prejudiciais, via ativação de iNOS. Ao avaliarmos a produção de NO por macrófagos pre-tratados com butirato e estimulados com LDLox, foi encontrada produção reduzida de óxido nítrico, acompanhada por menor expressão proteica de iNOS, em relação ao controle (Figura 20).

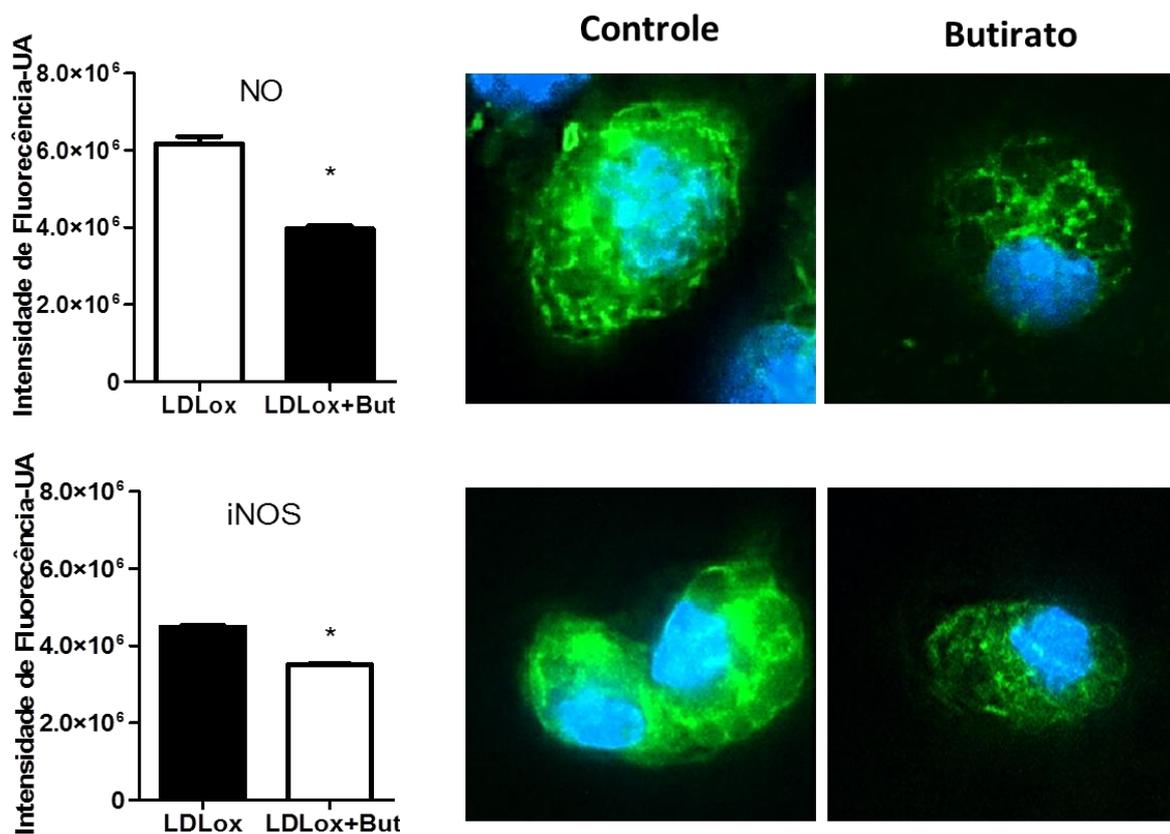


Figura 20- Produção de óxido nítrico (NO) e de iNOS (*in vitro*) em macrófagos peritoneais (de camungongos ApoE^{-/-}) pré-tratados ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50µM), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pre-incubação com butirato (Controle) e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

6.6.6- Atividade do NF- κ B em células endoteliais

Para compreender o mecanismo de ação do butirato, foi avaliado seu efeito na expressão e atividade do fator de transcrição NF- κ B, que é altamente associado à inflamação. A expressão do inibidor I κ B também foi investigada. Os resultados mostram que NF- κ B estava reduzido em células tratadas com butirato, sem que houvesse modificações na concentração de seu inibidor I κ B (Figura 21). A ativação de NF- κ B pode ser avaliada pela sua translocação para o núcleo. Nossos resultados mostraram uma menor translocação da subunidade p65 para o núcleo das células pre-tratadas com butirato (Figura 22), sem apresentar diferença na concentração citoplasmática, sugerindo uma menor atividade desse fator de transcrição. A subunidade p50 do NF- κ B estava aumentada no citoplasma das células pre-incubadas com butirato, mas sem alterações nas concentrações nucleares (Figura 22). Os dados de fluorescência de I κ B também confirmaram aqueles vistos por western blot.

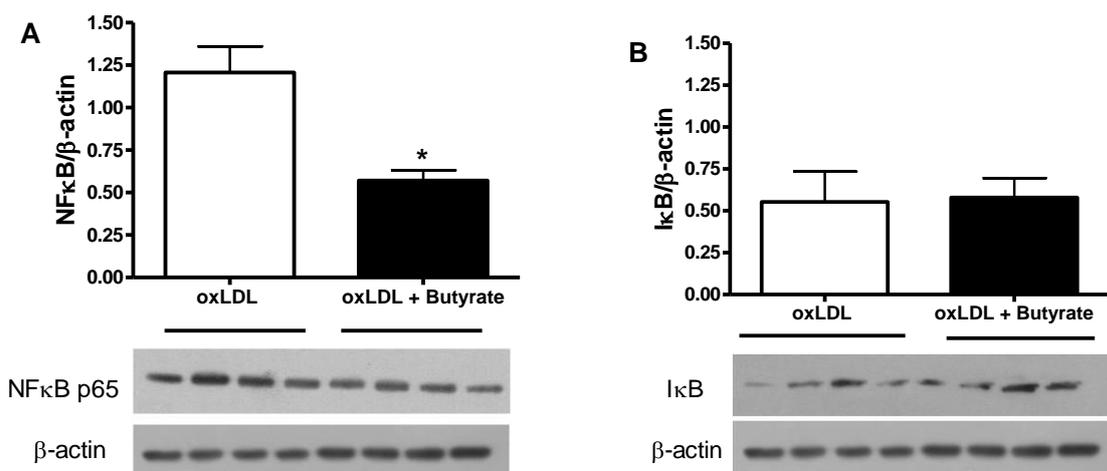


Figura 21- Expressão do NF- κ B e de I κ B por células endoteliais humanas EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50 μ M), por 4 horas. Western blot para p65 e I κ B. Os dados são reportados como media \pm erro padrão. *p \leq 0.05 (teste t).

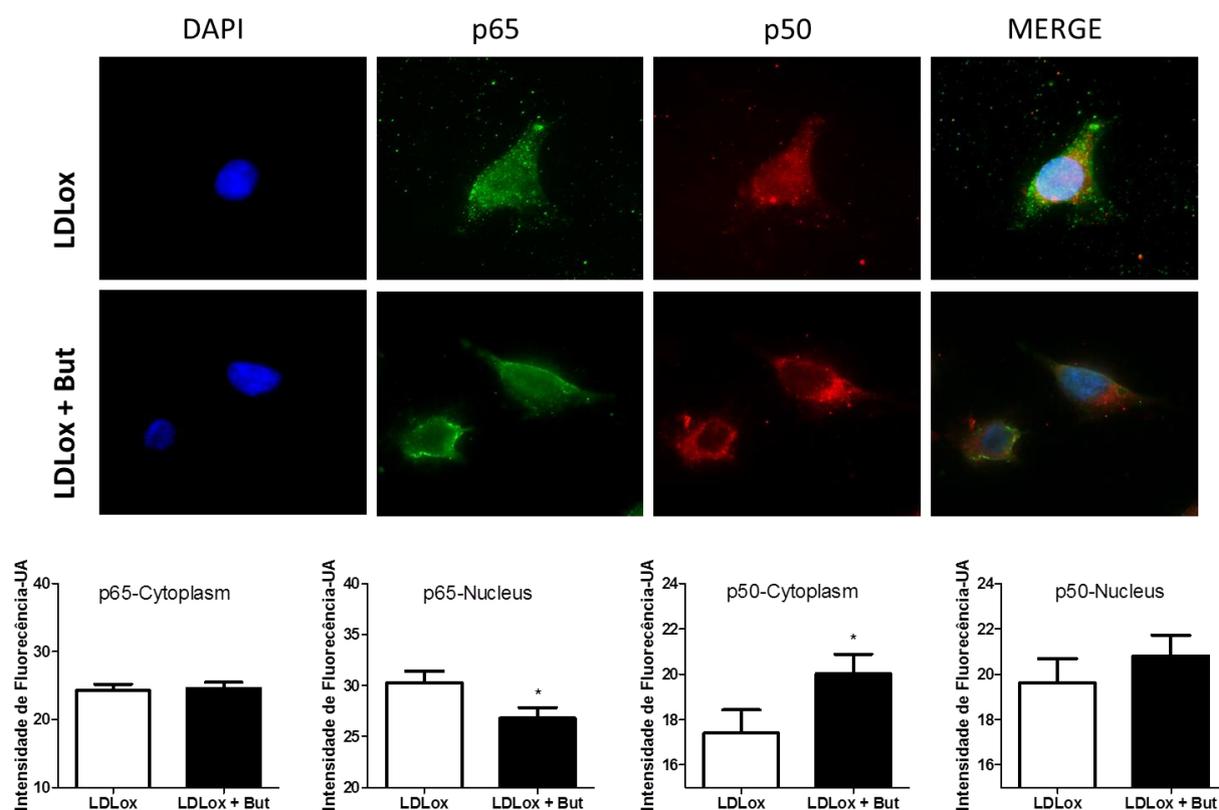


Figura 22- Atividade do NF- κ B em células endoteliais humanas EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50 μ M), por 4 horas. Imunofluorescência para as subunidades p65 e p50 do NF- κ B e I κ B. Imagem representativa da imunofluorescência para p65, p50 e I κ B. Os dados são reportados como média \pm erro padrão. * $p \leq 0.05$ (teste t).

6.7- Avaliação do estresse oxidativo *in vitro*

O butirato mostrou-se eficaz em melhorar o *status oxidativo* nos experimentos *in vivo*. Portanto, estresse oxidativo foi também investigado *in vitro*, sendo analisado também seu mecanismo envolvendo a NADPH oxidase.

6.7.1- Produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em macrófagos

Já que a produção de ROS por macrófagos desempenha um papel chave na oxidação das partículas de LDL aprisionadas na camada íntima das artérias, nós investigamos se sua produção por macrófagos peritoneais é afetada pela pré-incubação com butirato seguida de estímulo com LDLox. Os resultados mostraram que os macrófagos pré-incubados com butirato apresentaram menor produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em comparação ao controle, após serem estimulados com LDLox (Figura 23).

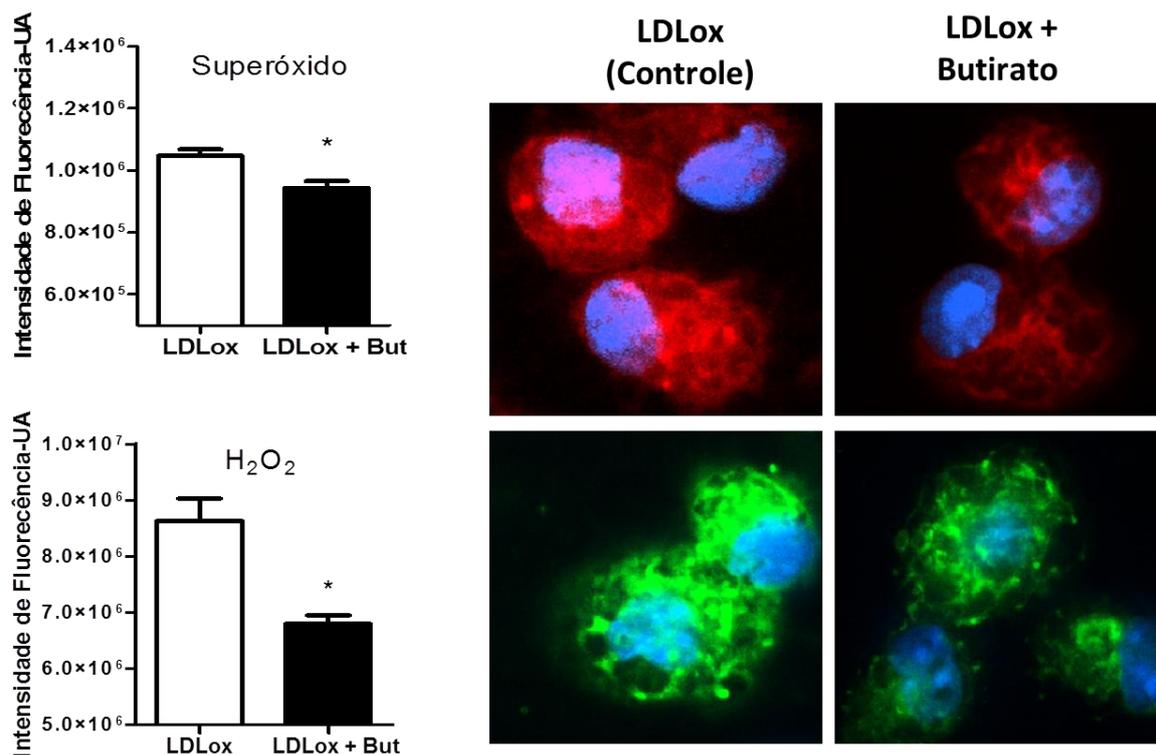


Figura 23- Produção de ROS (*in vitro*) em macrófagos peritoneais (de camungongos ApoE^{-/-}) pré-tratados ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50µM), por 4 horas. Gráfico da intensidade de fluorescência. Imagens representativas das células sem pré-incubação com butirato (Controle) e pré incubadas, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

6.7.2- Expressão de NADPH oxidase-p22phox em células endoteliais EA.hy926

Como a produção de ROS durante a explosão respiratória (*oxidative burst*) ocorre por meio da ativação da NADPH oxidase, nós analisamos a expressão protéica da subunidade regulatória p22phox em células endoteliais, como medida indireta da atividade dessa enzima. Como previsto, a pré-incubação com butirato reduziu a expressão proteica de p22 após estímulo com LDLox (Figura 24).

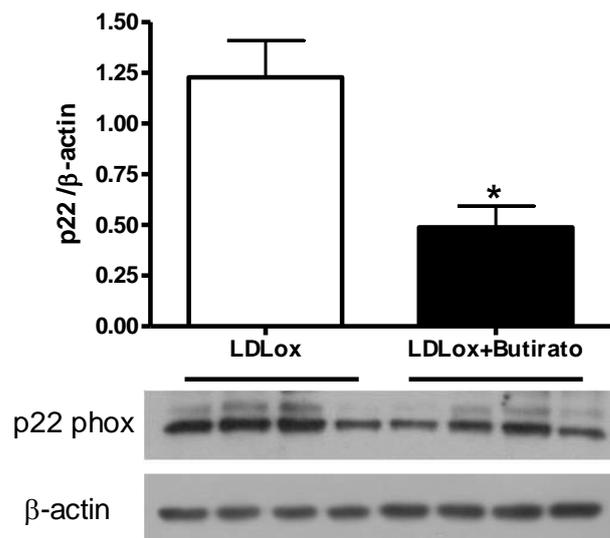


Figura 24- Expressão de NADPH oxidase (p22phox) em células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$, teste t).

6.7.3- Expressão de SOD1 e catalase em células EA.hy926

Interessantemente, enquanto fora mantida a expressão da SOD1, a expressão proteica da catalase foi reduzida pelo butirato após estímulo com LDLox (Figura 25).

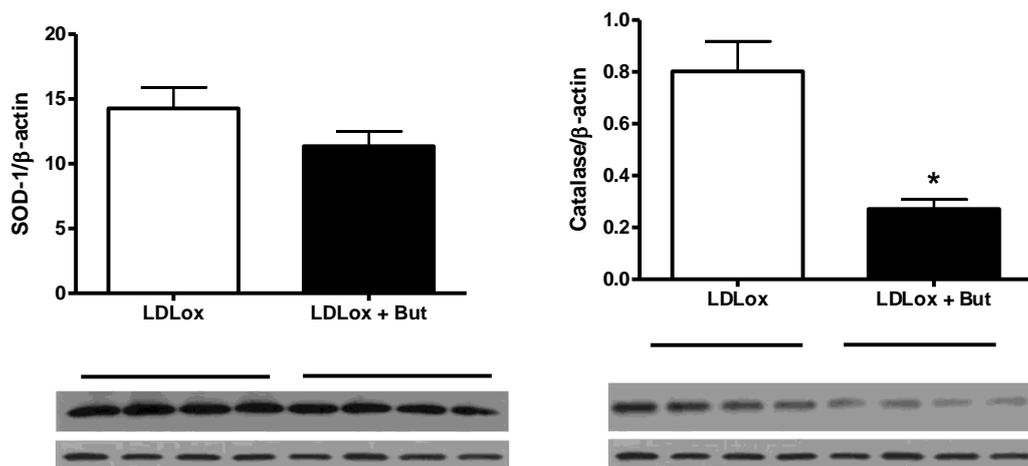


Figura 25- Expressão de SOD e catalase em células endoteliais EA.hy926 pré-tratadas ou não com butirato de sódio (0,5mM, por 2 horas) e estimuladas com LDLox (50μM), por 4 horas. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão. *Diferença estatística (p<0,05, teste t).

7- DISCUSSÃO

Vários efeitos extraintestinais e sistêmicos do butirato têm sido descritos e muitos deles correlacionam com sua ação anti-inflamatória e antioxidante (Ferreira *et al.*, 2012; Hamer *et al.*, 2008; Hamer *et al.*, 2009; Leonel *et al.*, 2012b; Vieira *et al.*, 2012). Porém, as possíveis ações da suplementação oral de butirato na aterogênese ainda não foram estudadas. Sua possível participação no desenvolvimento da aterosclerose foi sugerida indiretamente pelos efeitos do butirato vistos em componentes importantes da lesão aterosclerótica como o endotélio e os leucócitos (Siennicka, 2005; Zapolska-Downar *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2012) . Assim, nosso estudo é pioneiro em mostrar o efeito benéfico do butirato em modelo de aterosclerose.

A suplementação de butirato utilizada neste estudo (1%) não se mostrou deletéria ao desenvolvimento do animal, uma vez que a ingestão alimentar, peso corporal e a concentração sérica de Gama GT foram similares entre os grupos.

As fibras solúveis são reconhecidos agentes hipocolesterolêmicos, devido ao seu efeito na absorção do colesterol e excreção de ácidos biliares (Alvarez-Leite *et al.*, 1994a; Alvarez-Leite *et al.*, 1994b; Rideout *et al.*, 2008). Como a principal fonte de butirato no organismo é a fermentação de fibras no colon (Hamer *et al.*, 2008), decidimos analisar se o butirato, como subproduto, também teria algum efeito no perfil lipídico. Porém, em condições de hipercolesterolemia, característica intrínseca do modelo murino utilizado, nenhum efeito foi visto nos níveis do colesterol total e suas frações, nem nos triglicerídeos com a suplementação de butirato.

A resistência à insulina, independentemente da obesidade, possui uma alta associação com o desenvolvimento da aterosclerose (Bornfeldt *et al.*, 2011; DeFronzo, 2010). Portanto, dada a importante associação da sensibilidade à insulina com a aterogênese, foi avaliado o efeito da suplementação oral com butirato na tolerância oral à glicose e na sensibilidade à insulina nos animais. O butirato não alterou o teste de tolerância oral à glicose, mas aumentou significativamente a sensibilidade à insulina. A resistência à insulina em animais ApoE^{-/-} está associada ao aumento na aterosclerose (Cannizzo *et al.*, 2012) e é acompanhada por aumento em moléculas pro-inflamatórias como VCAM-1 e MMP-9, além de aumentado estresse oxidativo, caracterizado por elevada atividade da NADPH oxidase. Embora no presente estudo os animais tenham apresentado glicemia semelhante, a sensibilidade à insulina aumentada está em conformidade com o efeito anti-inflamatório e antioxidante encontrado após ingestão de butirato. Interessantemente, VCAM-1 e MMP2, e NADPH oxidase (discutidas à frente) foram reduzidas neste estudo, estando em conformidade com o trabalho de Cannizzo e colaboradores (Cannizzo *et al.*, 2012). Assim, a maior sensibilidade à insulina conferida pelo butirato abre perspectivas promissoras sobre seus possíveis efeitos na resistência à insulina.

Embora alguns estudos *in vitro* mostrem um efeito apoptótico em leucócitos, o número de leucócitos circulantes foi semelhante entre os grupos. Isso ocorre, provavelmente, pelo fato de as concentrações circulantes alcançadas após a suplementação oral serem inferiores às utilizadas em culturas (1 a 5mM) (Bailon *et al.*, 2010; RAMOS, 2002) não afetando de forma significativa a viabilidade dessas células. Os monócitos foram os únicos leucócitos alterados pela suplementação de butirato possivelmente devido à menor infiltração.

Ao analisarmos a lesão aterosclerótica em dois locais, nota-se que a área da lesão na aorta foi reduzida com a suplementação com butirato, enquanto que na válvula aórtica a área de lesão foi semelhante. Tais diferenças podem ser devido à distinta evolução da placa nos dois sítios. Em camundongos ApoE^{-/-}, a lesão ocorre mais rapidamente na válvula aórtica, devido ao intenso fluxo e turbilhonamento do sangue pela elevada taxa de batimentos cardíacos (360bpm). A lesão na artéria ocorre mais lentamente e assim, no momento da eutanásia, encontra-se uma lesão em estágio mais inicial nessa região comparado à válvula, principalmente com alterações no endotélio e presença de células espumosas na íntima (VanderLaan *et al.*, 2004). Na válvula aórtica, no entanto, as lesões apresentam-se mais desenvolvidas, podendo-se, inclusive, avaliar mais componentes além dos vistos na aorta, como estabilidade da capa fibrosa e a interação entre os diversos componentes celulares que compõem a placa. Assim, é possível analisar a aterosclerose em dois estágios distintos: inicial e intermediário.

A menor área de lesão vista na aorta dos animais suplementados, sugere menor quimiotaxia e/ou migração de monócitos para o local, uma vez que não há diferenças nos níveis circulantes de lipoproteínas aterogênicas nem de triglicerídeos. Nossos dados de cultura utilizando concentrações de butirato a 0,5mM, mostraram sua capacidade em reduzir a expressão de CCL2 e VCAM-1 em células endoteliais sugerindo sua capacidade de reduzir a migração de monócitos para o subendotélio ativado por LDLox. iNOS tem papel importante na migração de macrófagos (Maa *et al.*, 2008) e o butirato possui efeito inibidor da migração de macrófagos que foi associado com a redução na expressão dessa enzima (Maa *et al.*, 2010). Neste estudo também foi encontrada reduzida produção de NO associada com diminuição na expressão de iNOS em macrófagos peritoneais pré-tratados com butirato e

estimulados com LDLox, estando de acordo com Chakravortty e colaboradores (Chakravortty *et al.*, 2000). Portanto, esse resultado confirma o efeito anti-inflamatório do butirato e sugere que, além de reduzir a quimioatração (por atuar em células endoteliais), a migração de macrófagos também pode estar sendo afetada, uma vez que o butirato inibe a expressão de iNOS. Adicionalmente, o pré-tratamento de macrófagos peritoneais com butirato reduziu a expressão de CD36 e, conseqüentemente, a captação de LDLox, confirmando a reduzida formação de células espumosas na aorta.

Na válvula aórtica, a lesão apresentou-se mais desenvolvida e foi possível avaliar o efeito da suplementação com butirato em outros componentes da lesão, principalmente os ligados à estabilização da capa fibrosa, importante para a prevenção de sua ruptura. Os dados de maior deposição de colágeno associado à menor presença de MMP2 observados na lesão sugerem que a maior deposição pode ser devido à menor degradação do colágeno por essa enzima. MMP-2 é a principal metaloproteinase de matriz derivada das células musculares lisas e é positivamente regulada e ativada nas lesões ateroscleróticas em animais e humanos (Li *et al.*, 1996; Page-McCaw *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*). As MMPs podem ser induzidas ou estimuladas por citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF (Han *et al.*, 2000). Assim, a redução de MMP2 é uma provável consequência do efeito anti-inflamatório do butirato em reduzir TNF.

À semelhança do que ocorreu na aorta, houve menor infiltrado de macrófagos/monócitos nas lesões da válvula aórtica, estando em conformidade com a menor expressão de CCL2 e VCAM-1 neste sítio. Assim, esses dados reforçam o efeito do butirato em reduzir a quimiotaxia e migração de monócitos/macrófagos como já discutido. Aliados à redução em MMP2, esses resultados confirmaram um

menor *status* inflamatório na válvula aórtica e, juntos, mostram o efeito benéfico de butirato, reduzindo a área de células espumosas e mantendo a estabilidade da placa, pelo aumento no conteúdo de colágeno.

Além dos componentes mais relacionados à inflamação, o estresse oxidativo também foi avaliado na válvula aórtica. A produção de ROS durante a aterogênese é responsável por aumentar a oxidação de LDL na íntima arterial contribuindo assim para a elevada progressão da aterosclerose (Kinoshita *et al.*, 2013). Adicionalmente, os radicais superóxido reagem com NO, reduzindo sua biodisponibilidade e levando à formação de peroxinitrito, que está associado à oxidação proteica e formação de nitrotirosina. Nitrotirosina constitui um marcador de estresse oxidativo (Darwish *et al.*, 2007) altamente encontrado em lesões ateroscleróticas e seus níveis séricos possuem correlação positiva com a ocorrência de doença cardiovascular (Shishehbor *et al.*, 2003; Upmacis, 2008). Ao avaliarmos a produção de O_2^- nas lesões, foi observada produção reduzida nas lesões dos animais suplementados com butirato em comparação ao controle. Em conformidade com este resultado, a presença de nitrotirosina também foi significativamente menor nas lesões do grupo butirato. Esses resultados confirmam que o butirato reduz o estresse oxidativo nas lesões da válvula e, dada a conhecida associação entre estresse oxidativo e inflamação com a aterogênese (Cachofeiro *et al.*, 2008), esse resultado sugere menor inflamação também encontrada neste sítio.

ROS são responsáveis pelo aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias (Naik *et al.*, 2011) que desempenham um papel chave na ativação de MMPs (Rajagopalan *et al.*, 1996; Spallarossa *et al.*, 2006). Assim, a produção reduzida de superóxido no grupo butirato também pode estar associada ao menor

perfil inflamatório, particularmente com relação a menor expressão de MMP2 encontrada nas lesões.

Como a produção de ROS por macrófagos tem um papel chave na oxidação das LDL aprisionadas na camada íntima arterial e foi encontrada menor produção de superóxido na válvula aórtica, foi investigado o efeito da suplementação com butirato na produção de ROS por macrófagos peritoneais *ex vivo*. O estudo da liberação de ROS em células vivas constitui uma ferramenta mais adequada para se investigar o estresse oxidativo. A suplementação oral com butirato mostrou-se capaz de reduzir a liberação de ROS em macrófagos peritoneais estimulados com zymosan *ex vivo*. Esse resultado foi também confirmado *in vitro* em macrófagos peritoneais pré-incubados com butirato e estimulados com LDLox (reconhecidamente indutora da produção de ROS (Park *et al.*, 2009)), onde foi encontrada reduzida produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em comparação ao controle. Juntos, esses dados sugerem que o butirato inibe a produção de ROS por macrófagos ativados, sendo benéfico contra a gênese e evolução da aterosclerose, particularmente, pela capacidade de reduzir a ativação após estímulo pelo principal agente desencadeador da aterosclerose, a LDLox.

Autoanticorpos contra LDL oxidada ocorrem naturalmente na corrente sanguínea e têm sido associados com o desenvolvimento da aterosclerose. Níveis elevados de IgG anti-LDLox têm sido mostrados proaterogênicos sendo positivamente correlacionados com espessamento da íntima arterial (Hulthe *et al.*, 2001). Possivelmente, isso ocorre porque IgG anti-LDLox formam imunocomplexos com LDLox que podem se ligar aos receptores Fc de macrófagos gerando um sinal inflamatório proaterogênico (Burut *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 1999; Kiener *et al.*, 1995). No presente estudo nós encontramos níveis séricos reduzidos de IgG anti-

LDLox nos animais suplementados com butirato em comparação ao controle, estando em conformidade com o efeito ateroprotetor do butirato em reduzir a formação de lesões na aorta. Como as LDLox são partículas imunogênicas que estimulam a produção de anticorpos anti-LDLox, níveis elevados desses autoanticorpos sugerem aumento da oxidação das LDL nativas (Aguilar *et al.*, 2012; Shoenfeld *et al.*, 2004; Tsimikas *et al.*, 2001). Assim, a redução nos níveis de IgG anti-LDLox sugere menor oxidação das partículas de LDL nos animais suplementados com butirato, estando de acordo com o estudo de TSIMIKAS e colaboradores (Tsimikas *et al.*, 2001) que mostraram que a redução em autoanticorpos teve positiva correlação com a redução na presença de LDLox na aorta.

O estresse oxidativo basal no fígado é naturalmente aumentado em camundongos deficientes em apoproteína E (Pereira *et al.*, 2012) e, por isso, também foi investigado o efeito da suplementação com butirato na peroxidação lipídica hepática. Interessantemente, foi confirmado um efeito sistêmico do butirato em reduzir o estresse oxidativo, pois também foi encontrada menor peroxidação lipídica no fígado dos animais suplementados. Essa melhora foi associada a uma maior atividade da enzima antioxidante catalase, que tem sido demonstrada ser aumentada por butirato (Yano *et al.*, 1989), confirmando a capacidade do butirato em reduzir o estresse oxidativo via aumento na expressão ou atividade de enzimas antioxidantes (Sauer *et al.*, 2007; Vanhoutvin *et al.*, 2009).

O endotélio ativado produz algumas citocinas como TNF, IL-1 β e IL-6 (Gomaraschi *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2003), sendo que IL-6 é induzida no endotélio indiretamente após ativação por outras citocinas (Gomaraschi *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram que butirato reduz

rapidamente a produção de IL-1 β e TNF (após 4h de estímulo por LDLox) e mais tardiamente inibe IL-6. A redução na secreção da IL-6 pode ser um efeito direto e indireto do butirato, tendo ocorrido menor indução por IL-1 β e TNF, já que estas foram reduzidas pelo pré-tratamento (Kasza, 2013). Foi também encontrado que após 4h de estímulo o butirato induziu o aumento de IL-10, que possui importante papel imunorregulador incluindo a inibição da síntese de citocinas pro-inflamatórias (Murray, 2005; Wang *et al.*, 1995). Interessantemente, a capacidade do butirato em aumentar IL-10 pode estar associada à redução no receptor CD36 vista tanto nas células endoteliais quanto em macrófagos peritoneais, uma vez que tem sido descrito que a IL-10 reduz a expressão de CD36 em macrófagos, prevenindo uma sobrecarga de colesterol captado de LDLox, além de promover aumento do efluxo de colesterol. Ambos os efeitos podem explicar a ação anti-aterogênica da IL-10 observada em vários experimentos em modelos animais (Rubic *et al.*, 2006). Portanto, esses dados indicam que o butirato modula a ativação das células endoteliais, reduzindo a secreção de citocinas pro-inflamatórias e aumentando IL-10.

NADPH oxidase é associada ao desenvolvimento da aterosclerose e o controle na geração de ROS é uma ferramenta benéfica na prevenção de eventos cardiovasculares (Kinoshita *et al.*, 2013). Neste estudo o butirato diminuiu a expressão da subunidade regulatória da NADPH oxidase, p22phox, o que explica a redução na produção de ROS também encontrada. A inibição da NADPH oxidase confere um efeito benéfico na aterogênese. Já foi mostrado que a inibição dessa enzima pela apocinina suprimiu a progressão da aterosclerose em animais ApoE-/- (Kinoshita *et al.*, 2013).

A inibição da NADPH oxidase pelo butirato também está de acordo com a reduzida produção de superóxido encontrada nas lesões da válvula aórtica. Esse

resultado é importante para a estabilidade da lesão, pois a NADPH oxidase aumenta a ativação de MMP2 (Spallarossa *et al.*, 2006). Assim, este resultado encontra-se em conformidade com a reduzida expressão de MMP2 e aumentado conteúdo de colágeno nas lesões dos animais alimentados com butirato.

NF- κ B é um fator de transcrição chave na inflamação e estresse oxidativo, por regular a expressão de moléculas pro-inflamatórias e da NADPH oxidase, respectivamente e pode ser ativado por estímulos pró-inflamatórios como LDLox ou citocinas (IL-1 β e TNF) (Han *et al.*, 2000). A atividade do NF- κ B depende não apenas de sua produção, mas de sua translocação para o núcleo, que ocorre após fosforilação do seu inibidor I κ B, no citoplasma. Após estímulo, I κ B Kinase (IKK) fosforila o I κ B ligado à subunidade p65 do NF- κ B e esta fosforilação induz a degradação do I κ B pelo proteassomo, liberando o dímero p65-p50 que migra para o núcleo, onde induz a transcrição gênica (Napetschnig *et al.*). Nossos dados mostraram que o butirato reduz a concentração total da subunidade p65 e mantém a concentração do seu inibidor I κ B α . Além disso, butirato leva a uma menor ativação do NF- κ B, demonstrada pela menor concentração nuclear de p65, responsável pela ligação na sequência gênica. Em relação ao p50, nota-se que há aumento no citoplasma de células tratadas com butirato, o que favorece a formação do homodímero p50-p50 inativo (Oeckinghaus *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2002). Assim, nossos resultados estão em concordância com a hipótese de que butirato reduz a expressão e a atividade de NF- κ B, afetando assim a cadeia de produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL1- β , reduzindo também a produção endotelial de quimiocinas e outras moléculas importantes na aterogênese, como CCL2, VCAM-1, CD36 e p22phox (Figura 26).

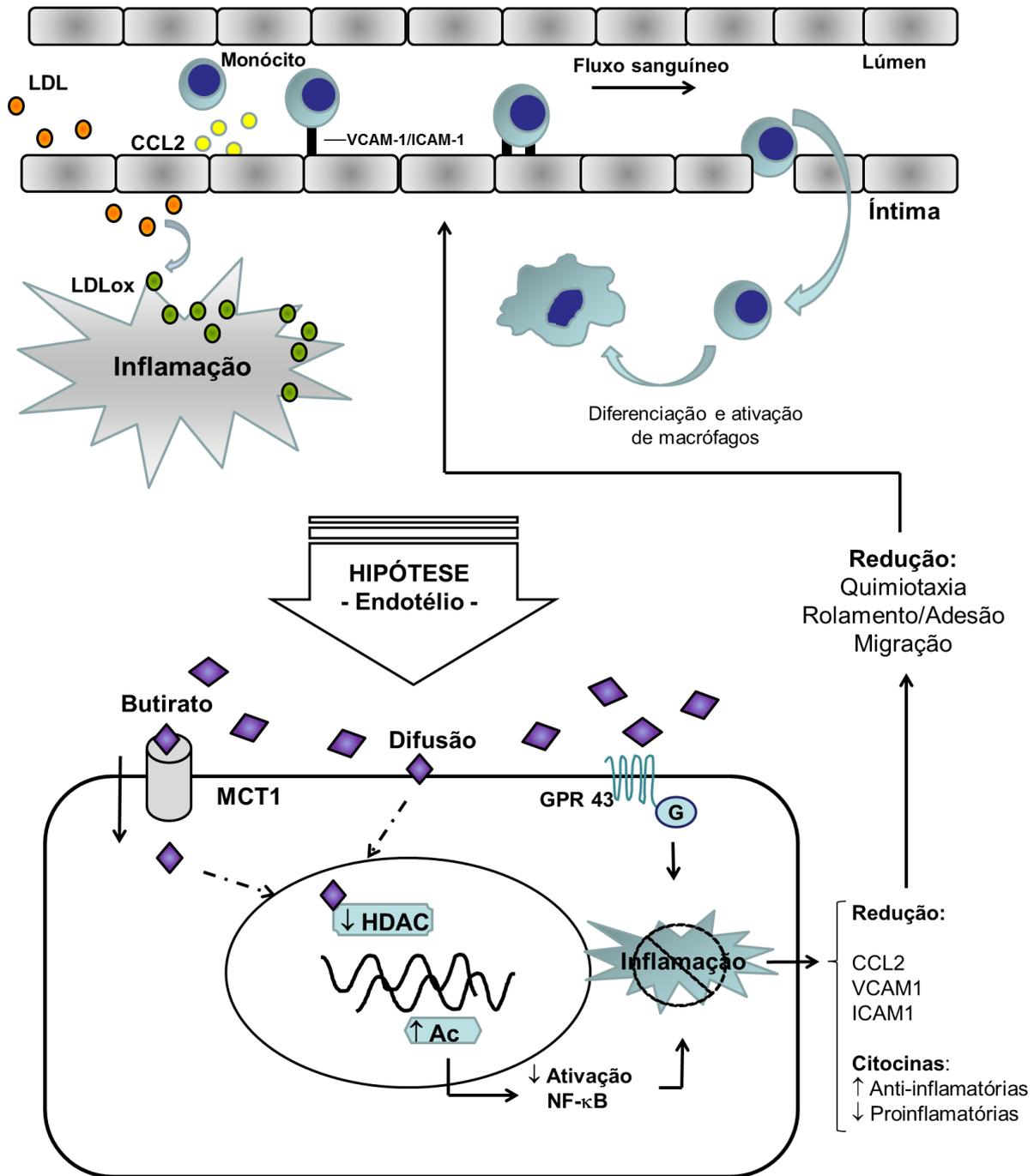


Figura 26- Hipótese da ação do butirato no endotélio.

O butirato captado pelas células endoteliais por difusão simples ou transportado pelo MCT1 promove redução na atividade do NF- κ B, via hiperacetilação (Ac) no DNA induzida pela inibição de histona desacetilase (HDAC). Essa menor atividade reduz a expressão de moléculas envolvidas na quimiotaxia, rolamento e adesão de monócitos, contribuindo para uma menor migração de leucócitos para o sítio de inflamação na íntima arterial. Isso resulta em menor formação de células espumosas atenuando a aterogênese. O butirato extracelular também possui ação anti-inflamatória via ligação a receptores acoplados à proteína G (GPR).

Estudos realizados em outros tipos celulares concordam, em sua maioria, com os resultados obtidos neste estudo em relação à redução de NF- κ B ativo com o uso de butirato (Machado *et al.*, 2012; Schwab *et al.*, 2007; Segain *et al.*, 2000; Zapolska-Downar *et al.*, 2004). Porém, os mecanismos são divergentes: nas células HT-29, o butirato reduziu a formação do dímero p65/p50 após estímulo de LPS ou TNF sem afetar I κ B, em efeito dependente de PPAR α (Schwab *et al.*, 2007). Em células endoteliais da microvasculatura intestinal (HIMEC), butirato reduziu a expressão de IL-6 como visto em nosso estudo, sendo que NF- κ B e I κ B não foram afetados (Ogawa *et al.*, 2003).

A subunidade da NADPH oxidase, p22phox, também é regulada pelo NF- κ B (Manea *et al.*, 2007). Portanto, possivelmente o butirato reduziu a expressão dessa subunidade por exercer efeito na via de ativação do fator de transcrição NF- κ B.

Assim, redução da produção de p65 vista em nosso estudo pode estar relacionada tanto com os efeitos anti-inflamatórios quanto antioxidantes do butirato. O mecanismo envolvido nessa redução pode ser em consequência da ação do butirato como inibidor da histona desacetilase (HDAC) (Davie, 2003; Monneret, 2005; Steliou *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2001), modulando a expressão gênica do fator de transcrição (Figura 26). Nós mostramos que o butirato promove uma menor atividade na via do NF- κ B. Resultados semelhantes foram vistos em colonócitos, onde butirato reduziu a degradação do I κ B e estava associado à inibição de HDAC (Yin *et al.*, 2001).

A associação dos efeitos do butirato nas células endoteliais com a inibição da atividade do NF- κ B, permite inferir que os macrófagos neste estudo também tiveram sua transcrição gênica afetada por butirato via ação neste fator de transcrição.

Assim, além dos efeitos que culminaram numa menor quimiotaxia/migração de monócitos, o butirato provavelmente induziu nos macrófagos a um menor perfil pró-inflamatório e pró-oxidante que desencadeou numa reduzida formação de células espumosas (Figura 27). Possivelmente, os macrófagos aprisionados na camada íntima tenham uma redução na atividade da NADPH oxidase, ocasionando menor produção de ROS e, conseqüentemente, apresentem menor efeito na oxidação de LDL. Adicionalmente, a reduzida expressão de CD36 diminui a captação das LDLox. É provável que uma menor expressão de iNOS e produção de NO, associada à reduzida geração de ROS, também esteja sendo ocasionada pelo butirato nas lesões, estando em conformidade com a menor formação de nitrotirosina na válvula aórtica.

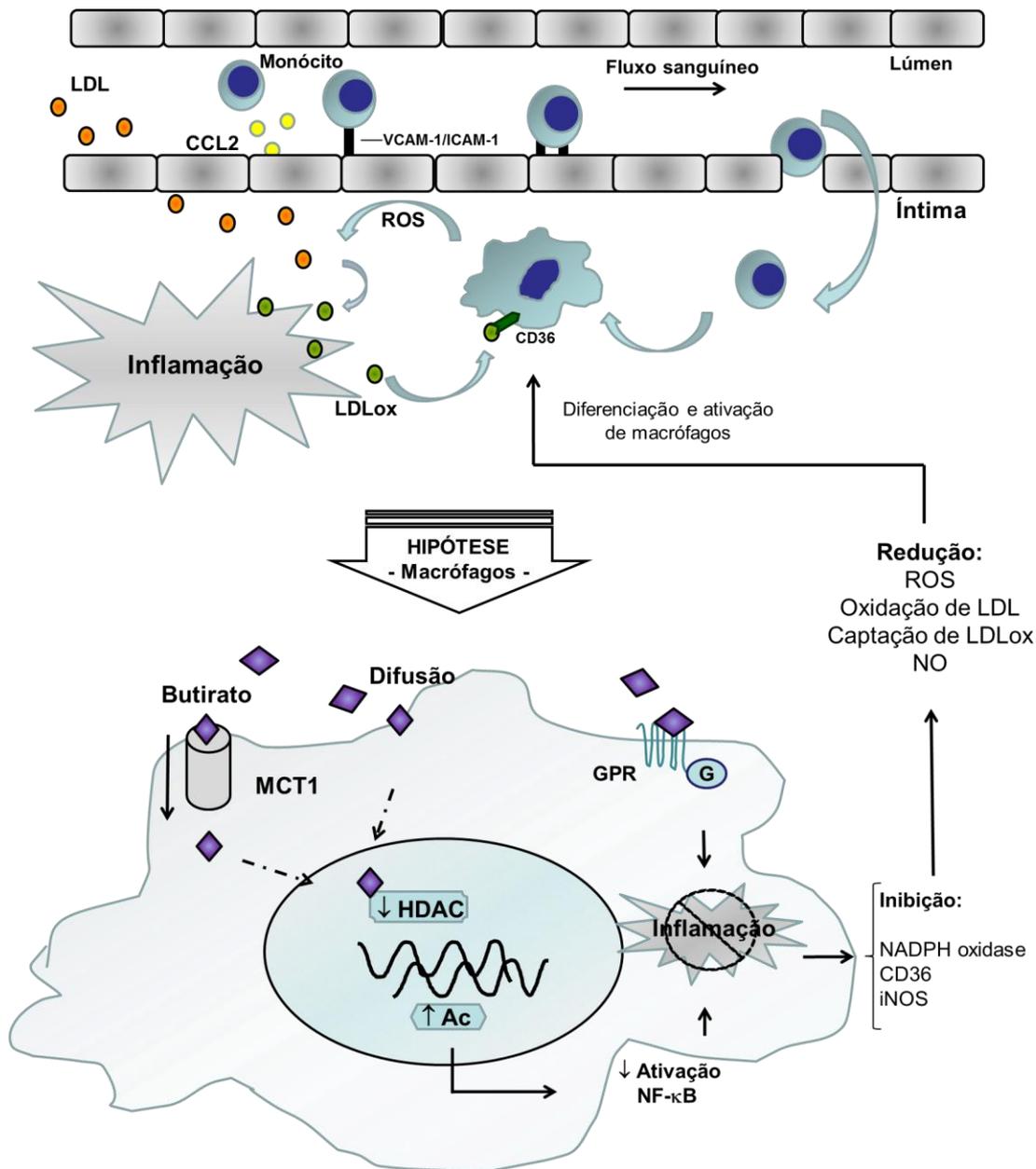


Figura 27- Hipótese da ação do butirato em macrófagos.

O butirato tem sua ação via ligação à receptores acoplados à proteína G (GPR), ou após captado, por difusão ou MCT1. O butirato induz hiperacetilação no DNA por inibir desacetilases de histonas (HDAC) e, assim, reduz a síntese do NF-κB promovendo menor perfil pró-oxidante e pró-inflamatório nos macrófagos. Deste modo, a menor expressão de NADPH oxidase-p22phox diminui a produção de ROS e, conseqüentemente, a oxidação de LDL. A inibição de CD36, então, leva a menor captação de LDL e formação de células espumosas. Adicionalmente, a expressão de iNOS é reduzida, diminuindo a produção de NO.

8- CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação oral com butirato de sódio (1%) foi capaz de retardar a evolução da lesão aterosclerótica e este efeito resultou das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes desse nutriente. O butirato reduziu a quimiotaxia, adesão e migração de monócitos, como demonstrado pela redução em CCL2 e VCAM-1, bem como menor infiltrado de macrófagos. Adicionalmente, as lesões apresentaram menor *status* oxidativo e maior estabilidade da capa fibrosa, evidenciados pela redução de superóxido/nitrotirosina e maior deposição de colágeno, respectivamente, sendo este efeito ocasionado por sua menor degradação, já que o butirato reduziu MMP2. Essas ações ateroprotetoras foram confirmadas *in vitro* pela redução de CD36, culminando em menor captação de LDLox, e pela diminuição na produção de ROS. Os mecanismos de ação do butirato resultam da menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF, e expressão de p22phox, ocasionados pela menor atividade do NF- κ B.

9- REFERÊNCIAS:

- Adiguzel, E, Ahmad, PJ, Franco, C, Bendeck, MP (2009) Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med* **14**(1): 73-89.
- Afonso, V, Champy, R, Mitrovic, D, Collin, P, Lomri, A (2007) Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* **74**(4): 324-329.
- Águila, MB, Loureiro, CC, Pinheiro Ada, R, Mandarim-De-Lacerda, CA (2002) Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. *Arq Bras Cardiol* **78**(1): 25-38.
- Aguilar, EC, Jascolka, TL, Teixeira, LG, Lages, PC, Ribeiro, AC, Vieira, EL, Peluzio, MC, Alvarez-Leite, JI (2012) Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. *Braz J Med Biol Res* **45**(7): 601-609.
- Alvarez-Leite, JI (1995) Lipoproteínas e transporte de lípidios no organismo. In: *Química Fisiológica*, Atheneu (ed). Rio de Janeiro.
- Alvarez-Leite, JI, Andrieux, C, Ferezou, J, Riottot, M, Vieira, EC (1994a) Heat or gamma irradiation sterilization affects the hypocholesterolemic effect of guar gum in axenic and heteroxenic rats. *Braz J Med Biol Res* **27**(3): 677-689.
- Alvarez-Leite, JI, Andrieux, C, Forezou, J, Riottot, M, Vieira, EC (1994b) Evidence for the absence of participation of the microbial flora in the hypocholesterolemic effect of guar gum in gnotobiotic rats. *Comp Biochem Physiol Physiol* **109**(2): 503-510.
- Andres, V, Pello, OM, Silvestre-Roig, C (2012) Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **23**(5): 429-438.
- Aoyama, M, Kotani, J, Usami, M (2010) Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition* **26**(6): 653-661.
- Bailon, E, Cueto-Sola, M, Utrilla, P, Rodriguez-Cabezas, ME, Garrido-Mesa, N, Zarzuelo, A, Xaus, J, Galvez, J, Comalada, M (2010) Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology* **215**(11): 863-873.
- Bailón, E, Cueto-Sola, M, Utrilla, P, Rodriguez-Cabezas, ME, Garrido-Mesa, N, Zarzuelo, A, Xaus, J, Galvez, J, Comalada, M (2010) Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology* **215**(11): 863-873.
- Banerjee, D, Kumar, PA, Kumar, B, Madhusoodanan, UK, Nayak, S, Jacob, J (2002) Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science* **83**(10): 2.
- Behrendt, D, Ganz, P (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* **90**(10C): 40L-48L.

- Binder, CJ, Chang, MK, Shaw, PX, Miller, YI, Hartvigsen, K, Dewan, A, Witztum, JL (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* **8**(11): 1218-1226.
- Bornfeldt, KE, Tabas, I (2011) Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab* **14**(5): 575-585.
- Brand, K, Page, S, Rogler, G, Bartsch, A, Brandl, R, Knuechel, R, Page, M, Kaltschmidt, C, Baeuerle, PA, Neumeier, D (1996) Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* **97**(7): 1715-1722.
- Breslow, JL (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* **272**(5262): 685-688.
- Brown, AJ, Goldsworthy, SM, Barnes, AA, Eilert, MM, Tcheang, L, Daniels, D, Muir, AI, Wigglesworth, MJ, Kinghorn, I, Fraser, NJ, Pike, NB, Strum, JC, Steplewski, KM, Murdock, PR, Holder, JC, Marshall, FH, Szekeres, PG, Wilson, S, Ignar, DM, Foord, SM, Wise, A, Dowell, SJ (2003) The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* **278**(13): 11312-11319.
- Buege, JA, Aust, SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302-310.
- Buonocore, G, Groenendaal, F (2007) Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med* **12**(4): 287-295.
- Burut, DF, Karim, Y, Ferns, GA (2010) The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology* **61**(7): 679-689.
- Buttery, LD, Springall, DR, Chester, AH, Evans, TJ, Standfield, EN, Parums, DV, Yacoub, MH, Polak, JM (1996) Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* **75**(1): 77-85.
- Cachofeiro, V, Goicochea, M, de Vinuesa, SG, Oubina, P, Lahera, V, Luno, J (2008) Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl*(111): S4-9.
- Cannizzo, B, Lujan, A, Estrella, N, Lembo, C, Cruzado, M, Castro, C (2012) Insulin resistance promotes early atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice. *Exp Diabetes Res* **2012**: 941304.
- Carter, WO, Narayanan, PK, Robinson, JP (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* **55**(2): 253-258.
- Casos, K, Saiz, MP, Ruiz-Sanz, JI, Mitjavila, MT (2008) Atherosclerosis prevention by a fish oil-rich diet in apoE(-/-) mice is associated with a reduction of endothelial adhesion molecules. *Atherosclerosis* **201**(2): 306-317.
- Chakravorty, D, Koide, N, Kato, Y, Sugiyama, T, Mu, MM, Yoshida, T, Yokochi, T (2000) The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *J Endotoxin Res* **6**(3): 243-247.

- Champe, PC, Harvey, RA, Ferrier, DR (2009) Colesterol e metabolismo dos esteróides. In: *Bioquímica Ilustrada*, Artmed (ed), 4 edn. Porto Alegre.
- Chung, BH, Segrest, JP, Ray, MJ, Brunzell, JD, Hokanson, JE, Krauss, RM, Beaudrie, K, Cone, JT (1986) Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol* **128**: 181-209.
- Collot-Teixeira, S, Martin, J, McDermott-Roe, C, Poston, R, McGregor, JL (2007) CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **75**(3): 468-477.
- Cook, SI, Sellin, JH (1998) Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* **12**(6): 499-507.
- Cox, MA, Jackson, J, Stanton, M, Rojas-Triana, A, Bober, L, Lavery, M, Yang, X, Zhu, F, Liu, J, Wang, S, Monsma, F, Vassileva, G, Maguire, M, Gustafson, E, Bayne, M, Chou, CC, Lundell, D, Jenh, CH (2009) Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol* **15**(44): 5549-5557.
- Cuff, MA, Shirazi-Beechey, SP (2004) The importance of butyrate transport to the regulation of gene expression in the colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 6): 1100-1102.
- Cybulsky, MI, Iiyama, K, Li, H, Zhu, S, Chen, M, Iiyama, M, Davis, V, Gutierrez-Ramos, JC, Connelly, PW, Milstone, DS (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* **107**(10): 1255-1262.
- D'Archivio, M, Scazzocchio, B, Filesi, C, Vari, R, Maggiorella, MT, Sernicola, L, Santangelo, C, Giovannini, C, Masella, R (2008) Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett* **582**(15): 2291-2298.
- Darwish, RS, Amiridze, N, Aarabi, B (2007) Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury. *J Trauma* **63**(2): 439-442.
- Davie, JR (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**(7 Suppl): 2485S-2493S.
- DeFronzo, RA (2010) Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* **53**(7): 1270-1287.
- Deliver, P, De Bosscher, K, Besnard, S, Vanden Berghe, W, Peters, JM, Gonzalez, FJ, Fruchart, JC, Tedgui, A, Haegeman, G, Staels, B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **274**(45): 32048-32054.
- Depre, C, Havaux, X, Renkin, J, Vanoverschelde, JL, Wijns, W (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res* **41**(2): 465-472.
- Dieterich, S, Bieligk, U, Beulich, K, Hasenfuss, G, Prestle, J (2000) Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* **101**(1): 33-39.

- Dolezalova, R, Haluzik, MM, Bosanska, L, Lacinova, Z, Kasalova, Z, Stulc, T, Haluzik, M (2007) Effect of PPAR-gamma agonist treatment on markers of endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res* **56**(6): 741-748.
- Fazio, S, Linton, MF (2001) Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci* **6**: D515-525.
- Febbraio, M, Abumrad, NA, Hajjar, DP, Sharma, K, Cheng, W, Pearce, SF, Silverstein, RL (1999) A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* **274**(27): 19055-19062.
- Febbraio, M, Podrez, EA, Smith, JD, Hajjar, DP, Hazen, SL, Hoff, HF, Sharma, K, Silverstein, RL (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* **105**(8): 1049-1056.
- Feng, J, Han, J, Pearce, SF, Silverstein, RL, Gotto, AM, Jr., Hajjar, DP, Nicholson, AC (2000) Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* **41**(5): 688-696.
- Feng, Q, Lu, X, Jones, DL, Shen, J, Arnold, JM (2001) Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation* **104**(6): 700-704.
- Ferreira, TM, Leonel, AJ, Melo, MA, Santos, RR, Cara, DC, Cardoso, VN, Correia, MI, Alvarez-Leite, JI (2012) Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. *Lipids* **47**(7): 669-678.
- Franssen, R, Monajemi, H, Stroes, ES, Kastelein, JJ (2008) Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**(3): 623-633, viii.
- Fruchart, JC, Duriez, P, Staels, B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **10**(3): 245-257.
- Galkina, E, Ley, K (2007) Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(11): 2292-2301.
- Gao, P, Wang, XM, Qian, DH, Qin, ZX, Jin, J, Xu, Q, Yuan, QY, Li, XJ, Si, LY (2013) Induction of oxidative stress by oxidized LDL via meprinalpha-activated epidermal growth factor receptor in macrophages. *Cardiovasc Res* **97**(3): 533-543.
- Gao, Z, Yin, J, Zhang, J, Ward, RE, Martin, RJ, Lefevre, M, Cefalu, WT, Ye, J (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* **58**(7): 1509-1517.
- German, JB, Dillard, CJ (2004) Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr* **80**(3): 550-559.
- Gill, RK, Dudeja, PK (2011) A novel facet to consider for the effects of butyrate on its target cells. Focus on "The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein". *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(5): C977-979.

- Goetz, ME, Luch, A (2008) Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett* **266**(1): 73-83.
- Gomaschi, M, Basilico, N, Sisto, F, Taramelli, D, Eligini, S, Colli, S, Sirtori, CR, Franceschini, G, Calabresi, L (2005) High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta* **1736**(2): 136-143.
- Greenow, K, Pearce, NJ, Ramji, DP (2005) The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* **83**(5): 329-342.
- Gu, L, Okada, Y, Clinton, SK, Gerard, C, Sukhova, GK, Libby, P, Rollins, BJ (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* **2**(2): 275-281.
- Hadjiagapiou, C, Schmidt, L, Dudeja, PK, Layden, TJ, Ramaswamy, K (2000) Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**(4): G775-780.
- Halestrap, AP (2012) The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* **64**(1): 1-9.
- Hamer, HM, Jonkers, D, Venema, K, Vanhoutvin, S, Troost, FJ, Brummer, RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**(2): 104-119.
- Hamer, HM, Jonkers, DM, Bast, A, Vanhoutvin, SA, Fischer, MA, Kodde, A, Troost, FJ, Venema, K, Brummer, RJ (2009) Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr* **28**(1): 88-93.
- Hamer, HM, Jonkers, DM, Vanhoutvin, SA, Troost, FJ, Rijkers, G, de Bruine, A, Bast, A, Venema, K, Brummer, RJ (2010) Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. *Clin Nutr* **29**(6): 738-744.
- Han, CY, Park, SY, Pak, YK (2000) Role of endocytosis in the transactivation of nuclear factor-kappaB by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* **350 Pt 3**: 829-837.
- Hansson, GK, Libby, P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **6**(7): 508-519.
- Harrington, JR (2000) The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem Cells* **18**(1): 65-66.
- Heinloth, A, Heermeier, K, Raff, U, Wanner, C, Galle, J (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* **11**(10): 1819-1825.
- Heistad, DD (2006) Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(4): 689-695.
- Hinnebusch, BF, Meng, S, Wu, JT, Archer, SY, Hodin, RA (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **132**(5): 1012-1017.

Hofker, MH, van Vlijmen, BJ, Havekes, LM (1998) Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **137**(1): 1-11.

Huang, Y, Jaffa, A, Koskinen, S, Takei, A, Lopes-Virella, MF (1999) Oxidized LDL-containing immune complexes induce Fc gamma receptor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation in THP-1 macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(7): 1600-1607.

Hulthe, J, Bokemark, L, Fagerberg, B (2001) Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58-year-old subjectively clinically healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(1): 101-107.

Huuskonen, J, Suuronen, T, Nuutinen, T, Kyrölenko, S, Salminen, A (2004) Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol* **141**(5): 874-880.

Imaizumi, K (2011) Diet and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**(6): 1023-1035.

Kajita, M, Murata, T, Horiguchi, K, Iizuka, M, Hori, M, Ozaki, H (2011) iNOS expression in vascular resident macrophages contributes to circulatory dysfunction of splanchnic vascular smooth muscle contractions in portal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**(3): H1021-1031.

Karaki, S, Mitsui, R, Hayashi, H, Kato, I, Sugiya, H, Iwanaga, T, Furness, JB, Kuwahara, A (2006) Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res* **324**(3): 353-360.

Karaki, S, Tazoe, H, Hayashi, H, Kashiwabara, H, Tooyama, K, Suzuki, Y, Kuwahara, A (2008) Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Histol* **39**(2): 135-142.

Kasza, A (2013) IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine* **62**(1): 22-33.

Kato, R, Mori, C, Kitazato, K, Arata, S, Obama, T, Mori, M, Takahashi, K, Aiuchi, T, Takano, T, Itabe, H (2009) Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(1): 33-39.

Kawashima, S, Yokoyama, M (2004) Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(6): 998-1005.

Kibbe, M, Billiar, T, Tzeng, E (1999) Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* **43**(3): 650-657.

Kiener, PA, Rankin, BM, Davis, PM, Yocum, SA, Warr, GA, Grove, RI (1995) Immune complexes of LDL induce atherogenic responses in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(7): 990-999.

Kim, HS, Whang, SY, Woo, MS, Park, JS, Kim, WK, Han, IO (2004) Sodium butyrate suppresses interferon-gamma-, but not lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in microglia. *J Neuroimmunol* **151**(1-2): 85-93.

- Kinoshita, H, Matsumura, T, Ishii, N, Fukuda, K, Senokuchi, T, Motoshima, H, Kondo, T, Taketa, K, Kawasaki, S, Hanatani, S, Takeya, M, Nishikawa, T, Araki, E (2013) Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **431**(2): 124-130.
- Kuzuya, M, Nakamura, K, Sasaki, T, Cheng, XW, Itohara, S, Iguchi, A (2006) Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(5): 1120-1125.
- Le Poul, E, Loison, C, Struyf, S, Springael, JY, Lannoy, V, Decobecq, ME, Brezillon, S, Dupriez, V, Vassart, G, Van Damme, J, Parmentier, M, Detheux, M (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* **278**(28): 25481-25489.
- Lee, IT, Yang, CM (2012) Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol* **84**(5): 581-590.
- Lee, TS, Yen, HC, Pan, CC, Chau, LY (1999) The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(3): 734-742.
- Leonel, AJ, Alvarez-Leite, JI (2012a) Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **15**(5): 474-479.
- Leonel, AJ, Teixeira, LG, Oliveira, RP, Santiago, AF, Batista, NV, Ferreira, TR, Santos, RC, Cardoso, VN, Cara, DC, Faria, AM, Alvarez-Leite, J (2012b) Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. *Br J Nutr* **109**(8): 1396-1407.
- Ley, K, Huo, Y (2001) VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* **107**(10): 1209-1210.
- Li, AC, Binder, CJ, Gutierrez, A, Brown, KK, Plotkin, CR, Pattison, JW, Valledor, AF, Davis, RA, Willson, TM, Witztum, JL, Palinski, W, Glass, CK (2004) Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* **114**(11): 1564-1576.
- Li, AC, Glass, CK (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* **8**(11): 1235-1242.
- Li, H, Forstermann, U (2009) Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des* **15**(27): 3133-3145.
- Li, Z, Li, L, Zielke, HR, Cheng, L, Xiao, R, Crow, MT, Stetler-Stevenson, WG, Froehlich, J, Lakatta, EG (1996) Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **148**(1): 121-128.
- Libby, P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**(6917): 868-874.
- Libby, P, Ridker, PM, Hansson, GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**(7347): 317-325.

- Liu, T, Li, J, Liu, Y, Xiao, N, Suo, H, Xie, K, Yang, C, Wu, C (2012) Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF-kappaB pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation* **35**(5): 1676-1684.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Lu, SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* **30**(1-2): 42-59.
- Lumeng, CN, Deyoung, SM, Bodzin, JL, Saltiel, AR (2007) Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**(1): 16-23.
- Lusis, AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**(6801): 233-241.
- Luttun, A, Lutgens, E, Manderveld, A, Maris, K, Collen, D, Carmeliet, P, Moons, L (2004) Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* **109**(11): 1408-1414.
- Maa, MC, Chang, MY, Chen, YJ, Lin, CH, Yu, CJ, Yang, YL, Li, J, Chen, PR, Tang, CH, Lei, HY, Leu, TH (2008) Requirement of inducible nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated Src induction and macrophage migration. *J Biol Chem* **283**(46): 31408-31416.
- Maa, MC, Chang, MY, Hsieh, MY, Chen, YJ, Yang, CJ, Chen, ZC, Li, YK, Yen, CK, Wu, RR, Leu, TH (2010) Butyrate reduced lipopolysaccharide-mediated macrophage migration by suppression of Src enhancement and focal adhesion kinase activity. *J Nutr Biochem* **21**(12): 1186-1192.
- Machado, RA, Constantino Lde, S, Tomasi, CD, Rojas, HA, Vuolo, FS, Vitto, MF, Cesconetto, PA, de Souza, CT, Ritter, C, Dal-Pizzol, F (2012) Sodium butyrate decreases the activation of NF-kappaB reducing inflammation and oxidative damage in the kidney of rats subjected to contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **27**(8): 3136-3140.
- Mallika, V, Goswami, B, Rajappa, M (2007) Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology* **58**(5): 513-522.
- Manea, A, Manea, SA, Gafencu, AV, Raicu, M (2007) Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells. *Arch Physiol Biochem* **113**(4-5): 163-172.
- Manning-Tobin, JJ, Moore, KJ, Seimon, TA, Bell, SA, Sharuk, M, Alvarez-Leite, JI, de Winther, MP, Tabas, I, Freeman, MW (2009) Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(1): 19-26.
- Maslowski, KM, Vieira, AT, Ng, A, Kranich, J, Sierro, F, Yu, D, Schilter, HC, Rolph, MS, Mackay, F, Artis, D, Xavier, RJ, Teixeira, MM, Mackay, CR (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**(7268): 1282-1286.
- McFarlane, SI, Banerji, M, Sowers, JR (2001) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(2): 713-718.

- Meijer, K, de Vos, P, Priebe, MG (2010) Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**(6): 715-721.
- Meir, KS, Leitersdorf, E (2004) Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(6): 1006-1014.
- Menzel, T, Luhrs, H, Zirlik, S, Schaubert, J, Kudlich, T, Gerke, T, Gostner, A, Neumann, M, Melcher, R, Scheppach, W (2004) Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1. *Inflamm Bowel Dis* **10**(2): 122-128.
- Mitchinson, MJ, Ball, RY (1987) Macrophages and atherogenesis. *Lancet* **2**(8551): 146-148.
- Moghadasian, MH, McManus, BM, Nguyen, LB, Shefer, S, Nadji, M, Godin, DV, Green, TJ, Hill, J, Yang, Y, Scudamore, CH, Frohlich, JJ (2001) Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J* **15**(14): 2623-2630.
- Monaco, C, Paleolog, E (2004) Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res* **61**(4): 671-682.
- Monaghan, P, Metcalfe, NB, Torres, R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* **12**(1): 75-92.
- Monneret, C (2005) Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* **40**(1): 1-13.
- Moore, KJ, Freeman, MW (2006) Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(8): 1702-1711.
- Morais, CSN, Barcelos, MFP, Sousa, RV, Lima, HM, Lima, AL (2003) Efeitos das fontes e níveis de lipídios nas dietas de ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) sobre frações lipídicas do sangue. *Ciência e Agrotecnologia* **27**(5): 7.
- Mudau, M, Genis, A, Lochner, A, Strijdom, H (2012) Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* **23**(4): 222-231.
- Murray, PJ (2005) The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8686-8691.
- Naik, E, Dixit, VM (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* **208**(3): 417-420.
- Nakashima, Y, Plump, AS, Raines, EW, Breslow, JL, Ross, R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* **14**(1): 133-140.
- Napetschnig, J, Wu, H Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* **42**: 443-468.
- Nelson, DP, Kiesow, LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* **49**(2): 474-478.

- Neuzil, J, Christison, JK, Iheanacho, E, Fragonas, JC, Zammit, V, Hunt, NH, Stocker, R (1998) Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene knockout (apoE^{-/-}) mice: apoE^{-/-} mouse as a model for testing the role of tocopherol-mediated peroxidation in atherogenesis. *J Lipid Res* **39**(2): 354-368.
- Newaz, M, Ranganna, K, Truong, LD, Oyekan, A (2009) Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha siRNA on hypertension and renal injury in the rat following nitric oxide withdrawal and high salt diet. *J Hypertens* **27**(11): 2223-2231.
- Ni, YF, Wang, J, Yan, XL, Tian, F, Zhao, JB, Wang, YJ, Jiang, T (2010) Histone deacetylase inhibitor, butyrate, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Respir Res* **11**: 33.
- Nicholson, AC, Hajjar, DP (2004) CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* **41**(4-5): 139-146.
- Niu, QX, Chen, HQ, Chen, ZY, Fu, YL, Lin, JL, He, SH (2008) Induction of inflammatory cytokine release from human umbilical vein endothelial cells by agonists of proteinase-activated receptor-2. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**(1): 89-96.
- Nourooz-Zadeh, J, Tajaddini-Sarmadi, J, Wolff, SP (1994) Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* **220**(2): 403-409.
- Oeckinghaus, A, Ghosh, S (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(4): a000034.
- Ogawa, H, Rafiee, P, Fisher, PJ, Johnson, NA, Otterson, MF, Binion, DG (2003) Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **309**(3): 512-519.
- Ohashi, R, Mu, H, Yao, Q, Chen, C (2004) Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. *Trends Cardiovasc Med* **14**(5): 187-190.
- Ohira, H, Fujioka, Y, Katagiri, C, Mamoto, R, Aoyama-Ishikawa, M, Amako, K, Izumi, Y, Nishiumi, S, Yoshida, M, Usami, M, Ikeda, M (2013) Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. *J Atheroscler Thromb* **20**(5): 425-442.
- Page-McCaw, A, Ewald, AJ, Werb, Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 221-233.
- Palinski, W, Ord, VA, Plump, AS, Breslow, JL, Steinberg, D, Witztum, JL (1994) ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* **14**(4): 605-616.
- Park, JS, Lee, EJ, Lee, JC, Kim, WK, Kim, HS (2007) Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int Immunopharmacol* **7**(1): 70-77.

- Park, YM, Febbraio, M, Silverstein, RL (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* **119**(1): 136-145.
- Parthasarathy, S, Litvinov, D, Selvarajan, K, Garelnabi, M (2008) Lipid peroxidation and decomposition--conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochim Biophys Acta* **1781**(5): 221-231.
- Pereira, SS, Teixeira, LG, Aguilar, EC, Matoso, RO, Soares, FL, Ferreira, AV, Alvarez-Leite, JI (2012) Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet. *Anim Sci J* **83**(7): 549-555.
- Planchet, E, Kaiser, WM (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot* **57**(12): 3043-3055.
- Powers, SK, Jackson, MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* **88**(4): 1243-1276.
- Puiggrós, C, Chacon, P, Armadans, LI, Clapes, J, Planas, M (2002) Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients. *Clin Nutr* **21**(1): 79-87.
- Rajagopalan, S, Meng, XP, Ramasamy, S, Harrison, DG, Galis, ZS (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* **98**(11): 2572-2579.
- Ramos, MG, Rabelo, FLA, Duarte, T, Gazzinelli, RT, Alvarez-Leite, JI (2002) Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis Factor and nitric oxide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **35**(2): 13.
- RAMOS, MGR, F.L.A.; DUARTE, T.; GAZZINELLI, R.T.; ALVAREZ-LEITE, J.I (2002) Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis Factor and nitric oxide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **35**(2): 13.
- Ranganna, K, Mathew, OP, Yatsu, FM, Yousefipour, Z, Hayes, BE, Milton, SG (2007) Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *FEBS J* **274**(22): 5962-5978.
- Rideout, TC, Harding, SV, Jones, PJ, Fan, MZ (2008) Guar gum and similar soluble fibers in the regulation of cholesterol metabolism: current understandings and future research priorities. *Vasc Health Risk Manag* **4**(5): 1023-1033.
- Rosenson, RS (2004) Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* **173**(1): 1-12.
- Rosignoli, P, Fabiani, R, De Bartolomeo, A, Spinozzi, F, Agea, E, Pelli, MA, Morozzi, G (2001) Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* **22**(10): 1675-1680.

- Ross, R (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**: 791-804.
- Rubic, T, Lorenz, RL (2006) Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc Res* **69**(2): 527-535.
- Russo, I, Luciani, A, De Cicco, P, Troncone, E, Ciacci, C (2012) Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of antioxidant defense machinery. *PLoS One* **7**(3): e32841.
- Saegusa, S, Totsuka, M, Kaminogawa, S, Hosoi, T (2007) Cytokine responses of intestinal epithelial-like Caco-2 cells to non-pathogenic and opportunistic pathogenic yeasts in the presence of butyric acid. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**(10): 2428-2434.
- Säemann, MD, Bohmig, GA, Osterreicher, CH, Burtscher, H, Parolini, O, Diakos, C, Stockl, J, Horl, WH, Zlabinger, GJ (2000) Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J* **14**(15): 2380-2382.
- Santos, SH, Fernandes, LR, Mario, EG, Ferreira, AV, Porto, LC, Alvarez-Leite, JI, Botion, LM, Bader, M, Alenina, N, Santos, RA (2008) Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glyceemic metabolism. *Diabetes* **57**(2): 340-347.
- Sasaki, T, Nakamura, K, Sasada, K, Okada, S, Cheng, XW, Suzuki, T, Murohara, T, Sato, K, Kuzuya, M Matrix metalloproteinase-2 deficiency impairs aortic atherosclerotic calcification in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* **227**(1): 43-50.
- Sauer, J, Richter, KK, Pool-Zobel, BL (2007) Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **18**(11): 736-745.
- Schwab, M, Reynders, V, Loitsch, S, Steinhilber, D, Stein, J, Schroder, O (2007) Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling. *Mol Immunol* **44**(15): 3625-3632.
- Segain, JP, Raingeard de la Bletiere, D, Bourreille, A, Leray, V, Gervois, N, Rosales, C, Ferrier, L, Bonnet, C, Blottiere, HM, Galmiche, JP (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**(3): 397-403.
- Semenkovich, CF (2006) Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* **116**(7): 1813-1822.
- Shah, A, Mehta, N, Reilly, MP (2008) Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **32**(6): 638-644.
- Shishehbor, MH, Aviles, RJ, Brennan, ML, Fu, X, Goormastic, M, Pearce, GL, Gokce, N, Keaney, JF, Jr., Penn, MS, Sprecher, DL, Vita, JA, Hazen, SL (2003) Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* **289**(13): 1675-1680.
- Shoelson, SE, Lee, J, Goldfine, AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**(7): 1793-1801.

- Shoenfeld, Y, Wu, R, Dearing, LD, Matsuura, E (2004) Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation* **110**(17): 2552-2558.
- Siennicka, A (2005) [The effect of short-chain fatty acids on expression of endothelial adhesion molecules stimulated by oxidatively modified LDL]. *Ann Acad Med Stetin* **51**(1): 117-126.
- Smith, CW (2008) 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol* **121**(2 Suppl): S375-379; quiz S414.
- Spallarossa, P, Altieri, P, Garibaldi, S, Ghigliotti, G, Barisione, C, Manca, V, Fabbi, P, Ballestrero, A, Brunelli, C, Barsotti, A (2006) Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res* **69**(3): 736-745.
- Stathopoulos, PB, Lu, X, Shen, J, Scott, JA, Hammond, JR, McCormack, DG, Arnold, JM, Feng, Q (2001) Increased L-arginine uptake and inducible nitric oxide synthase activity in aortas of rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(2): H859-867.
- Steffens, S, Mach, F (2004) Inflammation and atherosclerosis. *Herz* **29**(8): 741-748.
- Steliou, K, Boosalis, MS, Perrine, SP, Sangerman, J, Faller, DV (2012) Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access* **1**(4): 192-198.
- Tang, Y, Chen, Y, Jiang, H, Robbins, GT, Nie, D (2011) G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Cancer* **128**(4): 847-856.
- Tazoe, H, Otomo, Y, Karaki, S, Kato, I, Fukami, Y, Terasaki, M, Kuwahara, A (2009) Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed Res* **30**(3): 149-156.
- Tedgui, A, Mallat, Z (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* **86**(2): 515-581.
- Thibault, R, Blachier, F, Darcy-Vrillon, B, de Coppet, P, Bourreille, A, Segain, JP (2010) Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis* **16**(4): 684-695.
- Tordjman, K, Bernal-Mizrachi, C, Zemany, L, Weng, S, Feng, C, Zhang, F, Leone, TC, Coleman, T, Kelly, DP, Semenkovich, CF (2001) PPARalpha deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest* **107**(8): 1025-1034.
- Trachootham, D, Lu, W, Ogasawara, MA, Nilsa, RD, Huang, P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* **10**(8): 1343-1374.
- Tsimikas, S, Palinski, W, Witztum, JL (2001) Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(1): 95-100.
- Ulven, T (2012) Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 111.

- Upmacis, RK (2008) Atherosclerosis: A Link Between Lipid Intake and Protein Tyrosine Nitration. *Lipid Insights* **2008**(2): 75.
- VanderLaan, PA, Reardon, CA, Getz, GS (2004) Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(1): 12-22.
- Vanhoutvin, SA, Troost, FJ, Hamer, HM, Lindsey, PJ, Koek, GH, Jonkers, DM, Kodde, A, Venema, K, Brummer, RJ (2009) Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One* **4**(8): e6759.
- Vasquez, EC, Peotta, VA, Gava, AL, Pereira, TM, Meyrelles, SS (2012) Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci* **19**: 22.
- Vieira, EL, Leonel, AJ, Sad, AP, Beltrao, NR, Costa, TF, Ferreira, TM, Gomes-Santos, AC, Faria, AM, Peluzio, MC, Cara, DC, Alvarez-Leite, JI (2012) Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem* **23**(5): 430-436.
- Vinolo, MA, Rodrigues, HG, Hatanaka, E, Sato, FT, Sampaio, SC, Curi, R (2011a) Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem* **22**(9): 849-855.
- Vinolo, MA, Rodrigues, HG, Nachbar, RT, Curi, R (2011b) Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* **3**(10): 858-876.
- Wagsater, D, Zhu, C, Bjorkegren, J, Skogsberg, J, Eriksson, P (2011) MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. *Int J Mol Med* **28**(2): 247-253.
- Wallin, B, Rosengren, B, Shertzer, HG, Camejo, G (1993) Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem* **208**(1): 10-15.
- Wang, P, Wu, P, Siegel, MI, Egan, RW, Billah, MM (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* **270**(16): 9558-9563.
- Weisberg, SP, McCann, D, Desai, M, Rosenbaum, M, Leibel, RL, Ferrante, AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**(12): 1796-1808.
- Williams, JM, Zhao, X, Wang, MH, Imig, JD, Pollock, DM (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation reduces salt-dependent hypertension during chronic endothelin B receptor blockade. *Hypertension* **46**(2): 366-371.
- Yano, S, Tierney, DF (1989) Butyrate increases catalase activity and protects rat pulmonary artery smooth muscle cells against hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **164**(3): 1143-1148.
- Ye, JM, Doyle, PJ, Iglesias, MA, Watson, DG, Cooney, GJ, Kraegen, EW (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes* **50**(2): 411-417.

Yin, L, Laevsky, G, Giardina, C (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* **276**(48): 44641-44646.

Zandbergen, F, Plutzky, J (2007) PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta* **1771**(8): 972-982.

Zapolska-Downar, D, Siennicka, A, Kaczmarczyk, M, Kolodziej, B, Naruszewicz, M (2004) Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-kappaB and PPARalpha. *J Nutr Biochem* **15**(4): 220-228.

Zhang, SH, Reddick, RL, Piedrahita, JA, Maeda, N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**(5081): 468-471.

Zhong, H, May, MJ, Jimi, E, Ghosh, S (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* **9**(3): 625-636.

Zimmerman, MA, Singh, N, Martin, PM, Thangaraju, M, Ganapathy, V, Waller, JL, Shi, H, Robertson, KD, Munn, DH, Liu, K (2012) Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**(12): G1405-1415.

10- ANEXO

10.1- Comprovante de publicação Revista: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases-NMCD (primeira página)

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2014) 24, 606–613

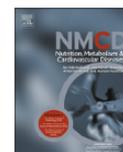


ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

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



Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NFκB activation



E.C. Aguilar ^a, A.J. Leonel ^a, L.G. Teixeira ^a, A.R. Silva ^b, J.F. Silva ^c, J.M.N. Pelaez ^c, L.S.A. Capettini ^c, V.S. Lemos ^c, R.A.S. Santos ^b, J.I. Alvarez-Leite ^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Immunology of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^c Department of Pharmacology of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Received 8 October 2013; received in revised form 14 December 2013; accepted 2 January 2014

Available online 25 January 2014

KEYWORDS

Butyrate;
Atherosclerosis;
Macrophage;
Fatty acid

Abstract *Background & aims:* Butyrate is a four-carbon fatty acid that presents anti-inflammatory, anti-oxidative and apoptotic properties in colon and several cell lines. Because atherosclerosis has important oxidative and inflammatory components, butyrate could reduce oxidation and inflammation, impairing atherogenesis. We evaluated the effects of butyrate supplementation of butyrate on atherosclerosis and its mechanisms of action.

Methods and results: ApoE knockout mice were fed on chow diet or 1% butyrate-supplemented chow diet (Butyrate) for 10 weeks to assess atherosclerosis lesions area and inflammatory status. Macrophage and endothelial cells were also pretreated with butyrate (0.5 mM) for 2 h before oxLDL stimulation to study oxLDL uptake and pro and anti-inflammatory cytokine production. Butyrate reduced atherosclerosis in the aorta by 50%. In the aortic valve, butyrate reduced CCL2, VCAM1 and MMP2 productions in the lesion site, resulting in a lower migration of macrophage and increased collagen depositions in the lesion and plaque stability. When EA.hy926 cells were pretreated with butyrate, oxLDL uptake, CD36, VCAM1, CCL2, TNF, IL1β and IL6 productions were reduced, whereas IL10 production was increased. These effects were accompanied by a lower activation of NFκB due to a lower nuclear translocation of the p65 subunit.

Conclusion: Oral butyrate is able to slow the progression of atherosclerosis by reducing adhesion and migration of macrophages and increasing plaque stability. These actions are linked to the reduction of CD36 in macrophages and endothelial cells, decreased pro-inflammatory cytokines and lower activation of NFκB all of these data support a possible role for butyrate as an athero-protective agent.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Atherosclerosis is a cardiovascular disease of multifactorial etiology in which a chronic inflammation results in endothelial dysfunction, a key process for the onset of this disease. Immune response plays essential role in

atherosclerosis because oxidized LDL (oxLDL) activates endothelial cells and monocytes, triggering the inflammatory process [1] which is activated via nuclear transcription factor-kappa B (NFκB) [2]. In this way anti-inflammatory agents could retard or reduce atherosclerosis.

Butyrate is a 4-carbon fatty acid mainly produced by the colonic fermentation of fibers in the colon and has been studied as an adjuvant in intestinal disorders [3–5]. Butyrate also acts systemically, mainly as an anti-inflammatory and antioxidant agent [3,5]. Many of these

* Corresponding author. ICB/UFMG, Caixa Postal 486, 30161-970 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2652.

E-mail address: jalvarezleite@gmail.com (J.I. Alvarez-Leite).