

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

REGINALDO MARQUES DA SILVA

**“LIPÍDEO ESTRUTURADO CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO
NA OBESIDADE E INFLAMAÇÃO PÓS-PRANDIAL EM
CAMUNDONGOS”**

Bragança Paulista

2019

REGINALDO MARQUES DA SILVA - R.A. 001201606400

**“LIPÍDEO ESTRUTURADO CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO
NA OBESIDADE E INFLAMAÇÃO PÓS-PRANDIAL EM
CAMUNDONGOS ”**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Gambero.

Bragança Paulista

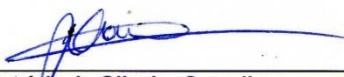
2019

WD 210	Silva, Reginaldo Marques da
S583L	Lipídeos estruturado contendo ácido behênico na obesidade e inflamação pós-prandial em camundongos / Reginaldo Marques da Silva. - Bragança Paulista, 2019. 69 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências da Saúde da Universidade São

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF

Ficha catalográfica elaborada por: Denise Isabel Arten – CRB-8/5823

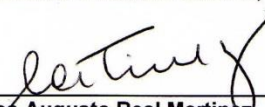
SILVA, Reginaldo Marques da "*Lípideo Estruturado Contendo Ácido Behênico na Obesidade e Inflamação Pós Prandial em Camundongos*". Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 22 de agosto de 2019 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



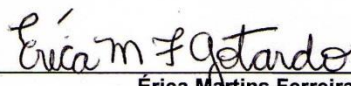
Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Alessandra Gambero
(Orientadora e Membro externo)



Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Érica Martins Ferreira Gotardo
Universidade Estadual de Campinas



Raquel de Cássia dos Santos
Universidade São Francisco



Tanila Wood dos Santos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Mirlene e minha filha Mariana, que me apoiaram e em memória de Maria Deuza minha querida mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao nosso Senhor Jesus Cristo consumidor da vida.

À minha esposa Mirlene e minha filha Mariana pelo carinho e amor.

De forma muito especial, agradeço à Professora Doutora Alessandra Gambero que me recebeu tão gentilmente, pela orientação durante esses 3 anos (Seus ensinamentos, sua confiança e sua sinceridade e sua atenção).

A todos os colegas de bancada, Cintia, Paola, Thainá, Caio, Debora, Carol, Erica, Simone, Michelle, Tanila, Melina, Quélita, Leticia, Ligia, Rafael, Guilherme, Felipe, Aline, Juliana, Natalia, Catarina e Harison obrigado pela simpatia, destreza e aprendizado durante esse tempo que passamos juntos.

Aos meus pais, Jose Marques e em memória Maria Deuza. Que sempre acreditaram no meu esforço.

À irmã Eliana e os irmãos José Carlos e Cesar que sempre me apoiaram e ouviram em todas as decisões tomadas e toda minha família e amigos que contribuíram para meu crescimento mesmo distante me apoiaram.

À todos os professores, secretarias e assistentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e os funcionários da Universidade São Francisco, pelas contribuições e convívio. Todos que contribuíram diretamente com a execução deste trabalho ou que estiveram presentes em minha vida, mesmo sendo por um curto momento obrigado.

À Universidade São Francisco pelo apoio e serviços

Aos funcionários do biotério: Fabiano, Walter, Paulo, Amauri, Kevin, Lazinho.

À CAPES pelo apoio financeiro e à FAPESP.

O Senhor é o meu pastor; de nada terei falta. Mesmo quando eu andar por um vale de trevas e morte, não temerei perigo algum, pois tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me protegem.
Salmos 23: 1;4

RESUMO

A obesidade é definida como a expansão maciça do tecido adiposo branco (TAB) devido ao desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto de energia. Na obesidade, a expansão do TAB se manifesta por aumento no número de adipócitos hipertróficos gerando alterações locais que incluem hipóxia, estresse oxidativo, inflamação e resistência à insulina. Lipídeos estruturados (LE) são triacilgliceróis reestruturados em relação a sua composição ou distribuição de ácidos graxos na cadeia de glicerol com o objetivo de alterar propriedades físicoquímicas ou nutricionais. LE contendo ácido behênico, um ácido graxo de cadeia muito longa (VLCFA), são parcialmente absorvidos e podem atuar como inibidores de lipase pancreática no intestino, reduzindo a absorção de lipídeos e o aporte calórico, apresentando grande potencial no manejo dietético de pacientes obesos. Neste trabalho, um LE obtido por interesterificação enzimática a partir da mistura de óleo de soja/oliva/crambe totalmente hidrogenado foi avaliado quanto a capacidade de controlar a inflamação pós-prandial e o seu efeito anorexígeno comparado ao fármaco orlistat. Os resultados mostraram que a absorção de LPS foi significativamente reduzida, após uma refeição rica em gordura com LE, assim como os níveis de interleucina (IL)-6 e CRP séricos. Por outro lado, o efeito anorexígeno de LE não foi observado. Porém, foram observados a diminuição nos triglicérides (TG) e glicemia do grupo tratado com LE. Outros aspectos observados foram a diminuição da macroesteatose, de lipídios totais e diminuição da expressão gênica de IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , *Toll-like* receptor (TLR)-4 e *cluster of differentiation* (CD)36 no fígado. Reduções na absorção de vitamina D foram observadas nos grupos da dieta 50% banha de porco (DH50) e dieta 100% LE (DH100). Análise da microbiota intestinal foi realizada pelo método quantitativo de DNA específico de Firmicutes e Bacteroidetes e revelou um aumento destes filos nas fezes dos camundongos que consumiram LE e Orlistat. A avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no colon não mostrou aumento no infiltrado de neutrófilos, bem como não houve alterações nas expressões gênicas dos transportadores de lipídeos no intestino. Concluímos que o LE diminuiu a inflamação pós-prandial e houve melhora no controle glicêmico e no quadro de doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), além de uma melhora significativa da disbiose associada à obesidade.

Palavras Chaves: Lipídeo estruturado. Ácido Behênico. Inflamação pós-prandial. Obesidade.

ABSTRACT

Obesity is defined as the massive expansion of white adipose tissue (WAT) due to the imbalance between a caloric intake and energy expenditure. In obesity, the expansion of WAT is manifested by an increase in the number of hypertrophic adipocytes that generate local changes as hypoxia, oxidative stress, inflammation and insulin resistance. Structured lipids (LE) are restructured triacylglycerols in relation to their composition or distribution of fatty acids in the glycerol chain in order to alter physicochemical or nutritional properties. LE containing behenic acid, a very long chain fatty acid (VLCFA), is partially absorbed and can act as pancreatic lipase inhibitors in the intestine, reducing lipid absorption and caloric intake, presenting great potential in the dietary management of obese patients. In this work, an LE obtained by enzymatic interesterification from the fully hydrogenated soybean / olive / crambe oil mixture was evaluated for the ability to control postprandial inflammation and its anorectic effect compared to orlistat drug. Results showed that LPS absorption was significantly reduced following a high-fat meal with LE, as well as serum interleukin (IL) -6 and CRP levels. On the other hand, the anorectic effect of LE was not observed. However, a decrease in triglycerides (TG) and glucose blood level was observed in the group treated with LE. Other aspects observed were decreased macrosteatosis, total lipid and decreased gene expression of IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , *Toll-like receptor* (TLR)-4 and cluster of differentiation (CD) 36 in the liver. Reductions in vitamin D absorption were observed in the 50% lard (DH50) and 100% LE (DH100) diet groups. Intestinal microbiota analysis was performed by the Firmicutes and Bacteroidetes specific DNA quantitative method and revealed an increase of these phyla in the feces of LE and Orlistat mice. Evaluation of myeloperoxidase (MPO) activity in the colon showed no increase in neutrophil infiltrate, as well as no changes in the gene expression of lipid transporters in the intestine. To conclude that LE decreased postprandial inflammation and improved glycemic control and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), as well as a significant improvement in obesity-associated dysbiosis.

Keywords: Structured lipid. Behenic Acid. Postprandial inflammation. Obesity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Araquidônico
AGCC: Ácido graxo cadeia curta
AGIS: Ácido graxo insaturado
AGS: Ácido graxo saturado
ANOVA: Análise de variância
AUC: Área sobre a curva
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCR2: Receptor de quimiocina 2
CD36: Receptor de ácido graxos de cadeia longa
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório
CEUA: Comitê de ética no uso de animal em pesquisa
CN: Ração comercial
CRP: Proteína c reativa
CT: Colesterol total
CTs: threshold cycle (ciclo limiar)
DAGs: Diacilgliceróis
DHA: Docosaheptaenóico
DH: Dieta hiperlipídica
DH50: Dieta hiperlipídica 50% banha de porco e 50% lipídio estruturado
DH100: 100% lipídio estruturado
DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica
DHORLISTAT: Dieta hiperlipídica + Orlistat
DM2: diabetes tipo 2
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay = ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
ENS: Ensure
EPA: Eicosapentanoico
EPM: Erro padrão da média
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FATP2: Proteína de transporte de ácido graxo 2
FATP5: Proteína de transporte de ácido graxo 5
FEV: Fração estromal vascular
FIG: Fígado
GAST: Musculo gastrocnêmico
GIP: peptídeo inibidor gástrico
GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon 1 ativo
GTT: Teste de tolerância a glicose
HDL: lipoproteína de alta densidade
HE: Hematoxilina e eosina
IL-1 β : Interleucina-1 β
IL-2: Interleucina 2

IL-3: Interleucina 3
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina 10
IP: Intraperitoneal
ITT: Teste de tolerância à insulina
KCs: células Kupffer
KIT: Constante do teste de tolerância à insulina
LAL: Limulus amebocyte lysate
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LE: Lipídio estruturado
LPS: lipopolissacarídeo
MAGs: monoacilgliceróis
MCFA: Ácido graxo cadeia média
MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1
MD-2-TLR4: Receptor-diferenciação mielóide-2/receptores toll-like-4
MUFA: Ácido graxo monoinsaturado
NaOH: Hidróxido de sódio
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
O/S: Óleo de oliva e soja mais ensure
O/S/C: Óleo de Oliva, soja e óleo de crumbe totalmente hidrogenado mais ensure
PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio
PP: Polipeptídeo pancreático
PYY: peptídeo tirosina-tirosina
PUFAs: Ácidos graxos poli-insaturado
qPCR: Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time
RNA: Ácido ribonucleico
TAB: Tecido adiposo branco
TAE: Tecido adiposo epididimal
TAM: Tecido adiposo
TAMA: Tecido adiposo inter escapular
TAP: Tecido adiposo peritoneal
TAS: Tecido adiposo inguinal
TG: Triglicérides
TAGs: triacilgliceróis
TNF- α : fator de necrose tumoral α
USF: Universidade São Francisco
VLCFA: ácido graxo cadeia muito longa

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Esquema da administração das refeições nos camundongos	24
Figura 2. Esquema da administração das dietas nos camundongos	27
Figura 3. Níveis de triglicérides e de glicose pós-prandiais	33
Figura 4. Níveis de colesterol pós-prandiais	34
Figura 5. Marcadores de inflamação pós-prandial	35
Figura 6. Níveis séricos pós-prandiais de hormônios	36
Figura 7. Esvaziamento gástrico após a administração oral de uma refeição	37
Figura 8. Peso corporal dos animais durante as 14 semanas	39
Figura 9. Pesos dos tecidos dos animais	40
Figura 10. Glicemia basal (A), Área sobre a curva (AUC)	41
Figura 11. Níveis de TG e colesterol séricos	42
Figura 12. Avaliação dos níveis de vitamina D	43
Figura 13. Avaliação dos níveis séricos de endotoxina	44
Figura 14 . Cortes histológicos de fígado	45
Figura 15. Quantificação de macro (A) e microesteatose (B) em fígado	46
Figura 16. Conteúdo hepático de lipídeos totais	47
Figura 17. Avaliação da expressão gênica no fígado	48
Figura 18. Expressão quantitativa de DNA nas fezes	49
Figura 19. Atividade da mieloperoxidase no colon	49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição do ensure_____	25
Tabela 2. Composição de macronutrientes da dieta_____	28
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados_____	31
Tabela 4. Perfil qualitativo de ácidos graxos séricos _____	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos gerais.....	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Síntese do LE	23
3.2. Animais.....	23
3.3. Teste de tolerância oral à refeição e parâmetros séricos avaliados	23
3.4. Avaliação do tempo de esvaziamento gástrico	26
3.5. Caracterização do perfil lipídico plasmático	26
3.6. Indução de obesidade por DH e tratamento dos camundongos com LE	26
3.7. Glicemia basal, Teste de tolerância à Insulina (ITT) e Teste de tolerância oral a glicose (GTT) nos animais magros e obesos.	27
3.8. Eutanásia e determinação da composição corporal animais magros e obesos.....	28
3.9. Análises séricas realizadas nos animais magros e obesos	29
3.10. Avaliações hepáticas dos animais magros e obesos	29
3.11. Análise quantitativa de DNA bacteriano em fezes por q-PCR dos animais magros e obesos.....	29
3.12. Expressão gênica em amostras de tecidos através de qRT-PCR nos animais magros e obesos.....	30
3.13. Avaliação da atividade inflamatória do tecido intestinal nos animais magros e obesos	30
3.14. Análise estatística dos resultados	32
4. RESULTADOS	32
4.1. Teste de tolerância oral à refeição e parâmetros avaliados TG e Glicose.....	32
4.2. Níveis séricos de colesterol	33

4.3. Níveis séricos de IL-6, CRP e LPS	34
4.4. Níveis séricos de hormônios intestinais e pancreáticos.....	35
4.5. Avaliação do tempo de esvaziamento gástrico	36
4.6. Perfil qualitativo de ácidos graxos livres no soro	37
4.7. Efeito emagrecedor do LE versus o fármaco Orlistat em animais obesos	38
4.8. Composição corporal final.....	39
4.9. Homeostasia glicêmica	40
4.10. Níveis de TG e colesterol sérico	41
4.11. Níveis séricos de vitamina D ₃	42
4.12. Avaliação do nível sérico de endotoxina	43
4.13. Avaliações hepáticas	44
4.14. Análise quantitativa de DNA bacteriano em fezes.....	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ANEXO	66
8.1 ANEXO: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA.....	66
8.2 ANEXO: ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AOS RESULTADOS DA TESE	68

1. INTRODUÇÃO

A obesidade ainda apresenta maior prevalência nos países desenvolvidos. Porém nos últimos anos, aumentou de forma significativa nos países em desenvolvimento (SINGH; KUMAR; MAHALINGAM, 2017). Se este aumento continuar na mesma proporção, até 2030, podemos chegar a um total de 2,16 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 1,12 bilhões de indivíduos obesos no mundo, o que representa 38% da população com sobrepeso e 20% com obesidade. (SINGH; KUMAR; MAHALINGAM, 2017). A obesidade é definida como a expansão maciça do tecido adiposo branco (TAB) devido ao desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto de energia. Na obesidade, a expansão do TAB se manifesta por dramáticos aumentos no número de adipócitos hipertróficos que estão significativamente relacionados a mudanças prejudiciais no TAB, incluindo hipóxia, estresse oxidativo, inflamação e resistência à insulina (PARK et al., 2018).

Os principais fatores que levam a obesidade são o consumo de alimentos com alto teor calórico ou alto teor de gordura, atividade física insuficiente e mudança para um estilo de vida sedentário bem comum na atualidade (LEITNER et al., 2017). Dado que o TAB é o principal órgão para armazenamento e mobilização de energia, a maioria dos estudos prévios relacionados à obesidade teve como foco a compreensão de anormalidades na fisiologia e metabolismo dos adipócitos, bem como nas alterações da composição da chamada fração estromal vascular (FEV), em um esforço para entender a ligação entre obesidade e doenças metabólicas. No entanto, com descoberta das adipocinas, uma série de mediadores secretados pelo tecido adiposo, revisou o conceito do TAB sendo apenas um depósito de gordura. Em vez disso, ficou claro que o TAB é um sistema endócrino dinâmico crucial na regulação da homeostase energética sistêmica. Ainda neste trabalho foi verificado que as adipocinas incluem proteínas angiogênicas, reguladoras metabólicas e mediadores inflamatórios e que a maioria das adipocinas, incluindo a leptina e a adiponectina, atua como ponte entre o estado funcional do TAB e de outros órgãos, modulando o metabolismo energético sistêmico (PARK et al., 2018). Sabe-se que a inflamação crônica desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão da resistência à insulina. Em particular, o TAB desempenha um papel ativo nesse processo, secretando substâncias inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), um mediador na resistência à insulina (NA; LEE, 2019), a interleucina-6 (IL-6) considerada um marcador de inflamação aguda (XU, Y.; ZHANG; YE, 2018) e, a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) que controla a função dos monócitos por meio ativação do receptor de quimiocina-2 (CCR2) sendo apontada como responsável pelo recrutamento destas

células para o TAB (HUMA et al., 2017; VOLP et al., 2008). Por outro lado o TAB simultaneamente libera citocinas antiinflamatórias, que incluem a IL-4, IL-10 e IL-2, para contrabalançar os efeitos desfavoráveis da inflamação (PARK et al., 2018).

A obesidade está associada com o desenvolvimento de pelo menos 18 comorbidades, incluindo o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares como a hipertensão, dislipidemias, certos tipos de câncer, entre outros (GUTT et al., 2019; ROSA-GONCALVES; MAJEROWICZ, 2019). A DM2 é caracterizada pela hiperglicemia e resistência periférica à insulina ou redução dos níveis de insulina (AKASH; REHMAN; LIAQAT, 2018). A resistência à insulina resulta num fluxo anormal de ácidos graxos livres que culmina na dislipidemia diabética onde se observam elevadas concentrações séricas de triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade (LDL- colesterol), reduzidas concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL - colesterol) e esteatose hepática (FILIPPATOS et al., 2017).

Os lipídios são um dos mais importantes macro-nutrientes, incluindo uma ampla variedade de vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos essenciais e componentes bioativos necessários para o corpo humano. Eles estão envolvidos em diversos aspectos das funções celulares, como armazenamento de energia, estrutura e dinâmica de membrana e transdução de sinal (YE et al., 2019). Lipídios dietéticos derivados de diferentes fontes têm diferentes composições de ácidos graxos e triacilgliceróis (TAGs), variando no comprimento da cadeia acil, insaturação e localização dos ácidos graxos dentro das moléculas de TAG, o que pode levar a diferenças apreciáveis em suas propriedades físicas, químicas e nutricionais (YE et al., 2019). Por exemplo, o consumo de ácidos graxos saturados (AGS) estimula uma resposta inflamatória metabólica, mediada pelo receptor *toll-like 4* (TLR-4), expresso em células imunes como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Também neste estudo pós-prandiais mostraram que uma única refeição induz alterações nos biomarcadores inflamatórios circulantes mesmo em indivíduos saudáveis de forma proporcional a quantidade e qualidade de lipídeos presentes, dando origem ao termo inflamação pós-prandial (QUINTANILHA et al., 2019). A hiperlipidemia pós-prandial é uma condição na qual os remanescentes de quilomícrons ricos em triacilgliceróis aumentam durante o período pós-prandial e a hipertrigliceridemia é prolongada (NAKAMURA et al., 2016).

Dados de um estudo em humanos revelaram que dois testes de refeições, uma enriquecida com ácidos graxos saturados (AGS), sendo leite com 3% teor gordura (220 mL), café (80 mL), açúcar (15 g), pão francês (75 g), manteiga com sal (38 g) e queijo mussarela (52 g) e outra enriquecido com ácidos graxos insaturados (AGIS) e fibra, sendo leite com 1% de

gordura (220 mL), café (80 mL), açúcar (15 g), pão francês integral (75 g), ricota (60 g) com azeite extravirgem (32 mL) e amendoins (20 g), mostraram que a refeição enriquecida com AGS induziu um aumento de aproximadamente 10 vezes na expressão de IL-1 β pós-prandial em relação ao jejum, enquanto a refeição com AGIS e fibras teve uma indução muito menos pronunciada. A expressão gênica de IL-6 e MCP-1, bem como os níveis proteicos na circulação aumentou com a refeição enriquecida com AGS, mas não após a refeição com AGIS. Portanto esses resultados indicaram que uma única refeição enriquecida com AGS é capaz de induzir de forma aguda a expressão de IL-1 β e, se consumida regularmente poderia desencadear inflamação sistêmica, enquanto o aumento do consumo de AGIS poderia atenuar o estado inflamatório pós-prandial (MONFORT-PIRES et al., 2018). Em outro trabalho, onde foi aplicado um teste de tolerância oral a lipídios em homens e mulheres, alterações nas concentrações dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-6 e proteína-C reativa (CRP) foram avaliadas após o consumo de uma refeição rica em gordura. No entanto ainda neste estudo a refeição consistia em ovos, torradas, manteiga, pasta de amendoim, pêssegos, chantilly e leite, o que resultava no conteúdo de energia de 64% de gordura, 18% de carboidratos e 18% de proteína. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa nas concentrações circulantes de IL-6, TNF α e CRP no estado de jejum entre ambos os sexos. Após a refeição, não houve aumento pós-prandiais de CRP em ambos os sexos, mas IL-6 e TNF α estavam aumentados após a ingestão da refeição (PAYETTE et al., 2009), corroborando o fato de que dietas hiperlipídicas com predominância de AGS desencadeiam um quadro de inflamação pós-prandial. A CRP é uma proteína de fase aguda que é produzida principalmente no fígado após estimulação por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- α (ROTA et al., 2019; VOLP et al., 2008).

Também presente nas respostas pós-prandiais está o aumento sérico dos níveis de endotoxinas (LOPEZ-MORENO et al., 2018), que são complexos de LPS, variando em tamanho de 10 a 1.000 kDa (massas maiores formam-se devido à agregação hidrofóbica), presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas. As endotoxinas desencadeiam uma resposta inflamatória em monócitos e macrófagos através da ativação do complexo receptor *Toll like 4/CD14* (SHENDI; DAVIES; DAVENPORT, 2018). O aumento dos níveis circulantes de endotoxinas tem sido considerado um importante fator predisponente para doenças associadas à obesidade, como aterosclerose e o DM2 (LYTE; GABLER; HOLLIS, 2016).

Estudo em humanos mostrou que uma refeição rica em frutas e fibras (carboidratos 58%, proteína 15% e gordura 27%) induz a redução dos níveis circulantes de LPS pós-prandial

em comparação com uma refeição rica em gordura (33% saturada) e carboidratos (50,5%, 20% de proteína e 29,5% de gordura), ainda neste trabalho uma outra refeição teste rica em ácido graxo ω -3 reduziu a endotoxina sérica pós-prandial em comparação com a refeição rica em ácido graxo saturado (LOPEZ-MORENO et al., 2017). Esta variação nos níveis de LPS séricos tem sido definida como endotoxemia metabólica (QUINTANILHA et al., 2019).

Outro ponto que tem merecido atenção em relação a endotoxemia metabólica é o papel da microbiota intestinal. O trato gastrointestinal humano contém uma comunidade complexa de trilhões de microorganismos, formados por quatro filos principais, Bacteroidetes e Firmicutes (que compõem cerca de 90-99%), Actinobacteria e Proteobacteria (WISNIEWSKI; DOWDEN; CAMPBELL, 2019). Estes microorganismos desempenham funções fisiológicas importantes, tais como metabolismo de nutrientes e regulação energética, regulação da imunidade e manutenção da defesa da mucosa. (LAU; WONG, 2018). Alterações no microbioma intestinal têm sido associadas a diferentes doenças metabólicas, incluindo obesidade, DM2 e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (LAU; WONG, 2018). Foi demonstrado que camundongos geneticamente obesos exibem uma proporção aumentada de Firmicutes e uma proporção menor de Bacteroidetes em sua microbiota em comparação com homólogos do tipo selvagem, além disso foi mostrado que uns dos mecanismos pelos quais a microbiota intestinal pode afetar o metabolismo do hospedeiro é a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato, a partir de polissacarídeos dietéticos inacessíveis aos seres humanos. (GERARD, 2017) Esse mesmo estudo apresenta que os seres humanos obtêm aproximadamente 10% de seu suprimento diário de energia a partir desses AGCC produzidos pelas bactérias intestinais, e observou-se que os perfis de AGCC estão diminuído em indivíduos obesos (GERARD, 2017).

Embora a DM2 e a obesidade, coexistam na maioria das vezes, as duas doenças são tratadas na clínica separadamente. As opções terapêuticas são limitadas para o tratamento da obesidade e na maioria das vezes, a mudança de estilo de vida resulta em perdas que atingem 5% do peso corporal e quando combinadas às poucas opções farmacológicas pode se atingir a perda de 10% (HUTCH; SANDOVAL, 2017). De forma contrária, as opções terapêuticas para o tratamento do DM2 estão sempre expandindo já que a doença é progressiva (assim como a obesidade) e exige um contínuo ajuste de medicamentos que visam a manutenção do controle glicêmico adequado, embora possam resultar no ganho de peso, como por exemplo a insulina (HUTCH; SANDOVAL, 2017; ROSA-GONCALVES; MAJEROWICZ, 2019). A cirurgia bariátrica, apesar do alto risco e custo, tem sido apontada como a alternativa capaz de resolver ambas as

doenças, resultando numa perda de peso de 30% que se sustenta por um período de 10 anos em média e em taxas de remissão de DM2 entre 38 e 77% (CUMMINGS; COHEN, 2017; LAURSEN et al., 2019; SCHAUER et al., 2014). A farmacoterapia tem contribuído pouco para conter a expansão da obesidade provavelmente devido aos efeitos colaterais dos medicamentos e a falta de aceitação de que a obesidade é uma doença crônica (GOTTHARDT; BELLO, 2016).

Dentre as opções terapêuticas, desde 1999, o fármaco orlistat tem sido indicado para a perda de peso. Orlistat (tetrahydrolipstatin) é um derivado sintético da lipstatina, atuando como um potente e seletivo inibidor de lipases pancreáticas (HAUPTMAN; JEUNET; HARTMANN, 1992). A lipase pancreática é a enzima primária conversora de triglicerídeos provenientes da dieta em monoglicerídeos e ácidos graxos livres. O uso do Orlistat diminui em aproximadamente 30% a absorção de triglicerídeos que são excretados nas fezes, resultando em uma importante redução calórica (ROSA-GONCALVES; MAJEROWICZ, 2019). A presença desta gordura não digerida nas fezes gera flatulência, urgência fecal e aumento da frequência de defecações levando os pacientes que não evitam e nem reduzem o conteúdo de lipídeos da dieta a descontinuar o tratamento (90% dos pacientes descontinuam esta terapia medicamentosa após 1 ano) (FINER et al., 2000; PADWAL et al., 2007). Orlistat também pode reduzir o nível de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), requerendo uma suplementação multivitamínica e, reduzir a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados como os derivados de ω -3 (PUFAS, ω -3), o que também não se mostra benéfico (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2015; CRUZ-HERNANDEZ et al., 2010; MAURYA; AGGARWAL, 2017).

Uma alternativa ao uso do fármaco Orlistat seria o uso de lipídeos estruturados com baixo valor calórico. Os lipídios estruturados (LEs) são definidos como triacilgliceróis (TAGs) reestruturados ou modificados, obtidos por interesterificação química ou enzimática a partir de triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, de origem vegetal ou animal (KOK; CHUAH; CHENG, 2018; ZHOU et al., 2017). São sintetizados com o objetivo de obter lipídios nutracêuticos ou funcionais, que podem proporcionar benefícios específicos à saúde, melhorar ou modificar as características físicas, químicas e reológicas de óleos e gorduras, além de reduzir ou aumentar as propriedades nutricionais dos alimentos (MOREIRA et al., 2017). O óleo da semente de *Crambe abyssinica* (Hochs) que tem alto teor de ácido erúico (50-60%), um ácido graxo de cadeia longa que contém 22 átomos de carbono e apenas uma dupla ligação e quando submetido a um processo de hidrogenação, o ácido erúico (C22:1) é convertido em ácido behênico (C22:0), um ácido graxo saturado de cadeia muito

longa (RIBEIRO et al., 2017). O óleo de Crambe totalmente hidrogenado é um sólido branco que tem valor potencial como componente de ceras (RIBEIRO et al., 2017). A *Crambe abyssinica* pertencente à família das crucíferas e é nativa da região do Mediterrâneo, mas esta espécie mostrou boa adaptação a outras condições climáticas e tem sido cultivada no Brasil devido ao interesse industrial em extrair o óleo da semente (26-38%), e devido ao seu alto teor de proteína e grande potencial para o cultivo no período de entressafra, na região Centro-Oeste do Brasil, com características favoráveis à rotação de culturas com plantio direto após a colheita da soja (RIBEIRO et al., 2017; SZMATOLA et al., 2018). O LE foi obtido por interesterificação enzimática utilizando uma lipase imobilizada (Lipozyme TL, Novozymes S.A) a partir de uma mistura de óleo de soja (45%), óleo de oliva (45%) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (10%). Ainda segundo esses autores a escolha dos óleos de soja e oliva teve a finalidade de obter características organolépticas e também funcionais do LE pela incorporação de ácidos graxos poli-insaturada (PUFAS) (MOREIRA et al., 2017). O azeite de oliva é o óleo comestível obtido diretamente do fruto da *Olea europaea* L., constituído principalmente por TAGs (98,5% a 99,5%), ácidos graxos livres e glicerol, além de pequenas quantidades de compostos de grande importância e que apresentam propriedades antioxidantes como os compostos fenólicos e os fitoesteróis. Os principais ácidos graxos encontrados no azeite são o ácido oléico (C18:1; 55 a 83%), um ácido graxo monoinsaturado que é considerado fundamental pelas propriedades benéficas na redução da oxidação do LDL-colesterol e, o ácido linoléico (C18:2; 3,5 a 21%) um ácido graxo poli-insaturado precursor do ácido araquidônico (MARTIN-PELAEZ et al., 2017). O óleo de soja é extraído da semente da *Glycine max*, que é uma matéria-prima de grande qualidade, disponibilidade, baixo custo e nutricionalmente interessante pela presença de ácidos graxos essenciais como o linoléico (C18:2; 55%) e linolênico (C18:3, 5%), ácido graxo poli-insaturado ω -3, sendo esse último o precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) que apresentam ação anti-inflamatória (DECKELBAUM; TORREJON, 2012; LESCANO DE SOUZA JUNIOR et al., 2017).

No estudo realizado por Moreira, (2017) os camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica (DH) contendo o LE durante 8 semanas não ganharam peso quando comparado ao ao controle alimentado com dieta normocalórica. Porém os animais que ingeriram DH contendo banha de porco se tornaram obesos quando comparados ao controle. Também foram analisados o gasto energético, e este foi semelhante em todas as dietas, implicando que o LE não aumentou nem alterou o metabolismo energético dos animais. Foi também observado um aumento na quantidade de lipídios excretados nas fezes, o que justificaria que, apesar de serem alimentados com uma DH, a composição corporal dos animais não diferiu dos

controles. Durante o experimento, os animais não apresentaram diarreia, o que sugere que os lipídios pudessem estar sendo parcialmente absorvidos. Análises hepáticas mostraram ausência de esteatose macro e microvesicular nos animais que consumiram a DH contendo o LE e aumento dos níveis de ácidos graxos como o ácido araquidônico (AA) e docosahexaenoico (DHA) (MOREIRA, et al., 2017). O mecanismo de ação sugerido para os efeitos observados com o consumo do LE que é rico em ácido behênico foi a inibição da lipase pancreática, mesmo mecanismo do fármaco Orlistat (KOJIMA et al., 2010). O ácido behênico inibe o desempenho da lipase pancreática e, conseqüentemente, impede a hidrólise dos triacilgliceróis e sua absorção, promovendo a redução de calorias (MOREIRA; et al., 2017). Essa inibição pode ser explicada pela não formação do complexo enzima-substrato, ou pela baixa difusão do ácido behênico na fase oleosa, que bloquearia a interface da lipase, resultando assim na prevenção da hidrólise e excreção de ácidos graxos pelas fezes, proporcionando um efeito anti-obesidade (MOREIRA, et al., 2017).

O estudo inicial de Moreira et al.(2017) mostrou que o LE contendo ácido behênico pode ser usado para prevenir o estabelecimento da obesidade, sem causar efeitos colaterais. Assim, este trabalho irá avaliar se o LE contendo ácido behênico é também eficiente na inflamação pós-prandial, verificando se este altera os parâmetros inflamatórios resultantes de uma refeição rica em lipídeos. Considerando um provável mecanismo de ação comum do LE ao fármaco Orlistat (inibidor de lipase), pretende-se também avaliar o potencial na estratégia de emagrecimento empregando camundongos que se tornaram obesos por hipercalórica/hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Avaliar os efeitos da ingestão do LE obtido a partir da interesterificação enzimática dos óleos de oliva/soja/crambe totalmente hidrogenado na inflamação pós-prandial em camundongos.
- Avaliar o potencial efeito emagrecedor do LE obtido a partir da interesterificação enzimática dos óleos de oliva/soja/crambe totalmente hidrogenado em camundongos obesos.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar em situação pós-prandial as curvas glicêmicas e de triglicérides, a produção IL-6 e CRP, hormônios pancreáticos e intestinais e, a endotoxemia em camundongos que receberam uma refeição rica em lipídios contendo LE ou blendas de óleos.
- Avaliar o tempo esvaziamento gástrico em camundongos após uma refeição rica em lipídios contendo LE ou blendas de óleos.
- Analisar o potencial de emagrecimento do consumo de LE por camundongos obesos, avaliando a composição corporal.
- Avaliar parâmetros metabólicos como resistência à insulina, lipidemia e endotoxemia em camundongos obesos após consumo de LE.
- Avaliar as respostas inflamatórias associadas à obesidade em camundongos obesos após consumo de LE.
- Avaliar alterações na microbiota intestinal em camundongos obesos após consumo de LE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese do LE

O LE foi produzido por meio da interesterificação enzimática utilizando o óleo de oliva (variedade Arbequina e tipo extra virgem, Olivas do Sul, Brasil), óleo de soja e óleo de crambe totalmente hidrogenado (Chemyunion, Brasil) na proporção de 43:43:14 (g/g), respectivamente. A reação de interesterificação ocorreu em um reator químico de vidro encamisado (Marconi®) acoplado a um banho ultra-termostatizado (Marconi®) sob vácuo a 350 rpm por 4 h a 60 °C, via adição de 10% de lipase imobilizada (Lipozyme TL IM, Novozymes®). A unidade da atividade da lipase (U) foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo em 1 min, por miligrama de enzima a 37°C. Os principais ácidos graxos na mistura foram ácido oleico (36%), ácido linoléico (27%), ácido palmítico (14%), ácido esteárico (10%), ácido behênico (6,5%), ácido linolênico (2,5%) e outros (4%) (MOREIRA; et al., 2017). Como a reação de interesterificação não altera a composição de ácidos graxos, os LEs mantiveram a mesma composição da mistura. A síntese foi realizada pela Dra. Débora Kono e pela prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo no Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com 5 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram acondicionados em isoladores individuais e mantidos no Biotério da Central da USF, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Os animais se serviram ad libitum de água e ração. Os protocolos foram aprovados previamente pelo CEUA/USF (Protocolo CEA/USF 01.03.2017, Anexo I).

3.3. Teste de tolerância oral à refeição e parâmetros séricos avaliados

Camundongos (n=6 por grupo) foram submetidos a jejum durante 12 horas e após este período receberam por gavagem refeições líquidas como descritas a seguir (Figura 1) e baseadas no descrito por Take e colaboradores (2016). Foi administrado 0,1 mL da refeição líquida para cada 10g de peso corporal, sendo: refeição Ensure® (Tabela 1) preparada seguindo as instruções do fabricante (Abbott do Brasil), Ensure® com 15% de mistura de

(1:1g/v) de óleo de soja e óleo de oliva (O/S), Ensure® com 15% de LE e, Ensure® com 15% de mistura (43:43:14 g/v) de óleo de oliva, óleo de soja e óleo de crumbe totalmente hidrogenado (OSC) conforme o desenho abaixo. Após gavagem, as concentrações de TG séricas foram avaliadas nos tempos (0, 30, 1, 2 e 4 horas), usando o aparelho portátil (Accutrend Plus, Roche).

Após uma semana de intervalo, o mesmo procedimento foi repetido e a glicemia foi determinada utilizando equipamento portátil (Accucheck, Roche). Novamente, após uma semana de intervalo, o procedimento foi repetido e após duas horas os animais foram eutanasiados (anestesiados com mistura 1:1 v/v de cetamina 100 mg/ml e xilasina a 2% no volume de 100µl para cada 30 g de peso corporal). O sangue foi coletado por punção cardíaca e por punção na veia porta para análises posteriores. Os níveis séricos de colesterol foram mensurados com equipamento portátil (Accutrend plus, Roche). O soro obtido do sangue coletado da veia porta dos camundongos foi empregado na avaliação dos níveis de endotoxinas utilizando o ensaio *Limulus ameobocyte lysate* (LAL; kit Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation. Thermo Scientific, USA) seguindo as instruções dos fabricantes. Foram mensurados os níveis séricos da CRP e IL-6 utilizando kits de elisa (RayBio® Mouse CRP ELISA Kit e ELISA R&D M6000B MOUSE L-6) seguindo as instruções dos fabricantes. Os níveis dos hormônios (grelina (ativo), peptídeo inibidor gástrico (GIP), peptídeo semelhante a glucagon 1 ativo (GLP-1), insulina, amilina, leptina, peptídeo YY (PYY), polipeptídeo pancreático (PP) foram mensurados no soro coletado com inibidor de protease utilizando o Kit multiplex Mouse Gut Hormone Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, MA, USA) seguindo as instruções dos fabricantes.

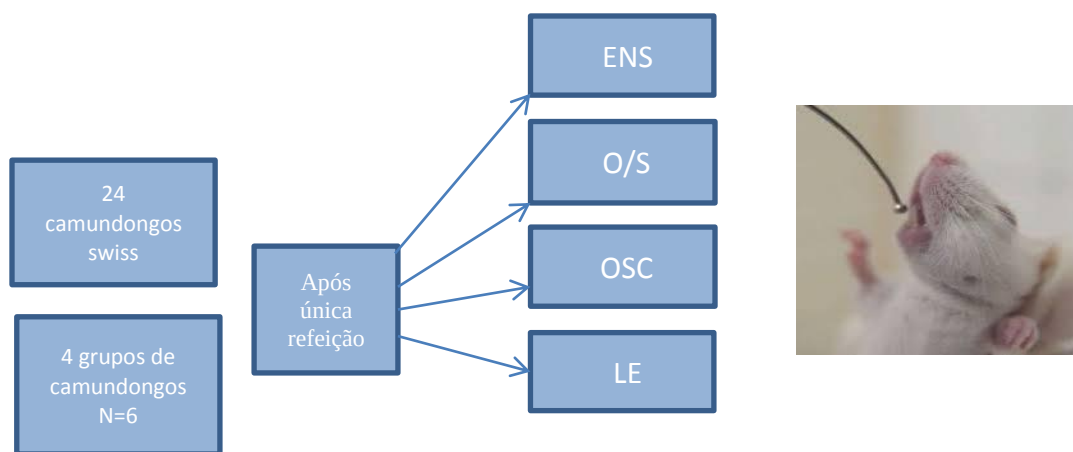


Figura 1. Esquema da administração das refeições nos camundongos.

Tabela 1. Composição da refeição líquida Ensure® (Abbott, Brasil).

Ensure em pó Quantidade /100 ml	
Valor energético	100 Kcal
Carboidratos	13g
Proteínas	3,7g
Lipídeos (saturados, mono e poli-insaturados)	3,3g
Fibra alimentar	1,0 g
Sódio	84mg
Cálcio	105mg
Ferro	0,56mg
Potássio	157mg
Cloreto	129mg
Fosforo	63mg
Magnésio	19mg
Zinco	1,1mg
Cobre	67mcg
Manganês	0,33mg
Molibdênio	9,8mcg
Selênio	5,1mcg
Cromo	5,4mcg
Iodo	15mcg
Vitamina A	105mcg
Vitamina D	1,1mcg
Vitamina E	1,9mg
Vitamina k	4,9mcg
Vitamina B1	0,19mg
Vitamina B2	0,19mg
Niacina	1,3mg
Ácido pantotênico	0,98mg
Vitamina B6	0,23mg
Ácido Fólico	30mcg
Vitamina B12	0,35mcg
Biotina	4,2mcg
Vitamina C	13mg
colina	32mg

3.4. Avaliação do tempo de esvaziamento gástrico

Quatro grupos adicionais de camundongos Swiss (n=6 por grupo) foram mantidos em jejum por seis horas. Em seguida foi administrado por gavagem as refeições como descritas no item 3.3 acrescidas de vermelho de fenol (100 ug/mL). Após 15 minutos, os camundongos foram anestesiados conforme descrito anteriormente e eutanasiados. Foram removidos os estômagos e amarrados com barbante os esfíncteres. Os intestinos removidos foram divididos em três porções (duodeno, jejuno e íleo). Cada porção foi submetida a homogeneização em NaOH 0,01N e adicionado ácido tricloroacético 20%. O homogenato foi centrifugado 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços onde foi adicionado NaOH 0,5N e em seguida foi lido absorbância de 560nm no leitor de microplacas.

3.5. Caracterização do perfil lipídico plasmático

Após jejum 12 horas, os camundongos (n=6 por grupo) receberam por via oral, mistura de óleo de soja e óleo de oliva (1:1 v/v) ou LE em volume de 10 mL/kg. Após 2 horas, foram eutanasiados como descrito anteriormente, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro foi obtido para avaliação do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa, conforme descrito por Moreira; e colaboradores (2017). A distribuição de ácidos graxos foi determinada pela comparação dos tempos de retenção de pico entre as amostras e os respectivos padrões.

3.6. Indução de obesidade por DH e tratamento dos camundongos com LE

Foram empregados 24 camundongos Swiss que após completarem 6 semanas de idade foram divididos inicialmente em dois grupos, onde um grupo recebeu ração comercial (CN) e o outro grupo recebeu dieta hiperlipídica preparada em nosso laboratório conforme a Tabela 2, por 8 semanas. Após 8 semanas, o grupo DH foi dividido em 4 grupos e mantidos adicionalmente por mais 6 semanas, e alimentados com diferentes dietas: hiperlipídica (DH), um alimentado com uma dieta hiperlipídica com a substituição de 50% da banha de porco pelo lipídeo estruturado (DH50), dieta hiperlipídica com a substituição de 100% da banha de porco pelo lipídeo estruturado (DH100) e, dieta hiperlipídica e tratado diariamente com 40mg/kg/dia de Orlistat por via oral (DHORLIST) (YIMAM et al., 2016), conforme o desenho abaixo (Figura 2). O controle de peso foi feito semanalmente durante todo o protocolo.

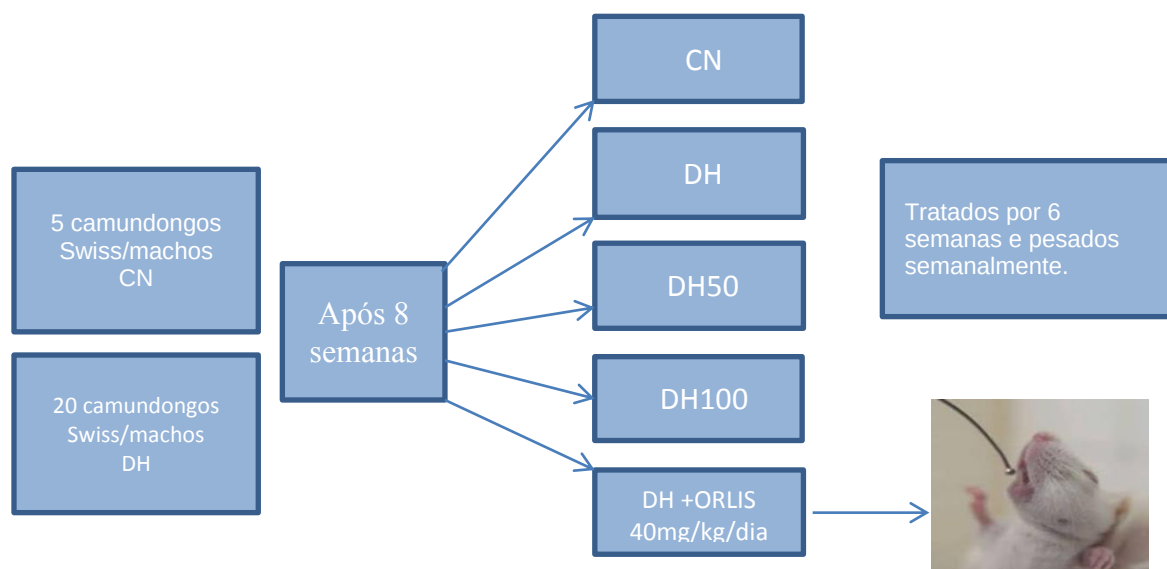


Figura 2. Esquema da administração das dietas nos camundongos.

3.7. Glicemia basal, Teste de tolerância à Insulina (ITT) e Teste de tolerância oral a glicose (GTT) nos animais magros e obesos.

Os animais magros e obesos em intervenção dietética ou farmacológica foram mantidos em jejum por 6 horas. Após, foi feita uma incisão na cauda de cada animal para a coleta de uma pequena gota de sangue e a determinação da glicemia basal utilizando glicosímetro. Para o ITT os animais receberam via intraperitoneal (I.P) 1,5 U/kg de insulina e os níveis glicêmicos foram avaliados após 5, 10, 15 e 30 minutos utilizando glicosímetro. Os valores glicêmicos foram plotados e calculou-se a área sobre a curva (AUC) de cada curva glicêmica obtida utilizando-se o programa GraphPad InStat (kITT). O ITT foi realizado na 12ª semana do protocolo experimental. No GTT, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e amostras de sangue foram coletadas da cauda no (tempo 0) e em seguida foi aplicado glicose 20% (20g/kg de peso corpóreo) via I.P. e a glicose sérica quantificada após 30, 60, 90 e 120 minutos. Os níveis de glicose foram determinados utilizando-se glicosímetro e os valores obtidos foram representados graficamente por uma curva e a AUC foi calculada segundo Pinto e colaboradores (2010).

Tabela 2. Composição de macronutrientes da dieta

Composição	DH	DH50	DH100
	g	g	g
Amido de milho	169,8	169,8	169,8
Caseína	200	200	200
Sacarose	100	100	100
Maltodextrina	132	132	132
Banha de porco	257,7	128,8	-
Óleo de soja	40	20	-
Lipídeo estruturado	-	128,8	297,6
Celulose	50	50	50
Mix de minerais	35	35	35
Mix de vitaminas	10	10	10
L-Cistina	3	3	3
Colina	2,5	2,5	2,5
Total	1000g	1000g	1000g

3.8. Eutanásia e determinação da composição corporal animais magros e obesos

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e foram anestesiados conforme descrito anteriormente e eutanasiados. A coleta de sangue nos camundongos foi realizada por punção cardíaca. O sangue foi coletado utilizando seringa sem anticoagulante. Os estoques de tecido adiposo epididimal (TAE), inguinal (TAS), Inter escapular (TAMA), fígado, musculo e gastrocnêmico, foram coletados e pesados. Os valores foram expressos como porcentagem do peso corporal. Os tecidos foram armazenados adequadamente para análises posteriores.

3.9. Análises séricas realizadas nos animais magros e obesos

Foram mensurados os níveis de colesterol e triglicérides usando equipamento portátil (Accutrend® Plus Roche). Os níveis séricos de 25- hidroxí-vitamina D₃ foram quantificados utilizando kit de Elisa (Cayman Chemical, Michigan, USA) foi realizado segundo as instruções do fabricante. Avaliação dos níveis de endotoxinas utilizando o ensaio *Limulus amebocyte lysate* (LAL; kit Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation. Thermo Scientific, USA) foi realizado segundo as instruções do fabricante.

3.10. Avaliações hepáticas dos animais magros e obesos

Fragmentos de fígado foram armazenados em formalina tamponada a 10%, posteriormente processados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 4 µm foram corados com hematoxilina e eosina. Imagens foram capturadas utilizando microscópio óptico acoplado a um sistema de captação de imagens e foram avaliadas através da quantificação em 144 pontos sobrepostos na imagem. A avaliação foi feita de acordo com Turlin e colaboradores (2001), usando uma escala de 5 graus: Grau 0 (G0), sem ou esteatose mínima, G0 5%; Grau 1 (G1), 5% ≤ G1 25%; Grau 2 (G2), 25% ≤ G2 50%; Grau 3 (G3), 50% ≤ G3 75%; e Grau 4 (G4), 75% ≤ G4 ≤ 100%. A fração lipídica do fígado foi extraída pelo método de Folch (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957) e quantificada por gravimetria. Os níveis teciduais de colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram determinados por kits colorimétricos comerciais (Laborlab, SP, Brasil) e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.11. Análise quantitativa de DNA bacteriano em fezes por q-PCR dos animais magros e obesos

O DNA foi extraído a partir de amostras fecais de cerca de 200 mg usando o kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C. Os ensaios foram realizados no Sistema 7300 Real-Time (Applied Biosystems) usando o SYBR Green-Power PCR (Thermo Fisher Scientific). Os valores de Cts obtidos com o emprego dos primers denominados firmicutes e bacteroidetes (Tabela 2) foram comparados a uma curva padrão de CTs obtidas com concentrações conhecidas de DNA extraído das cepas: *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), respectivamente (GUO et al., 2008; NADKARNI et al., 2002).

3.12. Expressão gênica em amostras de tecidos através de qRT-PCR nos animais magros e obesos

Amostras dos fígados e intestino foram armazenadas a seco no freezer -80°C até o momento da extração do RNA. A extração de RNA foi feita utilizando Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após a extração, RNA foi usado para a síntese do cDNA usando o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise de expressão dos genes e do gene constitutivo 18S foram realizados por meio de PCR em tempo real, utilizando-se o SYBR® Green-Power PCR (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram amplificadas no equipamento 7300 Real-Time (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em duplicata. Os valores foram calculados empregando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os primers utilizados estão apresentados na Tabela 3.

3.13. Avaliação da atividade inflamatória do tecido intestinal nos animais magros e obesos

Análise da atividade mieloperoxidase foi realizada em amostras de cólon. As amostras de cólon foram homogeneizadas em 0,5% (peso:volume) de brometo de hexadeciltrimetilamônio em tampão fosfato de potássio 50 mmol (pH 6,0). Para o ensaio de mieloperoxidase, 50 µL de cada homogenato foi adicionado a 200 µL de solução de o-dianisidina (0,167 mg / mL de dicloridrato de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 50 mmol / L (pH 6,0). A reação foi lida imediatamente em 460 nm por um período de 3 min utilizando um leitor de microplacas (Multiscan MS, Labsystems) (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados

Gene	Primer	Sequência 5'→ 3'
IL-1 β	SENSE	GGGTCAAACAGCAACTCCATCTTA
	ANTISENSE	AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG
IL-6	SENSE	TCTCTGGGAAATCGTGGA
	ANTISENSE	TTCTGCAAGTGCATCATCG
CD36	SENSE	GAACCACTGCTTTCAAAACTGG
	ANTISENSE	GTCCTG AGTTAT ATTTTCCTTGG
FATP2	SENSE	CGG CCC AGG ATG TCA TCT AT
	ANTISENSE	AAA GCT AAA GTA GCC CCA ACC A
FATP5	SENSE	TGGGCAGAAGCATACCAGCAT
	ANTISENSE	GCCGTGACTTTACCAGCT TGT
TNF- α	SENSE	TAG CCA GGA GGG AGA ACA GA
	ANTISENSE	TTT TCT GGA GGG AGA TGT GG
TLR4	SENSE	GCT TTC ACC TCT GCC TTC AC
	ANTISENSE	GCG ATA CAA TTC CAC CTG CT
18 S	SENSE	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG
	ANTISENSE	CAA TTA CAG GGC CTC GAA AG
Firmicutes- 16S	SENSE	GGAGYATGTGGTTTAATTCTGAAGCA
	ANTISENSE	AGCTGACGACAACCATGCAC
Bacteroidetes- 16S	SENSE	GGARCATGTGGTTTAATTCTGATGAT
	ANTISENSE	AGCTGACGACAACCATGCAG

3.14. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos na forma de média e seu respectivo erro padrão da média (EPM). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas usando Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett para comparações múltiplas e Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de tolerância oral à refeição e parâmetros avaliados TG e Glicose

As concentrações máximas de triglicérides pós-prandiais após as refeições foram atingidas no tempo de 2 horas (Figura 3A.). Por outro lado, observamos que AUC foram significativamente menores para as refeições contendo LE e OSC quando comparada à que continha O/S (Figura 3C.). Assim como a AUC foi significativa maior quando as refeições hiperlipídicas foram comparadas ao grupo ENS (normolipídica). Já as concentrações máximas de glicose pós-prandiais foram atingidas no tempo de 0,5 (Figura 3B). Não houve diferenças significativas nos valores da AUC de glicose entre as refeições (Figura 3D).

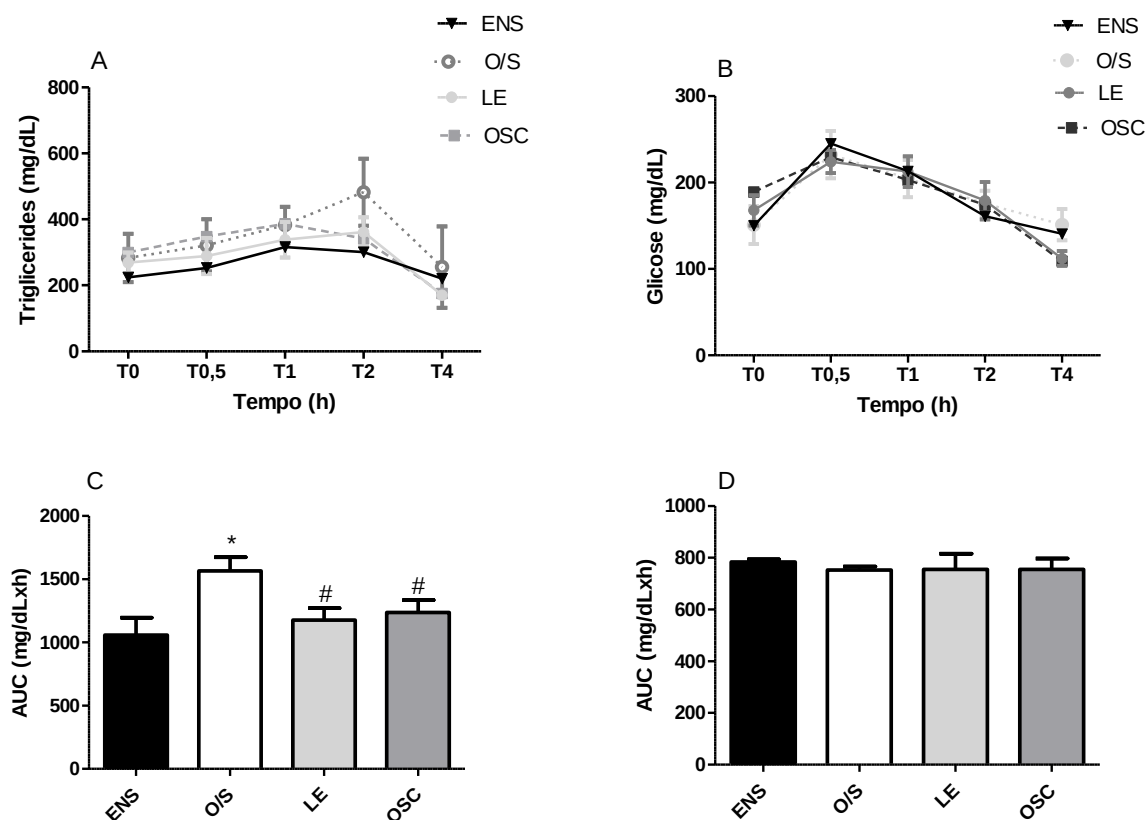


Figura 3. Níveis de triglicérides e de glicose pós-prandiais após administração oral de uma refeição contendo Ensure® (ENS), refeição contendo Ensure® e 15% de mistura de óleo de soja e óleo de oliva (O/S), refeição contendo Ensure® e 15% de lipídio estruturado (LE), refeição contendo Ensure® e 15% de uma mistura de óleo de oliva/óleo de soja/óleo de cramebe totalmente hidrogenado (OSC). Curvas de triglicérides séricas (A) e AUC obtida (C). Curvas de glicose séricas (B) e AUC obtida (D). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ENS. # $p < 0,05$ quando em comparação com o grupo O/S ($n = 6/\text{grupo}$).

4.2. Níveis séricos de colesterol

Os níveis séricos de colesterol avaliados após 2 horas da administração das refeições não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais (Figura 4).

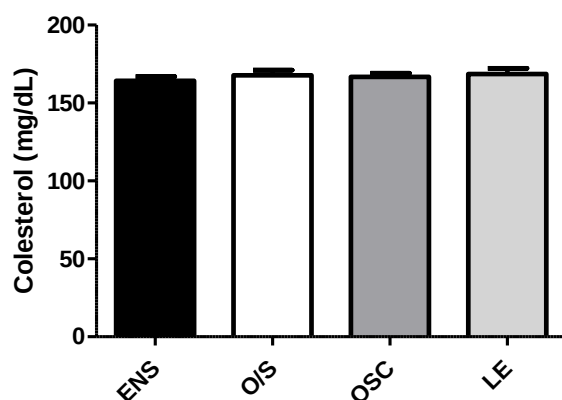


Figura 4. Níveis de colesterol pós-prandiais após 2 h da administração oral de uma refeição contendo Ensure® (ENS), refeição contendo Ensure® e 15% de mistura de óleo de soja e óleo de oliva (O/S), refeição contendo Ensure® e 15% de lipídio estruturado (LE), refeição contendo Ensure® e 15% de uma mistura de óleo de oliva/óleo de soja/óleo de crumbe totalmente hidrogenado (OSC).

4.3. Níveis séricos de IL-6, CRP e LPS

Os marcadores da inflamação IL-6 e CRP foram avaliados 2 horas após a administração das refeições e apresentaram valores significativamente menores nos grupos LE e OSC quando comparado ao grupo O/S (Figura 5A e 5B). Já os níveis séricos de LPS apresentou-se valor significativamente menor somente no grupo LE (Figura 5C) quando comparado ao grupo O/S. O valor do grupo O/S foi significativamente maior quando comparado ao grupo ENS (Figura 5C).

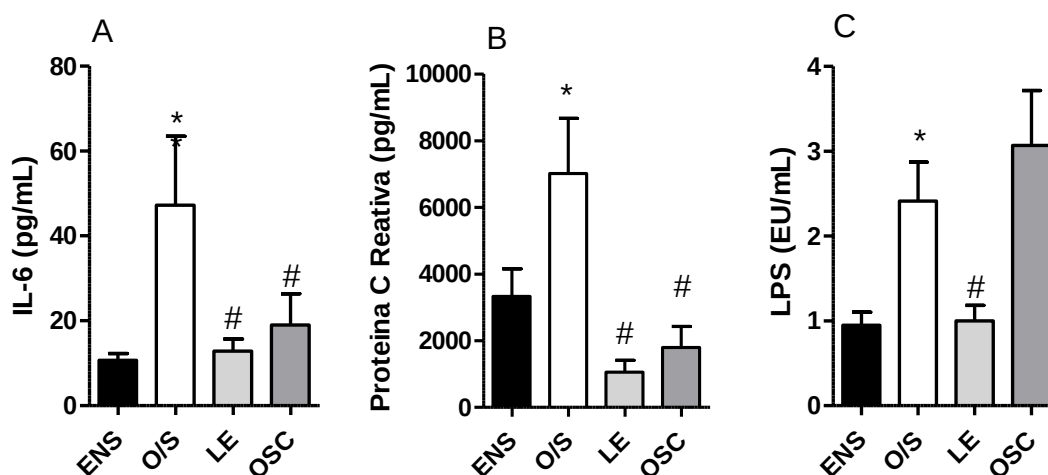


Figura 5. Marcadores de inflamação pós-prandial após 2h da administração oral de uma refeição contendo Ensure® (ENS), refeição contendo Ensure® e 15% de mistura de óleo de soja e óleo de oliva (O/S), refeição contendo Ensure® e 15% de lipídio estruturado (LE), refeição contendo Ensure® e 15% de uma mistura de óleo de oliva/óleo de soja/óleo de crumbe totalmente hidrogenado (OSC). Níveis séricos de IL-6 (A), nível plasmático de proteína C reativa (B), endotoxemia (C). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ENS ($n = 6$ / grupo). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo O/S ($n = 6$ / grupo).

4.4. Níveis séricos de hormônios intestinais e pancreáticos

A insulina apresentou valor significativamente menor no grupo LE em relação ao grupo O/S (Figura 6F) e a leptina estava significativamente menor para o grupo O/S em relação ao grupo ENS (Figura 6H). A quantificação dos demais hormônios não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 6A-E, 6G).

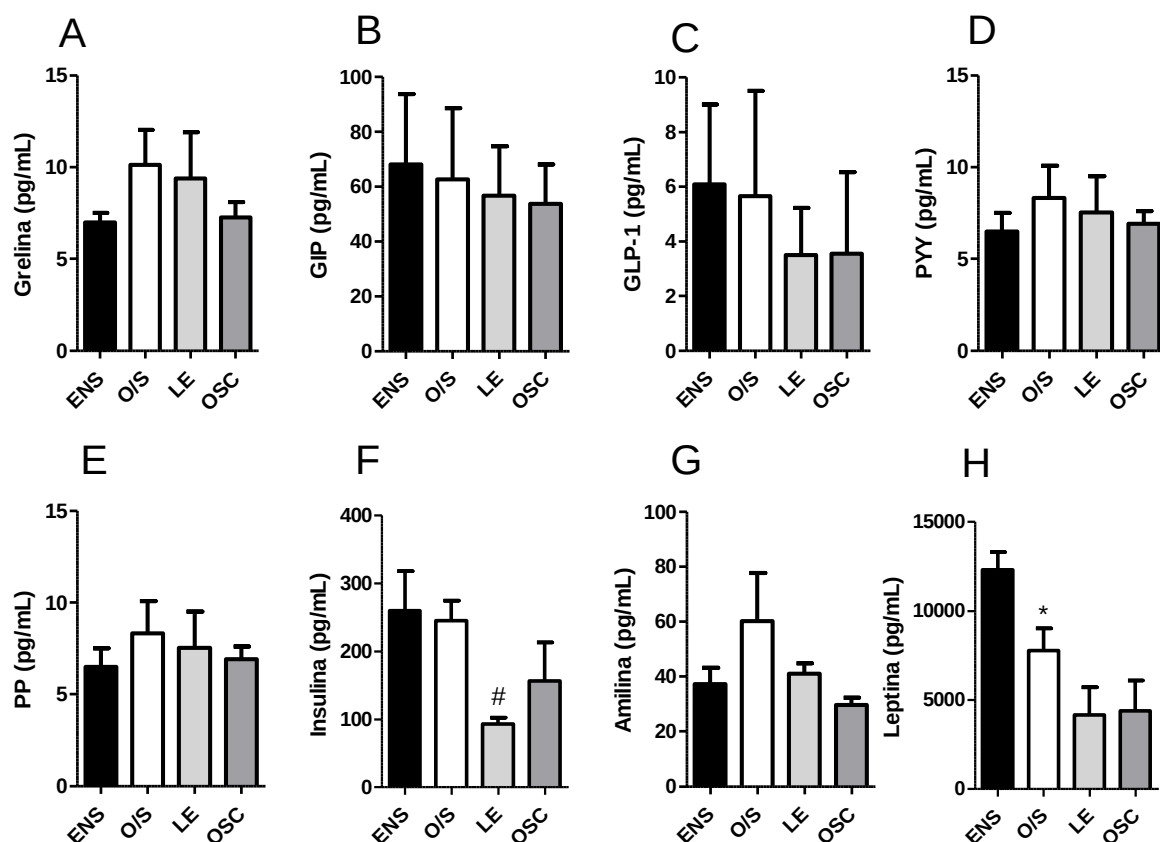


Figura 6. Níveis séricos pós-prandiais de hormônios pancreáticos e intestinais após 2h da administração oral de uma refeição contendo Ensure® (ENS), refeição contendo Ensure® e 15% de mistura de óleo de soja e óleo de oliva (O/S), refeição contendo Ensure® e 15% de lipídio estruturado (LE), refeição contendo Ensure® e 15% de uma mistura de óleo de oliva/óleo de soja/óleo de crumbe totalmente hidrogenado (OSC). *p <0,05 quando comparado ao grupo ensure, # p <0,05 quando comparado ao grupo O/S(n = 6 / grupo).

4.5. Avaliação do tempo de esvaziamento gástrico

O tempo do esvaziamento gástrico registrado com o uso das refeições acrescidas de vermelho de fenol revelou que não há diferenças significativas entre os grupos (Figura 7).

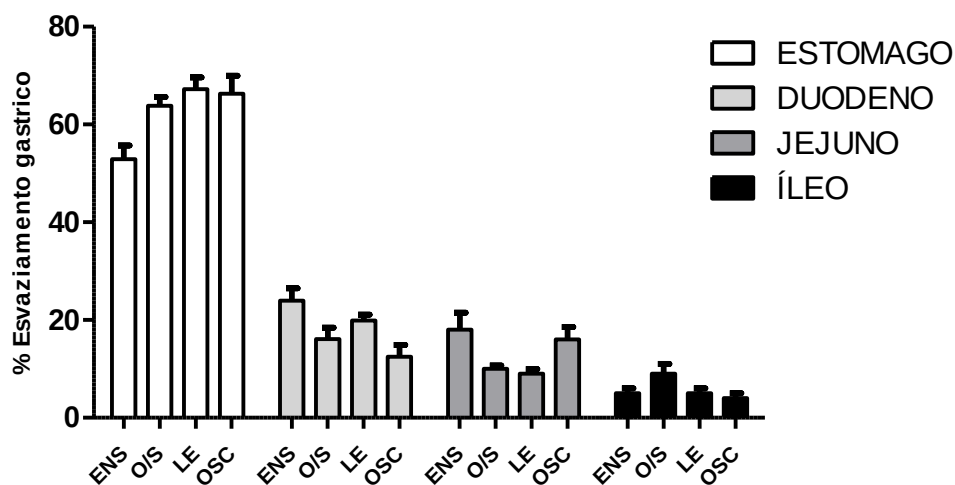


Figura 7. Esvaziamento gástrico após a administração oral de uma refeição contendo Ensure® (ENS), refeição contendo Ensure® e 15% de mistura de óleo de soja e óleo de oliva (O/S), refeição contendo Ensure® e 15% de lipídio estruturado (LE), refeição contendo Ensure® e 15% de uma mistura de óleo de oliva/óleo de soja/óleo de crambe totalmente hidrogenado (OSC).

4.6. Perfil qualitativo de ácidos graxos livres no soro

Após a administração oral de uma mistura de O/S e LE foi possível detectar a presença de ácido behênico sérico em 3 das 4 amostras. Os níveis dos demais ácidos graxos livres não foram modificados no soro dos animais como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Perfil qualitativo de ácidos graxos séricos 2 h após a administração de uma carga de óleo soja/oliva (S/O) e de lipídeo estruturado (LE) em camundongos.

Ácido graxo (%)		S/O (%)	LE (%)
C16:0	Palmítico	25.8±1.8	24.8±1.7
C16:1	Palmitoleico	2.1±0.1	2.3±0.2
C18:0	Esteárico	10.1±0.6	11.3±0.5
C18:1	Oleico	27.0±2.2	27.8±1.6
C18:2	Linoleico	25.9±1.0	24.8±0.6
C18:3	Linolênico	1.1±0.1	1.0±0.1
C20:4	Araquidônico (AA)	6.5±1.4	6.0±0.9
C22:0	Behênico	N.D	0.9±0.3*
C22:6	Docosahexaenoico (DHA)	1.3±0.5	1.1±0.3

Os dados são apresentados como média ± SEM de 4 amostras.

N.D = não detectado. * detectado em 3 de 4 amostras.

4.7. Efeito emagrecedor do LE versus o fármaco Orlistat em animais obesos

Durante 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica formulada com banha de porco como a principal fonte de lipídios, os camundongos apresentaram valores significativamente maiores de peso corporal quando comparados aos animais do grupo CN (Figura 8A). Após as 6 semanas de intervenções dietéticas ou farmacológica, observou-se que apenas o grupo DHORLIST apresentou peso corporal final menor quando comparado ao grupo DH (Figura 8B).

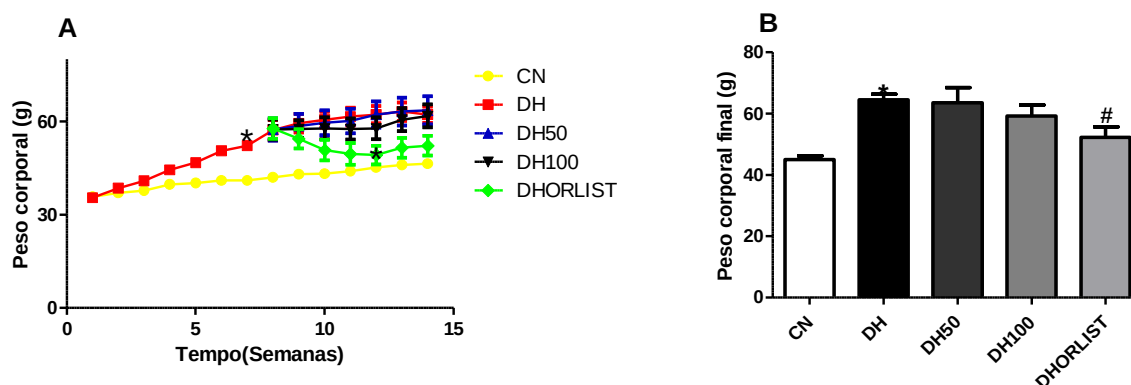


Figura 8. Peso corporal dos animais durante as 14 semanas de protocolo (A) e peso final corporal (B) dos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com Orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas finais (intervenção). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CN ($n = 5$ / grupo). # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH ($n = 5$ / grupo).

4.8. Composição corporal final

A pesagem de diferentes estoques de tecido adiposo, do músculo gastrocnêmio e do fígado foi empregada como forma de avaliar a composição corporal final dos animais. Pode-se notar que somente os animais do grupo DHORLIST apresentaram valores significativos menores nos tecidos TAE e TAS quando comparação ao grupo DH. Também as análises do peso dos fígados apresentaram valores significativamente menores nos grupos DH100 e DHORLIST quando comparados ao grupo DH. O fígado, TAE e TAS do DH apresentaram valores significativamente maiores quando comparado ao CN (Figura 9).

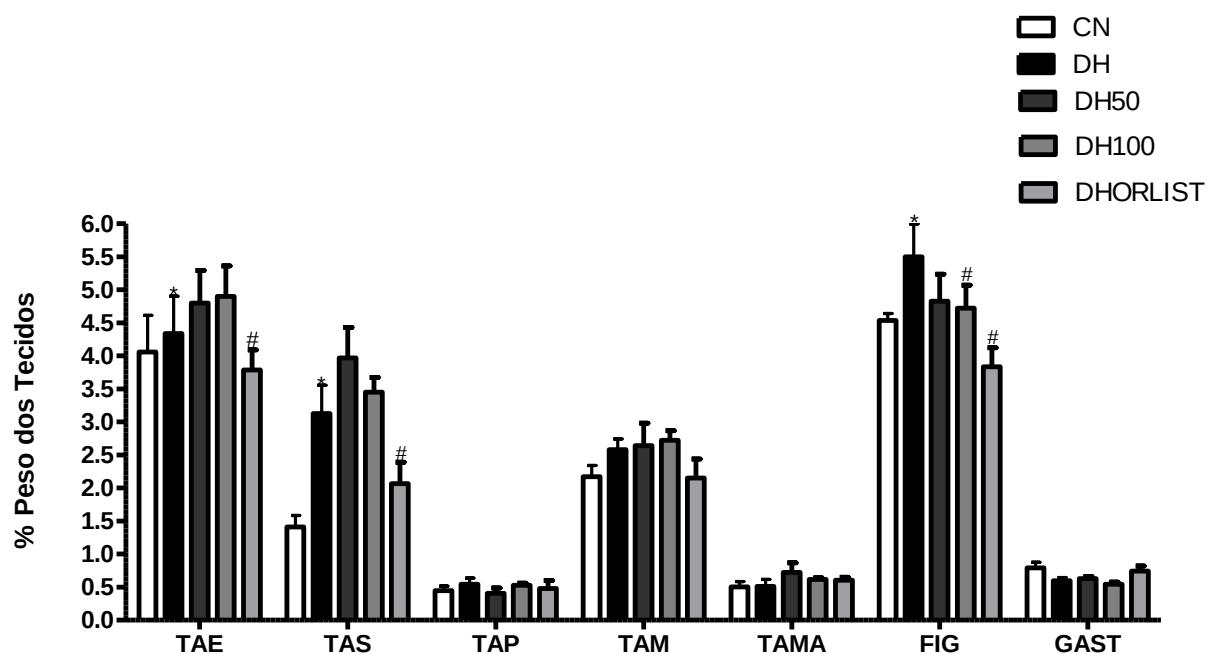


Figura 9. Pesos dos tecidos dos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com Orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CN (n= 5/ grupo). # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH (n= 5/ grupo).

4.9. Homeostasia glicêmica

A Figura 10A mostra que os valores glicêmicos de jejum para os grupos DH50, DH100 e DHORLIST estavam reduzidos quando comparado ao grupo DH. No grupo DH o valor glicêmico registrado foi significativamente maior quando comparado ao CN. Após a administração de insulina, o decaimento dos níveis glicêmicos gerou curvas com valores da AUC menores nos grupos DH50, DH100 e DHORLIST quando comparado ao grupo DH. Bem com o estabelecimento da obesidade tornou o valor glicêmico significativamente maior no grupo DH quando comparado ao grupo CN (Figura 10B). No entanto, no teste de tolerância à glicose foi observado valor significativamente menor da AUC apenas para grupo DHORLIST quando comparado ao DH. O grupo DH apresentou valor significativamente maior da AUC quando comparado ao grupo CN (Figura 10C).

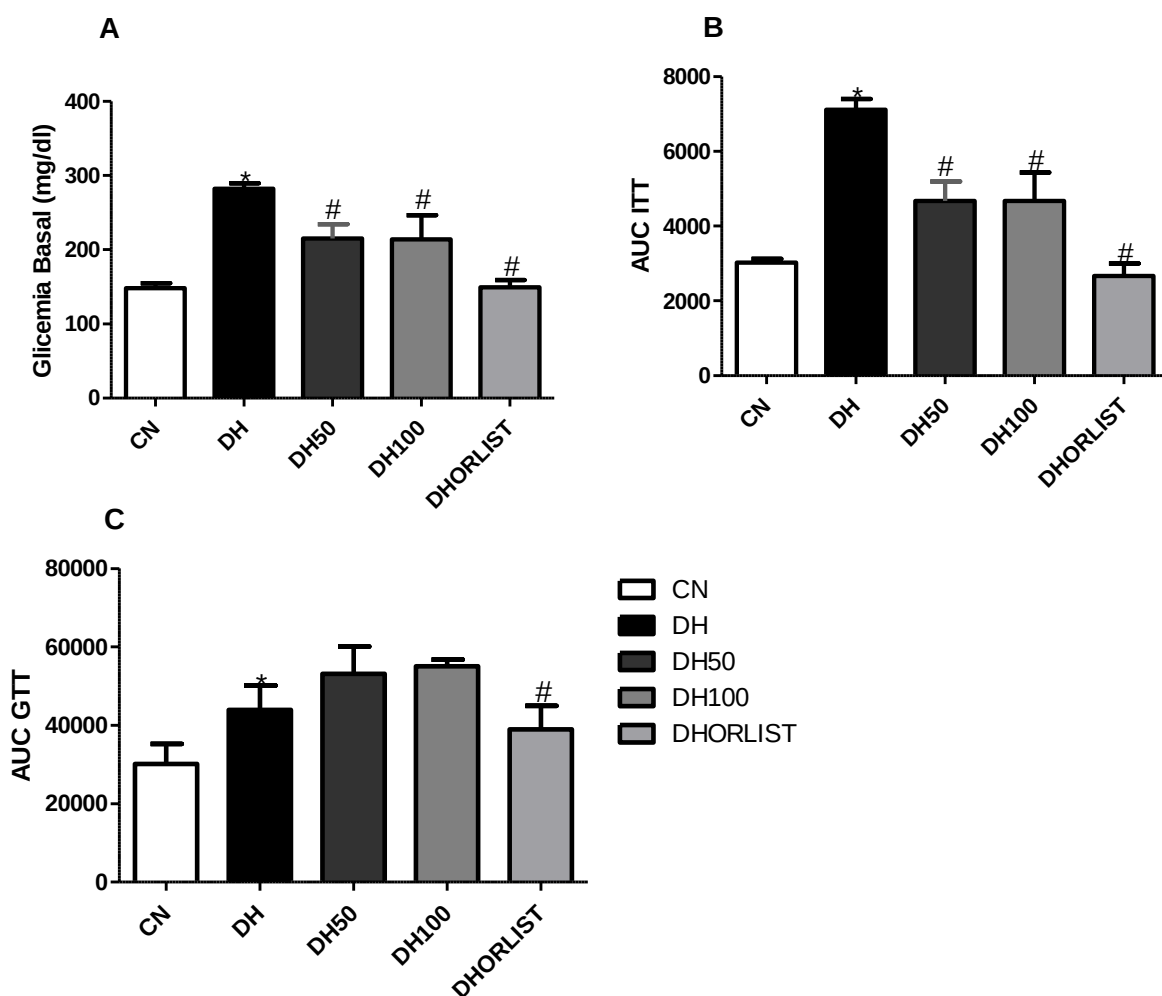


Figura 10. Glicemia basal (A), Área sobre a curva (AUC) calculada nas curvas glicêmicas durante o teste de tolerância à insulina (ITT; B) e AUC calculada nas curvas glicêmicas durante o teste de tolerância à glicose (GTT; C), dos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CN e # $p < 0,05$ quando comparado ao DH.

4.10. Níveis de TG e colesterol sérico

Os níveis séricos de triglicérides dos grupos DH50, DH100 e DHORLIST apresentaram valores significativamente menores quando comparado ao grupo do grupo DH (Figura 12A).

Enquanto o valor de colesterol apresentou diferença significativamente maior apenas para ao grupo DH quando comparado ao grupo CN. (Figura 11B.)

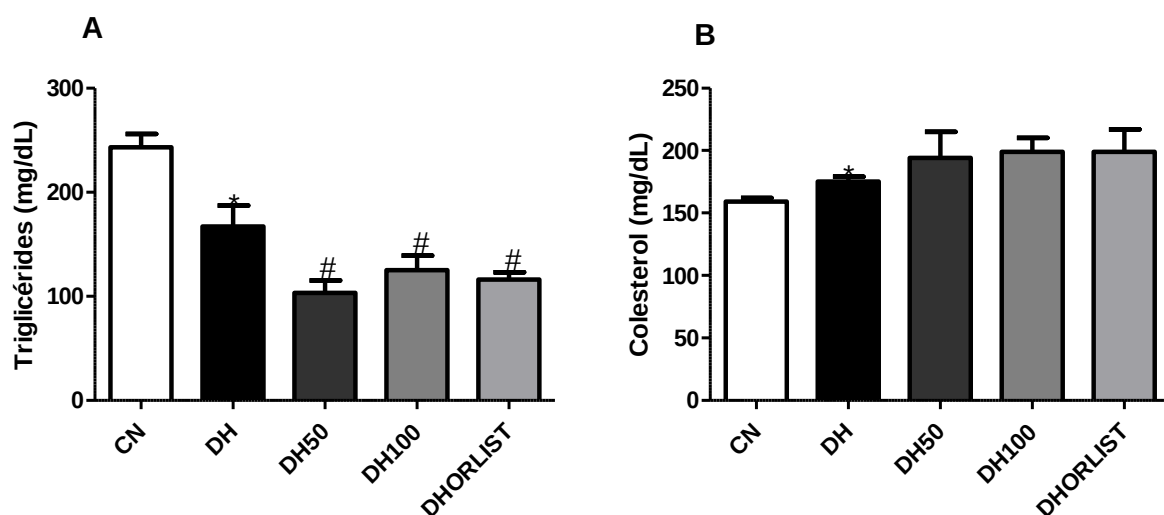


Figura 11. Níveis de TG e colesterol séricos dos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CN e # $p < 0,05$ quando comparado ao DH.

4.11. Níveis séricos de vitamina D₃

Os níveis de vitamina D séricos quantificados nos grupos DH50 E DH100 foram significativos menores quando comparado ao DH. Não houve diferença entre os grupo DH, DHORLIST e grupo CN (Figura 12).

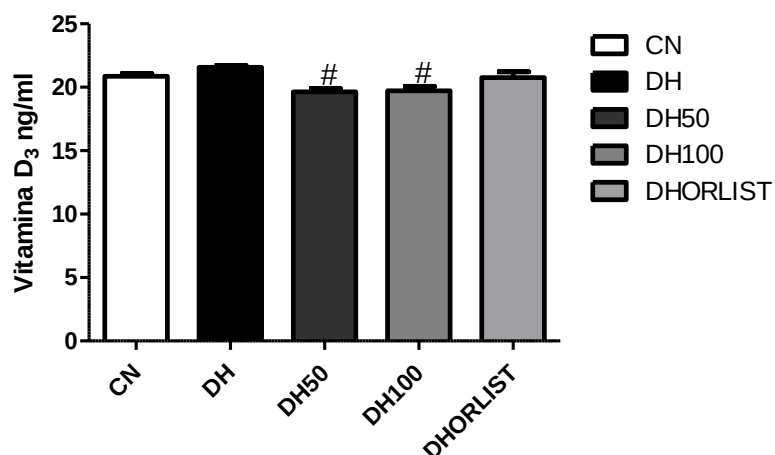


Figura 12. Avaliação dos níveis de vitamina D₃ do soro dos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH .

4.12. Avaliação do nível sérico de endotoxina

Camundongos alimentados com DH apresentaram valores significativamente maiores nos níveis séricos de endotoxina (LPS) quando comparado ao grupo CN. No entanto, o grupo DH100 apresentou valor significativamente menor quando comparados ao grupo DH. O grupo DHORLIST também apresentou valor significativamente menor quando comparados ao grupo DH (Figura 13).

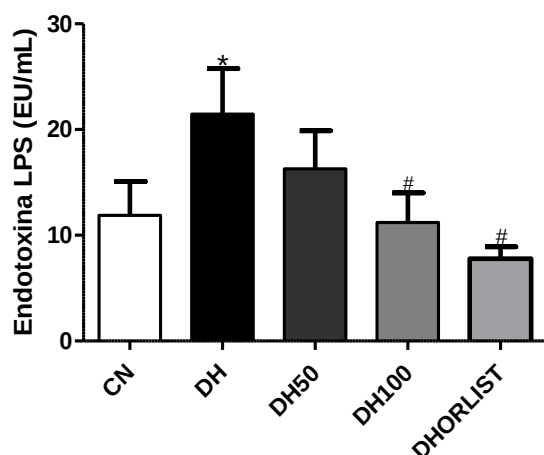


Figura 13. Avaliação dos níveis séricos de endotoxina nos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CN e # $p < 0,05$ quando comparado ao DH.

4.13. Avaliações hepáticas

As análises da presença de micro e macro esteatose nos cortes histológicos de fígado revelam que a obesidade aumenta de maneira significativa estes achados (Figura 14). Os grupos DH100 e DHORLIST apresentaram reduções nas porcentagem de micro e macro esteatose no fígado quando comparados ao grupo DH (Figura 15 A e B). A quantificação hepática dos lipídeos totais mostrou que estes estavam significativamente reduzidos nos grupos DH100 e DHORLIST (Figura 16A), enquanto a quantificação de colesterol mostrou que não havia diferença entre os grupos (Figura 16B). Os triglicérides hepáticos estavam reduzidos apenas no grupo DHORLIST quando comparado ao grupo DH (Figura 16C). A avaliação da expressão hepática de genes relacionados à inflamação como IL1 β foi significativamente menor para grupo DH100 quando comparado DH. A IL-6 foi significativamente menos expressa nos grupos DH50 e DH100 quando comparado ao DH. O TNF α foi significativamente menos expresso no grupo DH50, DH100 e DHORLIST quando comparado DH (Figura 17). Também as expressões gênicas para receptor TLR4 e transportador CD36 foram significativamente menores para os grupos DH50, DH100 e DHORLIST quando comparado ao DH. As expressões dos genes IL1 β , IL-6, TNF α , CD36 e TLR4 estavam aumentadas no grupo DH quando comparado ao grupo CN. Enquanto a expressão dos genes FATP2 e FATP5 não diferiu entre os grupos (Figura 17).

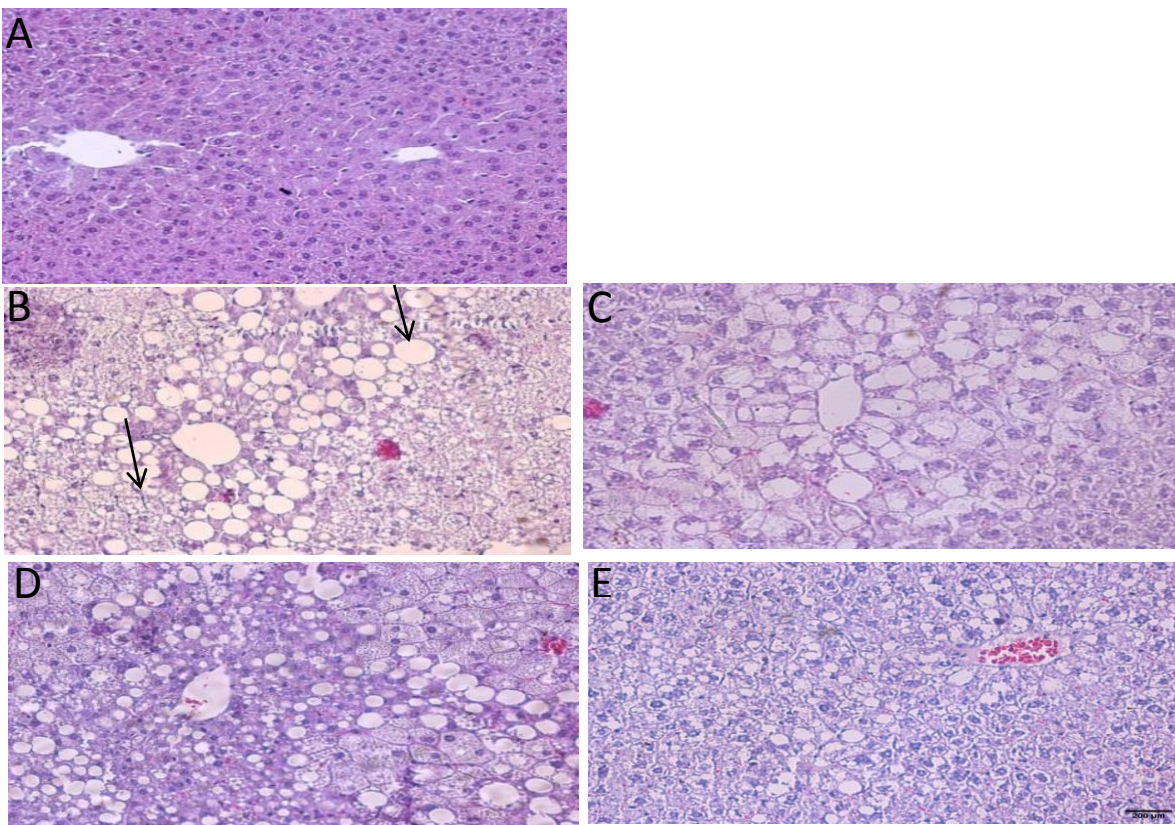


Figura 14. Cortes histológicos de fígado obtidos de animais alimentados com ração comercial CN (A), dieta hiperlipídica (B), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (C), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (D) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (E) durante as 6 semanas de intervenção. As setas: na parte superior indica macroesteatose e a seta na parte inferior indica microesteatose (B). Secções hepáticas de 4,0 μm , Ampliação 20x. Escala 200 μm

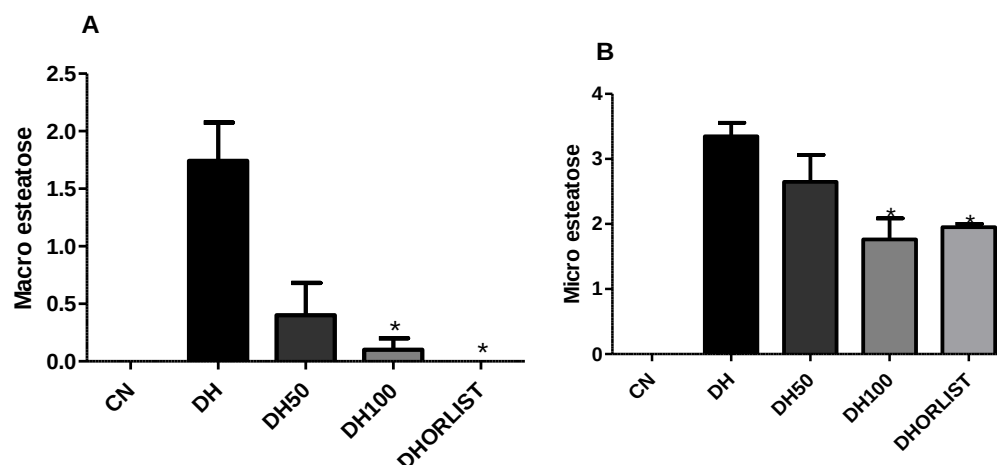


Figura 15. Quantificação de macro (A) e microesteatose (B) em fígados dos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH.

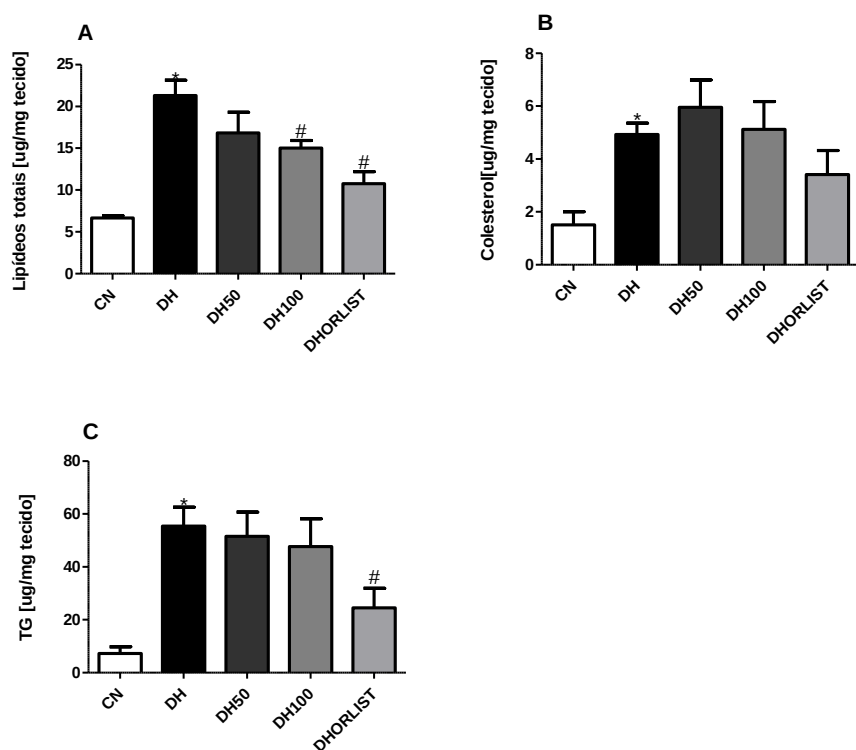


Figura 16. Conteúdo hepático de lipídeos totais (A), colesterol total (B) e triglicérides (TG; C) nos animais alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CN e # $p < 0,05$ quando comparado ao DH.

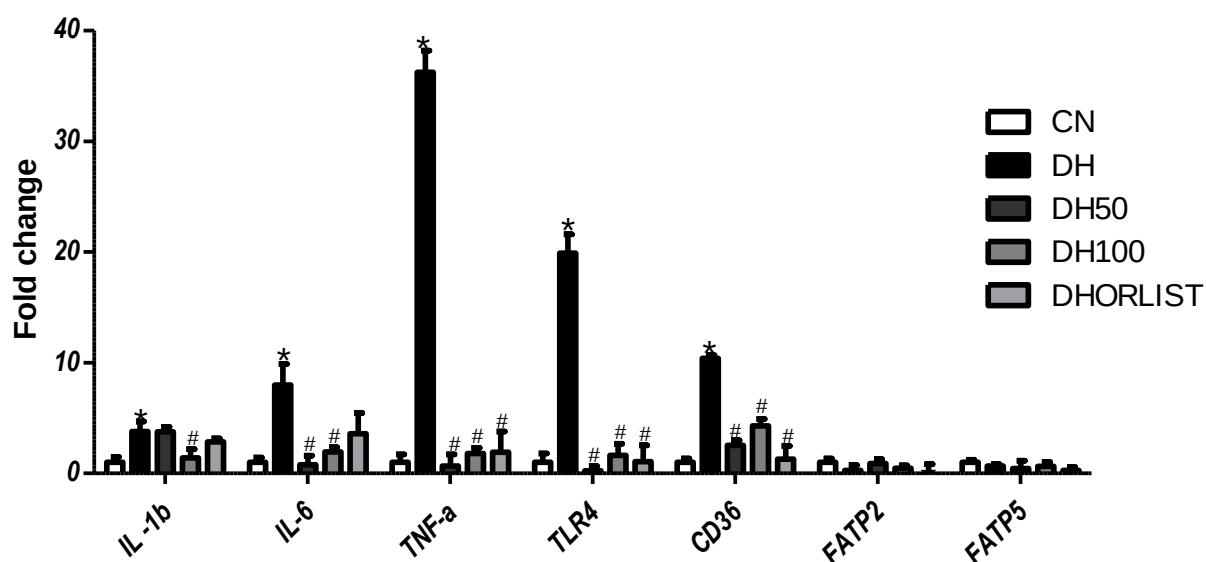


Figura 17. Avaliação da expressão gênica no fígado para IL1 β , IL-6, TNF α , TLR4, CD36, FATP2 e FATP5 dos grupos alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo CN e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH.

4.14. Análise quantitativa de DNA bacteriano em fezes

A expressão quantitativa de DNA específico de Firmicutes e Bacteroidetes foi avaliada em amostras de fezes. Notou-se um aumento significativo para ambos filós nos grupos DH50, DH100 e DHORLIST quando comparado ao DH. Nota-se também um valor significativamente menor da quantidade de bacteroidetes nos grupo DH quando comparado CN (Figura 18 A e B). A avaliação da atividade da MPO nos colón dos grupos DH50, DH100 e DHORLIST não foram diferentes entre os grupos (Figura 19).

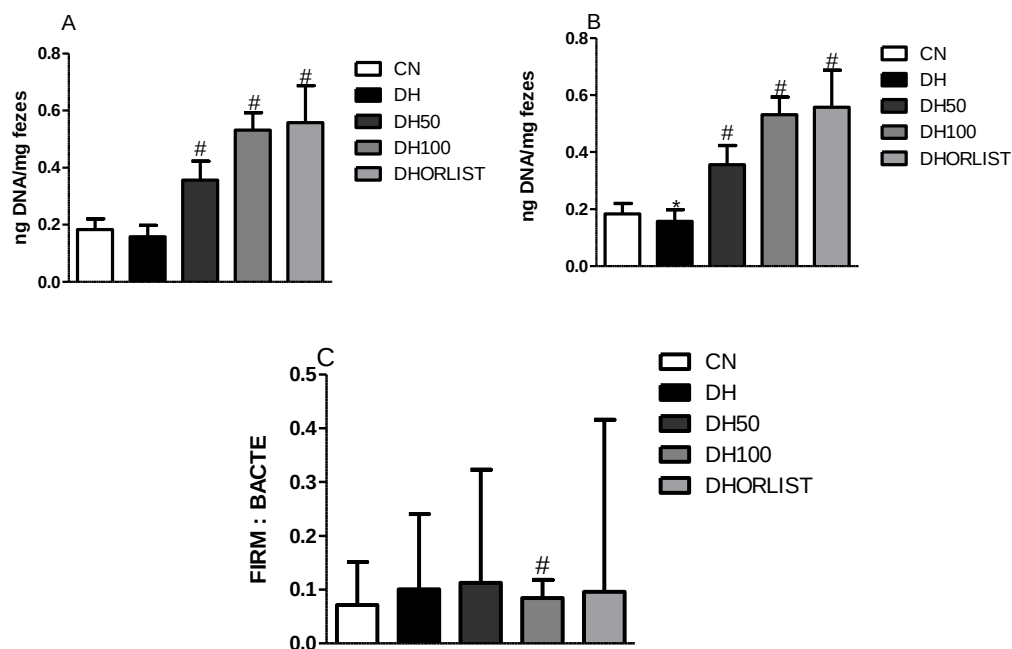


Figura 18. Expressão quantitativa de DNA do Firmicutes (A), Bacteroidetes (B) e razão Firmicutes:Bacteroidetes (C) nas fezes dos grupos alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção. * p < 0,05 quando comparado o grupo CN e # p < 0,05 quando comparado ao grupo DH.

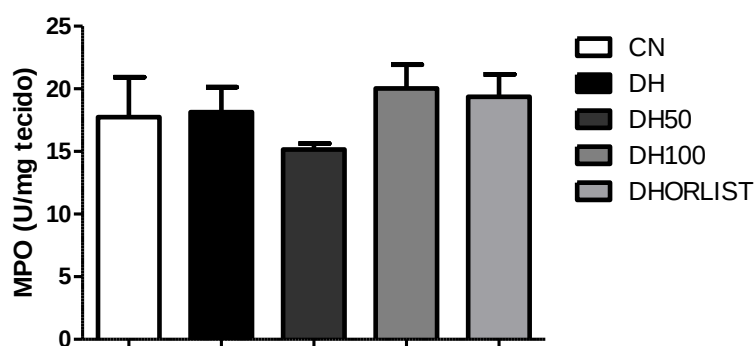


Figura 19. Atividade da mieloperoxidase no colon dos grupos alimentados com ração comercial (CN), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica contendo 50% de LE (DH50), dieta hiperlipídica contendo 100% de LE (DH100) e dieta hiperlipídica tratados com orlistat (DHORLIST) durante as 6 semanas de intervenção.

5. DISCUSSÃO

Embora a dieta, a atividade física e as modificações comportamentais sejam os pilares do controle de peso, a perda de peso obtida apenas por modificações no estilo de vida é limitada e difícil de manter (SAUNDERS et al., 2018). Deste modo, a busca por novos produtos dietéticos com potencial para auxiliar a perda ou controle de peso tem merecido destaque no cenário científico. Neste contexto, temos os LE com baixo valor calórico. Neste trabalho avaliamos a capacidade de um LE contendo ácido behênico frente a duas situações: na inflamação pós-prandial e como emagrecedor quando consumido a longo prazo.

Observamos pós-prandialmente uma menor concentração de triglicérides no plasma dos animais que ingeriram o LE, sugerindo que a presença de ácido behênico é capaz de reduzir a absorção intestinal de triglicérides. A capacidade do ácido behênico para inibir a absorção intestinal de gorduras foi demonstrada em dados anteriores de consumo de dieta hiperlipídica contendo lipídios estruturados com ácido behênico nas posições sn-1,3 (KANJILAL et al., 2013; KOJIMA et al., 2010; MOREIRA, et al., 2017). A absorção de glicose não foi influenciada por diferentes ácidos graxos das refeições. A liberação de insulina foi reduzida quando LE foi adicionado à refeição, o que sugere diferenças na sinalização pancreática iniciada por ácidos graxos absorvidos ou pela produção de incretina intestinal. Não há relatos na literatura de um possível efeito do ácido behênico sobre a produção de incretinas intestinais e pudemos observar que não há alteração significativa nos níveis séricos de incretinas GLP-1 e GIP no tempo de 2 horas (T2) da administração das refeições contendo ou não ácido behênico. Nossa primeira tese é que, ao diminuir a taxa de lipólise dos triglicérides da dieta, o ácido behênico causa uma redução na sua absorção e na quantidade de insulina secretada, uma vez que não foram observadas alterações nos níveis séricos de incretinas. A quantidade de insulina secretada no T2 para camundongos que receberam uma refeição de OSC não foi diferente dos camundongos que receberam uma refeição de O/S ou uma refeição normolipídica. O perfil da curva sérica de triglicérides obtida dos camundongos após a ingestão da refeição OSC mostrou que a concentração máxima (Cmax) foi alcançada após 1 hora (T1) ao invés de T2 como observado nos grupos (O/S, LE). Isso pode explicar a mudança observada na secreção de insulina e pode indicar que o processo de interesterificação também modifica a cinética de absorção de lipídios e a resposta endócrina a ela. Em trabalho anterior com camundongos alimentados com DH à longo prazo com LE, a análise no fígado não indicou a presença de ácido behênico que foi encontrado apenas nas fezes (MOREIRA, et al., 2017), sugerindo que o

ácido behênico não fosse absorvido pelo intestino. Esta afirmação é encontrada em diversos relatos da literatura onde o teste de behenato é usado para avaliar a absorção de gordura, porque o ácido behênico é um lipídio não absorvível (DORSEY et al., 2010). Mas, em alguns estudos de administração em curto prazo de Caprenin® ou 1(3)-beenoil-2,3 (1) -dioleoil-racglicerol em ratos, os autores evidenciaram alguma absorção de ácido behênico (KOJIMA et al., 2010; WEBB; SANDERS, 1991). Uma análise qualitativa realizada em amostras de soro evidenciou a presença do ácido behênico após T2 de carga oral de LE indicando absorção intestinal. Não há relatos sobre um possível efeito direto do ácido behênico nas funções das células β , mas um único relato indica níveis plasmáticos reduzidos para VLCFA saturados como ácido behênico e lignocerico em pacientes com síndrome metabólica em comparação com voluntários saudáveis (YAMAZAKI et al., 2014). O tipo de lipídio influencia a liberação de insulina pós-prandial, porque refeições formuladas com ácido oleico ou ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFAs) induzem menor liberação de insulina do que as refeições formuladas com ácido palmítico, confirmando os efeitos deletérios do palmitato na célula β , além de seus efeitos na resposta inflamatória pós-prandial (BERMUDEZ et al., 2014; SHAH et al., 2007). O esvaziamento gástrico também pode ser um fator interferente nas alterações absorptivas. Refeição rica em n-3 PUFA em contraste com a refeição rica em ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) foi capaz de induzir à redução a resposta ao GLP-1 (ROBERTSON et al., 2002). Não foi registrado quaisquer alterações nos níveis de GLP-1 em nosso experimento, nem na velocidade do esvaziamento gástrico, como demonstrada pela permanência do vermelho de fenol no estômago após diferentes refeições com alto teor de gordura. Hormônios gastrointestinais adicionais como grelina, PYY, PP e amilina não foram alterados pela administração de refeições com alto teor de gordura. Apenas a leptina demonstrou uma tendência à redução após as refeições contendo ácido behênico, bem como os níveis plasmáticos foram diferentes na dieta com baixo teor de gordura versus a de alto teor de gordura. Um estudo mostrou que a leptina sérica foi reduzida entre 3 e 6 horas pós-prandial depois da ingestão de diferentes refeições com alto teor de gordura, independente da composição do ácido graxo em comparação com os níveis basais em mulheres com peso normal (NARVERUD et al., 2016). Anteriormente, Romon et al. relataram que, em ambos os sexos, a resposta da leptina foi maior após a refeição com carboidrato do que após a refeição com gorduras e durante o jejum, sem que isso fosse traduzido em avaliações alteradas de fome e saciedade ou ingestão subsequente de energia (ROMON et al., 1999). Nossos resultados mostraram que a absorção de LPS foi reduzida após uma refeição de LE quando comparado ao grupo O/S. Os níveis séricos de IL-6 foram mantidos no mesmo nível do controle com baixo teor

de gordura, sugerindo uma diminuição na endotoxemia e na resposta inflamatória pós-prandial. Curiosamente, quando a refeição rica em gordura compreendia OSC, a endotoxemia foi observada apesar da redução na absorção de triglicérides. Os quilomícrons têm uma alta afinidade pelos LPSs, e têm um papel na absorção da gordura pós-prandial e do LPS do intestino (GHOSHAL et al., 2009), pois esse processo de absorção é provavelmente mais dependente da quantidade e estrutura da gordura (VORS et al., 2017; VORS et al., 2015) do que da alteração da permeabilidade intestinal (GNAUCK; LENTLE; KRUGER, 2015) ou do estado metabólico (VORS et al., 2017; VORS et al., 2015). Em nosso protocolo, a quantidade de lipídio administrada foi a mesma em todos os grupos, e apenas o lipídio estruturado resultou em menor endotoxemia. Portanto, nossa tese é de que a interesterificação enzimática modifica as características físicas da mistura de óleos, transformando uma mistura heterogênea em uma homogênea e também gera estruturas fisicamente diferentes que reduzem a absorção de LPS intestinal.

Animais que se tornaram obesos pelo consumo da dieta hiperlipídica por 8 semanas e passaram a consumir uma dieta com DH50 ou DH100 de lipídeo estruturado contendo ácido behênico por 6 semanas não apresentaram perda de peso ou redução de adiposidade. Já os animais que continuaram a ser alimentados com a DH e tratados com o fármaco Orlistat perderam peso. Clinicamente, o excesso de peso está ligado a um risco aumentado de vários problemas de saúde e a perda de uma pequena quantidade de peso, cerca de 5% ou 10% do peso corporal total, pode reduzir ou reverter esse risco. Apenas o tratamento com orlistat foi capaz de atingir esse objetivo de perda de peso, reduzindo em quase 5% do peso corporal dos camundongos. Foi demonstrado anteriormente que uma DH com 100% de lipídeo estruturado impediu o ganho de peso nos camundongo (MOREIRA, et al.; 2017). Mas não foi capaz de induzir a perda de peso após o estabelecimento da obesidade no presente estudo.

A análise da composição corporal indicou uma redução significativa no peso do fígado no grupo DH100 e também no grupo orlistat, assim como também diminuição de estoques de tecido adiposo no grupo orlistat. A escolha da dose do orlistat foi baseada em dados da literatura que demonstram resultados compatíveis com os observados neste trabalho (YIMAM, et al., 2017). A avaliação metabólica dos animais revelou que apesar da manutenção da obesidade, os camundongos alimentados com a DH100 apresentaram melhora do controle glicêmico, com variações glicêmicas menores após a administração de uma sobrecarga de glicose e um decaimento da glicemia mais acentuado após a administração de insulina. Um estudo revelou que níveis séricos aumentados de ácido behênico estavam relacionados a um

baixo risco de diabetes em indivíduos idosos (FOROUHI et al., 2014; LEMAITRE et al., 2015) embora estes mesmos trabalhos indiquem a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a função destes e da participação da dieta ou da síntese endógena na alteração dos níveis de VLCFA observados. Outro relato aponta que em ensaios in silico, os ácidos graxos livres saturados, como ácido esteárico, palmítico, mirístico e behênico, reduziram marcadamente a atividade da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (SHIBATA et al., 2013). A PTP1B desempenha um papel importante na regulação negativa da via de transdução do sinal da insulina e tem emergido como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento do diabetes tipo 2 (TAMRAKAR; MAURYA; RAI, 2014). O tratamento com orlistat também resultou em melhora do controle glicêmico. Níveis de triglicérides no soro de jejum foram reduzidos em todos os grupos, porém níveis séricos de colesterol em jejum não apresentaram alterações. Isso corrobora com dados do primeiro protocolo. Uma redução significativa nos níveis séricos de endotoxina foi registrada no grupo DH100 e DHORLIST. Evidências também sugerem que o tipo de dietas ricas em ácido graxo saturado ou ácido graxo insaturado tem sido associadas a reduções ou aumento das endotoxinas na resposta inflamatória pós-prandial (LOPEZ-MORENO et al., 2017). Em outro estudo foi demonstrado que o consumo de amendoim rico em ácido oléico reduz a endotoxina sérica em homens saudáveis em comparação com o consumo de amendoim padrão (MOREIRA, et al., 2016). O LPS é um estímulo potente do complexo receptor-diferenciação mieloide-2/receptores *toll-like* 4 (MD-2-TLR4) expresso em hepatócitos (SHARIFNIA et al., 2015), em células de Kupffer (KCs) (XU et al., 2008) e em células hepáticas estreladas (PAIK et al., 2003), levando à translocação de NF- κ B para o núcleo e a expressão de citocinas inflamatórias. A boca e cólon são fontes ricas de LPS no trato gastrointestinal e a translocação para o sangue pode ocorrer frequentemente pela via linfática do intestino delgado, junto com lipídios ricos em triglicerídeos (quilomícrons e outros) (GHOSHAL et al., 2009) quando a permeabilidade intestinal aumenta (ERRIDGE, 2011; VAN DEVENTER et al., 1988). Nossa tese é que a redução da absorção de triglicérides pela inibição da lipase pancreática ou por alterações estruturais nos quilomícrons promovidos pela presença de ácido behênico como já discutido anteriormente, reduz a absorção de LPS resultando em diminuição da sinalização inflamatória hepática, ativado pela via de NF- κ B, e diminuição na expressão gênica de citocinas. Assim, pudemos ver que a expressão gênica de TLR-4 e de citocinas inflamatórias foi reduzida no fígado. Clinicamente, a DHGNA é considerada um precursor da síndrome metabólica (LONARDO et al., 2015) e a elevação da atividade do NF- κ B e produção de TNF- α nas células hepáticas estão associadas à resistência insulínica (ARKAN et al., 2005; TILG, 2010). Também houve uma redução da absorção da vitamina D em todos grupos, menos no

grupo DHORLIST. Em um estudo clínico com fármaco orlistat foi necessária suplementar a vitamina D para os pacientes em comparação com os pacientes tratados com placebo (FINER et al., 2000; HOLLANDER et al., 1998). Neste caso, nosso lipídio estruturado não foi diferente do orlistat. Avaliações morfológicas do fígado evidenciaram a presença de macro e micro esteatose no grupo tratado com DH e os grupos DH100 e DHORLIST tiveram diminuição destas alterações. Isso indica que essas dietas melhoram a esteatose hepática. Biópsias hepáticas do grupo DHORLIST e DH100 apresentam uma quantidade reduzida de lipídeos totais. Entretanto, o conteúdo de colesterol não foi reduzido e o conteúdo de triglicerídeos foi reduzido de forma significativa somente no grupo Orlistat. Portanto uma importante função dos lipídeos estruturados é fornecer ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico (18:2n-6) e linolênico (18:3n-3) que são encontrados em óleos vegetais como o óleo de soja e azeite. Esses ácidos graxos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento ao longo do ciclo de vida humano, bem como para a promoção de melhorias na saúde (MOREIRA; SANTOS; et al., 2017). Outro estudo mostrou que dieta rica em AGIS, independentemente da série (n-3) ou (n-6), diminui significativamente os níveis séricos de lipídios e lipoproteínas (ZHAO et al., 2004). A expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α , assim como o receptor *Toll-like-4* (TLR-4) que estão aumentados em camundongos obesos (grupo DH) foi reduzida nas amostras do fígado de todos os grupos. A redução da expressão gênica de IL-1 β foi observada apenas no grupo DH100 em comparação com DH. Resultado semelhante foi observado por Monfort e Quintanilha que ingestão de alimentos ricos em gordura saturada foi capaz de aumentar a expressão de moléculas pró-inflamatório, tais como IL-6, TNF- α , IL-1 β e TLR-4 (MONFORT-PIRES et al., 2018; QUINTANILHA et al., 2019). Deste modo não podemos descartar a possibilidade de que os constituintes do lipídio estruturado modulem diretamente a expressão genica de marcadores inflamatórios hepáticos trazendo benefícios ao metabolismo desses animais. A translocase CD36 está implicada na absorção de ácidos graxos em múltiplos tecidos, incluindo hepatócitos e em indivíduos com perda de peso por meio de cirurgia bariátrica, foi associada a reduções na expressão do gene CD36, mas não de TNF- α ou IL-6 associado à reduções na esteatose hepática (PARDINA et al., 2017). Observamos uma redução acentuada na expressão do gene hepático CD36 em todas as intervenções. Além de modular o armazenamento de ácidos graxos, é relatado que CD36 atua como um receptor de reconhecimento de padrões e ativa a resposta inflamatória metabólica incluindo as vias TLR-4, NF- κ B e c-Jun quinase N-terminal (JNK) (STEWART et al., 2010; ZHAO, L. et al., 2018), e uma inibição da expressão da proteína CD36 poderia potencialmente contribuir também para um melhor controle da inflamação hepática observada. Desta forma, o lipídio estruturado

caracterizado neste estudo poderia ser uma boa alternativa para o tratamento de pacientes com DHGNA.

A análise microbiana confirmou que a DH reduz a quantidade de Bacteroidetes, aumentando a razão Firmicute:Bacteroidetes como descrito em abordagens experimentais (IJAZ et al., 2018; KOLIADA et al., 2017). A análise quantitativa de DNA específico de Firmicutes e Bacteroidetes mostrou um aumento para ambos nos grupos DH50 e DH100. O orlistat também promoveu aumentos nas quantidades de Firmicutes e Bacteroidetes, sugerindo que o aumento da disponibilidade de gordura no lúmen intestinal pode contribuir para a proliferação de bactérias. Atividades da mieloperoxidase no colón dos grupos não apresentaram diferença estatística para nenhuma das intervenções, sugerindo que o aumento do número de bactérias não é entendido como um insulto ou induz uma resposta inflamatória.

6. CONCLUSÃO

A administração de uma refeição hiperlipídica contendo o LE rico em ácido behênico promoveu uma menor resposta inflamatória pós-prandial, com níveis séricos menores de IL-6, CRP e endotoxina em resposta a uma menor absorção de triglicerídeos, sem alterar a produção de hormônios gastrointestinais ou o tempo de esvaziamento gástrico, mostrando seu potencial em controlar a inflamação pós-prandial.

O consumo de dieta hiperlipídica contendo LE rico em ácido behênico não resultou em perda de peso nos camundongos obesos. No entanto, estes se apresentaram mais saudáveis, com um bom controle glicêmico, com marcadores reduzidos da DHGNA e composição da microbiota do que os camundongos alimentados com dieta formulada a base de banha de porco, mostrando que o consumo de LE rico em ácido behênico pode ser benéfico em indivíduos obesos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; LIAQAT, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **J Cell Biochem**, v. 119, n. 1, p. 105-110, 2018.

ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L.; GRETEN, F. R.; MAEDA, S.; LI, Z. W.; LONG, J. M.; WYNSHAW-BORIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 191-198, 2005.

BERMUDEZ, B.; ORTEGA-GOMEZ, A.; VARELA, L. M.; VILLAR, J.; ABIA, R.; MURIANA, F. J.; LOPEZ, S. Clustering effects on postprandial insulin secretion and sensitivity in response to meals with different fatty acid compositions. **Food Funct**, v. 5, n. 7, p. 1374-1380, 2014.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D bioavailability: state of the art. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 55, n. 9, p. 1193-1205, 2015.

CRUZ-HERNANDEZ, C.; OLIVEIRA, M.; PESCIA, G.; MOULIN, J.; MASSEREY-ELMELEGY, I.; DIONISI, F.; DESTAILLATS, F. Lipase inhibitor orlistat decreases incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in rat tissues. **Nutr Res**, v. 30, n. 2, p. 134-140, 2010.

CUMMINGS, D. E.; COHEN, R. V. Response to Comment on Cummings and Cohen. Bariatric/Metabolic Surgery to Treat Type 2 Diabetes in Patients With a BMI <35 kg/m². *Diabetes Care* 2016;39:924-933. **Diabetes Care**, v. 40, n. 6, p. e73-e74, 2017.

DECKELBAUM, R. J.; TORREJON, C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: health benefits and sources. **J Nutr**, v. 142, n. 3, p. 587S-591S, 2012.

DORSEY, J.; BUCKLEY, D.; SUMMER, S.; JANDACEK, R. J.; RIDER, T.; TSO, P.; NARKEWICZ, M. R.; HEUBI, J. E. Fat malabsorption in cystic fibrosis: comparison of quantitative fat assay and a novel assay using fecal lauric/behenic acid. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 50, n. 4, p. 441-446, 2010.

ERRIDGE, C. Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 1, p. 1-6, 2011.

FILIPPATOS, T.; TSIMIHODIMOS, V.; PAPPA, E.; ELISAF, M. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidaemia. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 15, n. 6, p. 566-575, 2017.

FINER, N.; JAMES, W. P.; KOPELMAN, P. G.; LEAN, M. E.; WILLIAMS, G. One-year treatment of obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, n. 3, p. 306-313, 2000.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FOROUHI, N. G.; KOULMAN, A.; SHARP, S. J.; IMAMURA, F.; KROGER, J.; SCHULZE, M. B.; CROWE, F. L.; HUERTA, J. M.; GUEVARA, M.; BEULENS, J. W.; VAN WOUDEBERGH, G. J.; WANG, L.; SUMMERHILL, K.; GRIFFIN, J. L.; FESKENS, E. J.; AMIANO, P.; BOEING, H.; CLAVEL-CHAPELON, F.; DARTOIS, L.; FAGHERAZZI, G.; FRANKS, P. W.; GONZALEZ, C.; JAKOBSEN, M. U.; KAAKS, R.; KEY, T. J.; KHAW, K. T.; KUHN, T.; MATTIELLO, A.; NILSSON, P. M.; OVERVAD, K.; PALA, V.; PALLI, D.; QUIROS, J. R.; ROLANDSSON, O.; ROSWALL, N.; SACERDOTE, C.; SANCHEZ, M. J.; SLIMANI, N.; SPIJKERMAN, A. M.; TJONNELAND, A.; TORMO, M. J.; TUMINO, R.; VAN DER, A. D.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; LANGENBERG, C.; RIBOLI, E.; WAREHAM, N. J. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 10, p. 810-818, 2014.

GERARD, P. Gut Microbiome and Obesity. How to Prove Causality? **Ann Am Thorac Soc**, v. 14, n. Supplement_5, p. S354-S356, 2017.

GHOSHAL, S.; WITTA, J.; ZHONG, J.; DE VILLIERS, W.; ECKHARDT, E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. **J Lipid Res**, v. 50, n. 1, p. 90-97, 2009.

GNAUCK, A.; LENTLE, R. G.; KRUGER, M. C. Aspirin-induced increase in intestinal paracellular permeability does not affect the levels of LPS in venous blood of healthy women. **Innate Immun**, v. 21, n. 5, p. 537-545, 2015.

GOTTHARDT, J. D.; BELLO, N. T. Can we win the war on obesity with pharmacotherapy? **Expert Rev Clin Pharmacol**, p. 1-9, 2016.

GUO, X.; XIA, X.; TANG, R.; ZHOU, J.; ZHAO, H.; WANG, K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Lett Appl Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 367-373, 2008.

GUTT, S.; SCHRAIER, S.; GONZALEZ BAGNES, M. F.; YU, M.; GONZALEZ, C. D.; DI GIROLAMO, G. Long-term pharmacotherapy of obesity in patients that have undergone bariatric surgery: pharmacological prevention and management of body weight regain. **Expert Opin Pharmacother**, p. 1-9, 2019.

HAUPTMAN, J. B.; JEUNET, F. S.; HARTMANN, D. Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipostatin). **Am J Clin Nutr**, v. 55, n. 1 Suppl, p. 309S-313S, 1992.

HOLLANDER, P. A.; ELBEIN, S. C.; HIRSCH, I. B.; KELLEY, D.; MCGILL, J.; TAYLOR, T.; WEISS, S. R.; CROCKETT, S. E.; KAPLAN, R. A.; COMSTOCK, J.; LUCAS, C. P.; LODEWICK, P. A.; CANOVATCHEL, W.; CHUNG, J.; HAUPTMAN, J. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A 1-year randomized double-blind study. **Diabetes Care**, v. 21, n. 8, p. 1288-1294, 1998.

HUMA, Z. E.; SANCHEZ, J.; LIM, H. D.; BRIDGFORD, J. L.; HUANG, C.; PARKER, B. J.; PAZHAMALIL, J. G.; POREBSKI, B. T.; PFLEGER, K. D. G.; LANE, J. R.; CANALS, M.; STONE, M. J. Key determinants of selective binding and activation by the monocyte chemoattractant proteins at the chemokine receptor CCR2. **Sci Signal**, v. 10, n. 480, 2017.

HUTCH, C. R.; SANDOVAL, D. A. Physiological and molecular responses to bariatric surgery: markers or mechanisms underlying T2DM resolution? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1391, n. 1, p. 5-19, 2017.

IJAZ, M. U.; AHMED, M. I.; ZOU, X.; HUSSAIN, M.; ZHANG, M.; ZHAO, F.; XU, X.; ZHOU, G.; LI, C. Beef, Casein, and Soy Proteins Differentially Affect Lipid Metabolism, Triglycerides Accumulation and Gut Microbiota of High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. **Front Microbiol**, v. 9, p. 2200, 2018.

KANJILAL, S.; KAKI, S. S.; RAO, B. V.; SUGASINI, D.; RAO, Y. P.; PRASAD, R. B.; LOKESH, B. R. Hypocholesterolemic effects of low calorie structured lipids on rats and rabbits fed on normal and atherogenic diet. **Food Chem**, v. 136, n. 1, p. 259-265, 2013.

KOJIMA, M.; TACHIBANA, N.; YAMAHIRA, T.; SEINO, S.; IZUMISAWA, A.; SAGI, N.; ARISHIMA, T.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. Structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids suppresses triacylglycerol absorption and prevents obesity in rats. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 77, 2010.

KOK, W. M.; CHUAH, C. H.; CHENG, S. F. Enzymatic synthesis of structured lipids with behenic acid at the sn-1, 3 positions of triacylglycerols. **Food Sci Biotechnol**, v. 27, n. 2, p. 353-366, 2018.

KOLIADA, A.; SYZENKO, G.; MOSEIKO, V.; BUDOVSKA, L.; PUCHKOV, K.; PEREDERIY, V.; GAVALKO, Y.; DOROFYEV, A.; ROMANENKO, M.; TKACH, S.; SINEOK, L.; LUSHCHAK, O.; VAISERMAN, A. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 120, 2017.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.

LAU, L. H. S.; WONG, S. H. Microbiota, Obesity and NAFLD. **Adv Exp Med Biol**, v. 1061, p. 111-125, 2018.

LAURSEN, T. L.; HAGEMANN, C. A.; WEI, C.; KAZANKOV, K.; THOMSEN, K. L.; KNOP, F. K.; GRONBAEK, H. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effects. **World J Hepatol**, v. 11, n. 2, p. 138-149, 2019.

LEITNER, D. R.; FRUHBECK, G.; YUMUK, V.; SCHINDLER, K.; MICIC, D.; WOODWARD, E.; TOPLAK, H. Obesity and Type 2 Diabetes: Two Diseases with a Need for Combined Treatment Strategies - EASO Can Lead the Way. **Obes Facts**, v. 10, n. 5, p. 483-492, 2017.

LEMAITRE, R. N.; FRETTS, A. M.; SITLANI, C. M.; BIGGS, M. L.; MUKAMAL, K.; KING, I. B.; SONG, X.; DJOUSSE, L.; SISCOVICK, D. S.; MCKNIGHT, B.; SOTOODEHNIA, N.; KIZER, J. R.; MOZAFFARIAN, D. Plasma phospholipid very-long-chain saturated fatty acids and incident diabetes in older adults: the Cardiovascular Health Study. **Am J Clin Nutr**, v. 101, n. 5, p. 1047-1054, 2015.

LESCANO DE SOUZA JUNIOR, A.; MANCINI FILHO, J.; PAVAN TORRES, R.; IRIGOYEN, M. C.; CURI, R. Pretreatment with fish oil attenuates heart ischaemia consequences in rats. **Exp Physiol**, v. 102, n. 11, p. 1459-1473, 2017.

LONARDO, A.; BALLESTRI, S.; MARCHESINI, G.; ANGULO, P.; LORIA, P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. **Dig Liver Dis**, v. 47, n. 3, p. 181-190, 2015.

LOPEZ-MORENO, J.; GARCIA-CARPINTERO, S.; GOMEZ-DELGADO, F.; JIMENEZ-LUCENA, R.; VALS-DELGADO, C.; ALCALA-DIAZ, J. F.; RONCERO-RAMOS, I.; RANGEL-ZUNIGA, O. A.; YUBERO-SERRANO, E. M.; MALAGON, M. M.; ORDOVAS, J. M.; PEREZ-MARTINEZ, P.; LOPEZ-MIRANDA, J.; CAMARGO, A. Endotoxemia is modulated by quantity and quality of dietary fat in older adults. **Exp Gerontol**, v. 109, p. 119-125, 2018.

LOPEZ-MORENO, J.; GARCIA-CARPINTERO, S.; JIMENEZ-LUCENA, R.; HARO, C.; RANGEL-ZUNIGA, O. A.; BLANCO-ROJO, R.; YUBERO-SERRANO, E. M.; TINAHONES, F. J.; DELGADO-LISTA, J.; PEREZ-MARTINEZ, P.; ROCHE, H. M.; LOPEZ-MIRANDA, J.; CAMARGO, A. Effect of Dietary Lipids on Endotoxemia Influences Postprandial Inflammatory Response. **J Agric Food Chem**, v. 65, n. 35, p. 7756-7763, 2017.

LYTE, J. M.; GABLER, N. K.; HOLLIS, J. H. Postprandial serum endotoxin in healthy humans is modulated by dietary fat in a randomized, controlled, cross-over study. **Lipids Health Dis**, v. 15, n. 1, p. 186, 2016.

MARTIN-PELAEZ, S.; MOSELE, J. I.; PIZARRO, N.; FARRAS, M.; DE LA TORRE, R.; SUBIRANA, I.; PEREZ-CANO, F. J.; CASTANER, O.; SOLA, R.; FERNANDEZ-CASTILLEJO, S.; HEREDIA, S.; FARRE, M.; MOTILVA, M. J.; FITO, M. Effect of virgin olive oil and thyme

phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. **Eur J Nutr**, v. 56, n. 1, p. 119-131, 2017.

MAURYA, V. K.; AGGARWAL, M. Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 12, p. 3753-3765, 2017.

MONFORT-PIRES, M.; CRISMA, A. R.; BORDIN, S.; FERREIRA, S. R. G. Greater expression of postprandial inflammatory genes in humans after intervention with saturated when compared to unsaturated fatty acids. **Eur J Nutr**, v. 57, n. 8, p. 2887-2895, 2018.

MOREIRA; RACT, J. N. R.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. **Food Res Int**, v. 99, n. Pt 1, p. 713-719, 2017.

MOREIRA; SANTOS, P. S.; GAMBERO, A.; MACEDO, G. A. Evaluation of structured lipids with behenic acid in the prevention of obesity. **Food Res Int**, v. 95, p. 52-58, 2017.

MOREIRA, A. P.; TEIXEIRA, T. F.; ALVES, R. D.; PELUZIO, M. C.; COSTA, N. M.; BRESSAN, J.; MATTES, R.; ALFENAS, R. C. Effect of a high-fat meal containing conventional or high-oleic peanuts on post-prandial lipopolysaccharide concentrations in overweight/obese men. **J Hum Nutr Diet**, v. 29, n. 1, p. 95-104, 2016.

NA, H. Y.; LEE, B. C. Scutellaria baicalensis Alleviates Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice by Modulating Inflammation. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 3, 2019.

NADKARNI, M. A.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 1, p. 257-266, 2002.

NAKAMURA, K.; MIYOSHI, T.; YUNOKI, K.; ITO, H. Postprandial hyperlipidemia as a potential residual risk factor. **J Cardiol**, v. 67, n. 4, p. 335-339, 2016.

NARVERUD, I.; MYHRSTAD, M. C.; HERZIG, K. H.; KARHU, T.; DAHL, T. B.; HALVORSEN, B.; ULVEN, S. M.; HOLVEN, K. B. Lack of Effects of a Single High-Fat Meal Enriched with Vegetable n-3 or a Combination of Vegetable and Marine n-3 Fatty Acids on Intestinal Peptide Release and Adipokines in Healthy Female Subjects. **Front Nutr**, v. 3, p. 38, 2016.

PADWAL, R.; KEZOUH, A.; LEVINE, M.; ETMINAN, M. Long-term persistence with orlistat and sibutramine in a population-based cohort. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 10, p. 1567-1570, 2007.

PAIK, Y. H.; SCHWABE, R. F.; BATALLER, R.; RUSSO, M. P.; JOBIN, C.; BRENNER, D. A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1043-1055, 2003.

PARDINA, E.; FERRER, R.; ROSSELL, J.; RICART-JANE, D.; MENDEZ-LARA, K. A.; BAENA-FUSTEGUERAS, J. A.; LECUBE, A.; JULVE, J.; PEINADO-ONSURBE, J. Hepatic CD36 downregulation parallels steatosis improvement in morbidly obese undergoing bariatric surgery. **Int J Obes (Lond)**, v. 41, n. 9, p. 1388-1393, 2017.

PARK, Y. J.; PARK, J.; HUH, J. Y.; HWANG, I.; CHOE, S. S.; KIM, J. B. Regulatory Roles of Invariant Natural Killer T Cells in Adipose Tissue Inflammation: Defenders Against Obesity-Induced Metabolic Complications. **Front Immunol**, v. 9, p. 1311, 2018.

PAYETTE, C.; BLACKBURN, P.; LAMARCHE, B.; TREMBLAY, A.; BERGERON, J.; LEMIEUX, I.; DESPRES, J. P.; COUILLARD, C. Sex differences in postprandial plasma tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and C-reactive protein concentrations. **Metabolism**, v. 58, n. 11, p. 1593-1601, 2009.

QUINTANILHA, B. J.; PINTO FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. M.; NETO, E. C.; SAMPAIO, G. R.; ROGERO, M. M. Circulating plasma microRNAs dysregulation and metabolic endotoxemia induced by a high-fat high-saturated diet. **Clin Nutr**, 2019.

RIBEIRO, M.; MING, C. C.; LOPES, T. I. B.; GRIMALDI, R.; MARSAIOLI, A. J.; GONCALVES, L. A. G. Synthesis of structured lipids containing behenic acid from fully hydrogenated Crambe abyssinica oil by enzymatic interesterification. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 5, p. 1146-1157, 2017.

ROBERTSON, M. D.; JACKSON, K. G.; FIELDING, B. A.; MORGAN, L. M.; WILLIAMS, C. M.; FRAYN, K. N. Acute ingestion of a meal rich in n-3 polyunsaturated fatty acids results in rapid gastric emptying in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 1, p. 232-238, 2002.

ROMON, M.; LEBEL, P.; VELLY, C.; MARECAUX, N.; FRUCHART, J. C.; DALLONGEVILLE, J. Leptin response to carbohydrate or fat meal and association with subsequent satiety and energy intake. **Am J Physiol**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. E855-861, 1999.

ROSA-GONCALVES, P.; MAJEROWICZ, D. Pharmacotherapy of Obesity: Limits and Perspectives. **Am J Cardiovasc Drugs**, 2019.

ROTA, A.; MILANI, C.; CONTIERO, B.; ARTUSI, E.; HOLST, B. S.; ROMAGNOLI, S. Evaluation of serum C-reactive protein concentration as a marker of impending parturition and correlation with progesterone profile in peri-partum bitches. **Anim Reprod Sci**, 2019.

SAUNDERS, K. H.; UMASHANKER, D.; IGEL, L. I.; KUMAR, R. B.; ARONNE, L. J. Obesity Pharmacotherapy. **Med Clin North Am**, v. 102, n. 1, p. 135-148, 2018.

SCHAUER, D. P.; ARTERBURN, D. E.; WISE, R.; BOONE, W.; FISCHER, D.; ECKMAN, M. H. Predictors of bariatric surgery among an interested population. **Surg Obes Relat Dis**, v. 10, n. 3, p. 547-552, 2014.

SHAH, M.; ADAMS-HUET, B.; BRINKLEY, L.; GRUNDY, S. M.; GARG, A. Lipid, glycemic, and insulin responses to meals rich in saturated, cis-monounsaturated, and polyunsaturated (n-3 and n-6) fatty acids in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 12, p. 2993-2998, 2007.

SHARIFNIA, T.; ANTOUN, J.; VERRIERE, T. G.; SUAREZ, G.; WATTACHERIL, J.; WILSON, K. T.; PEEK, R. M., JR.; ABUMRAD, N. N.; FLYNN, C. R. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 309, n. 4, p. G270-278, 2015.

SHENDI, A. M.; DAVIES, N.; DAVENPORT, A. Systemic Endotoxin in Peritoneal Dialysis Patients. **Perit Dial Int**, v. 38, n. 5, p. 381-384, 2018.

SHIBATA, E.; KANNO, T.; TSUCHIYA, A.; KURIBAYASHI, K.; TABATA, C.; NAKANO, T.; NISHIZAKI, T. Free fatty acids inhibit protein tyrosine phosphatase 1B and activate Akt. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 4, p. 871-879, 2013.

SINGH, R. K.; KUMAR, P.; MAHALINGAM, K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **C R Biol**, v. 340, n. 2, p. 87-108, 2017.

STEWART, C. R.; STUART, L. M.; WILKINSON, K.; VAN GILS, J. M.; DENG, J.; HALLE, A.; RAYNER, K. J.; BOYER, L.; ZHONG, R.; FRAZIER, W. A.; LACY-HULBERT, A.; EL KHOURY, J.; GOLENBOCK, D. T.; MOORE, K. J. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 155-161, 2010.

SUNDARESAN, S.; ABUMRAD, N. A. Dietary Lipids Inform the Gut and Brain about Meal Arrival via CD36-Mediated Signal Transduction. **J Nutr**, v. 145, n. 10, p. 2195-2200, 2015.

SZMATOLA, M.; CHROBAK, J.; GRABOWSKI, R.; ILOWSKA, J.; WOCH, J.; SZWACH, I.; SEMENIUK, I.; DRABIK, J.; WRONA, M.; KOZDRACH, R.; ORLINSKA, B.; GRYMEL, M. Spectroscopic Methods in the Evaluation of Modified Vegetable Base Oils from *Crambe abyssinica*. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

TAKE, K.; MOCHIDA, T.; MAKI, T.; SATOMI, Y.; HIRAYAMA, M.; NAKAKARIYA, M.; AMANO, N.; ADACHI, R.; SATO, K.; KITAZAKI, T.; TAKEKAWA, S. Pharmacological Inhibition of

Monoacylglycerol O-Acyltransferase 2 Improves Hyperlipidemia, Obesity, and Diabetes by Change in Intestinal Fat Utilization. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150976, 2016.

TAMRAKAR, A. K.; MAURYA, C. K.; RAI, A. K. PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011 - 2014). **Expert Opin Ther Pat**, v. 24, n. 10, p. 1101-1115, 2014.

TILG, H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Dig Dis**, v. 28, n. 1, p. 179-185, 2010.

VAN DEVENTER, S. J.; KNEPPER, A.; LANDSMAN, J.; LAWSON, J.; TEN CATE, J. W.; BULLER, H. R.; STURK, A.; PAUW, W. Endotoxins in portal blood. **Hepatogastroenterology**, v. 35, n. 5, p. 223-225, 1988.

VOLP, A. C.; ALFENAS RDE, C.; COSTA, N. M.; MINIM, V. P.; STRINGUETA, P. C.; BRESSAN, J. [Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 3, p. 537-549, 2008.

VORS, C.; DRAI, J.; PINEAU, G.; LAVILLE, M.; VIDAL, H.; LAUGERETTE, F.; MICHALSKI, M. C. Emulsifying dietary fat modulates postprandial endotoxemia associated with chylomicronemia in obese men: a pilot randomized crossover study. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 1, p. 97, 2017.

VORS, C.; PINEAU, G.; DRAI, J.; MEUGNIER, E.; PESENTI, S.; LAVILLE, M.; LAUGERETTE, F.; MALPUECH-BRUGERE, C.; VIDAL, H.; MICHALSKI, M. C. Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 9, p. 3427-3435, 2015.

WEBB, D. R.; SANDERS, R. A. Caprenin 1. Digestion, Absorption, and Rearrangement in Thoracic Duct-Cannulated Rats. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 325-340, 1991.

WISNIEWSKI, P. J.; DOWDEN, R. A.; CAMPBELL, S. C. Role of Dietary Lipids in Modulating Inflammation through the Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 2019.

XU; YOU, H. B.; LI, X. H.; CHEN, X. F.; LIU, Z. J.; GONG, J. P. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells. **Am J Surg**, v. 196, n. 1, p. 139-148, 2008.

XU, Y.; ZHANG, Y.; YE, J. IL-6: A Potential Role in Cardiac Metabolic Homeostasis. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 9, 2018.

YAMAZAKI, Y.; KONDO, K.; MAEBA, R.; NISHIMUKAI, M.; NEZU, T.; HARA, H. Proportion of nervonic acid in serum lipids is associated with serum plasmalogen levels and metabolic syndrome. **J Oleo Sci**, v. 63, n. 5, p. 527-537, 2014.

YE, Z.; LI, R.; CAO, C.; XU, Y. J.; CAO, P.; LI, Q.; LIU, Y. Fatty acid profiles of typical dietary lipids after gastrointestinal digestion and absorption: A combination study between in-vitro and in-vivo. **Food Chem**, v. 280, p. 34-44, 2019.

YIMAM, M.; JIAO, P.; HONG, M.; BROWNELL, L.; LEE, Y. C.; HYUN, E. J.; KIM, H. J.; KIM, T. W.; NAM, J. B.; KIM, M. R.; JIA, Q. Appetite Suppression and Antiobesity Effect of a Botanical Composition Composed of *Morus alba*, *Yerba mate*, and *Magnolia officinalis*. **J Obes**, v. 2016, p. 4670818, 2016.

YIMAM, M.; JIAO, P.; HONG, M.; BROWNELL, L.; LEE, Y. C.; KIM, H. J.; NAM, J. B.; KIM, M. R.; JIA, Q. A Botanical Composition from *Morus alba*, *Ilex paraguariensis*, and *Rosmarinus officinalis* for Body Weight Management. **J Med Food**, v. 20, n. 11, p. 1100-1112, 2017.

ZHAO; ETHERTON, T. D.; MARTIN, K. R.; WEST, S. G.; GILLIES, P. J.; KRIS-ETHERTON, P. M. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. **J Nutr**, v. 134, n. 11, p. 2991-2997, 2004.

ZHAO, L.; ZHANG, C.; LUO, X.; WANG, P.; ZHOU, W.; ZHONG, S.; XIE, Y.; JIANG, Y.; YANG, P.; TANG, R.; PAN, Q.; HALL, A. R.; LUONG, T. V.; FAN, J.; VARGHESE, Z.; MOORHEAD, J. F.; PINZANI, M.; CHEN, Y.; RUAN, X. Z. CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol**, v. 69, n. 3, p. 705-717, 2018.

ZHOU, S.; WANG, Y.; JIANG, Y.; ZHANG, Z.; SUN, X.; YU, L. L. Dietary Intake of Structured Lipids with Different Contents of Medium-Chain Fatty Acids on Obesity Prevention in C57BL/6J Mice. **J Food Sci**, v. 82, n. 8, p. 1968-1977, 2017.

8. ANEXO

8.1 ANEXO: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



CEUA
Comitê de Ética no
Uso de Animais



USF
UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista, 27 de Abril de 2017

Projeto de Pesquisa: "Lípídeo estruturado contendo ácido behênico: ações pós-prandiais, a longo prazo e na obesidade".

Área de Conhecimento: Farmacologia

Autor(es): Profª Alessandra Gambero; Reginaldo Marques da Silva; Débora Kono Moreira

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo: 001.03.2017 versão II

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/06/2017- 01/06/2021

Número e Animais: 132 camundongos

Espécie: heterogênicos

Linhagem XXXXX

Peso: 30g

Total de Animais: 132 camundongo

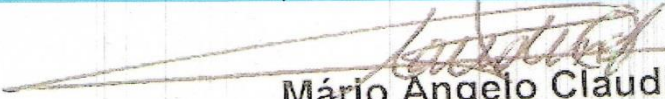
Procedência do Animal: BIOTERIO

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião ordinária no dia 27/04/2017 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado



Mário Angelo Claudino

Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista

Campus Campinas - Unidade Cambuí

Campus Campinas - Unidade Swift

Campus Itatiba

Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825

R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370

R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321

R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015

R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Lípídeo estruturado contendo ácido behênico: ações pós-prandiais, a longo prazo e na obesidade", protocolo nº 001.03.2017 sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Alessandra Gambero, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional e Controle a Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética o Uso de Animais (CEUA da Universidade São Francisco – USF), em reunião do dia 27/04/2017.

Protocolo: 001.03.2017 versão II

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/06/2017- 01/06/2021

Número e Animais: 132 camundongos

Espécie: heterogênicos

Linhagem XXXXX

Peso: 30g

Total de Animais: 132 camundongos

Procedência do Animal: BIOTERIO

Mário Angelo Claudino

Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

8.2 ANEXO: ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AOS RESULTADOS DA TESE

Journal of Functional Foods 58 (2019) 350–354



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Functional Foods

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



The postprandial inflammatory response is attenuated by a dietary structured lipid containing behenic acid

Reginaldo Marques da Silva^a, Débora Kono Taketa Moreira^b, Melina Luzzi Zarricueta^a,
Cíntia Rabelo e Paiva Caria^a, Juliana Alves Macedo^b, Gabriela Alves Macedo^b,
Alessandra Gambero^{c,*}

^a Health Science Post-graduated Program, São Francisco University, Bragança Paulista, SP, Brazil
^b Department of Food and Nutrition, School of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil
^c Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil



ARTICLE INFO	ABSTRACT
Keywords: Interleukin-6 Endotoxemia Saturated very long chain fatty acid C-reactive protein Behenic acid	A high-fat meal can induce a postprandial inflammatory response, characterized mainly by increased serum levels of interleukin (IL)-6 and endotoxemia. We developed a structured lipid rich in behenic acid via enzymatic interesterification of a blend of soy, olive, and fully hydrogenated crambe oil, and evaluated its ability to induce postprandial inflammation in mice. Triglyceride absorption was reduced after consumption of a meal containing 15% of this structured lipid. The postprandial IL-6, lipopolysaccharide (LPS), C-reactive protein, and insulin levels were similar to those in mice that received a low-fat diet. Gastric emptying and satiety hormone serum levels did not differ between the experimental groups. Our data showed that a structured lipid containing behenic acid has a reduced ability to induce postprandial inflammation, suggesting that the introduction of modified dietary fat into a diet could be beneficial for health.