



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

VANESSA CHAIA KAIPPERT

**Influência do genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2 e dos
ácidos graxos polinsaturados na resistência à insulina, insulinemia
e glicemia em mulheres obesas de grau 3, e análise da expressão
do gene em sangue.**

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Vanessa Chaia Kaippert

**Influência do genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2 e dos
ácidos graxos polinsaturados na resistência à insulina, insulinemia
e glicemia em mulheres obesas de grau 3, e análise da expressão
do gene em sangue.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Lopes Rosado

Co-orientadora: Dra. Edna Maria Morais Oliveira

Rio de Janeiro

2008

Kaippert, Vanessa Chaia.

Influência do genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2 e dos ácidos graxos polinsaturados na resistência à insulina, insulinemia e glicemia em mulheres obesas de grau 3, e análise da expressão do gene em sangue / Vanessa Chaia Kaippert - Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Nutrição, 2008. xix, 142 f.: il.

Orientador: Eliane Lopes Rosado

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, 2008.

1. PPAR γ 2 2. Obesidade grau 3 3. Resistência à Insulina 4. Ácidos Graxos polinsaturados 4. análise expressão PPAR γ 2.

I. Rosado, Eliane Lopes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição Josué de Castro. III. Título.

VANESSA CHAIA KAIPPERT

Influência do genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2 e dos ácidos graxos polinsaturados na resistência à insulina, insulinemia e glicemia em mulheres obesas de grau 3, e análise da expressão do gene em sangue.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2008.

Aprovada por:

Presidente da Banca Examinadora - Prof^a Dra. Eliane Lopes Rosado
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Revisora – Prof^a Dra. Glorimar Rosa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a Dra. Cristiana Pedroza
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Suplente – Prof^a Dra. Avany Fernandes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Dedico esta dissertação ao meu marido Enio,
à minha família e aos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e saúde e por proporcionar sentimentos fundamentais como esperança e coragem, com os quais fui capaz de conquistar mais esse objetivo em minha vida. Novamente tive certeza que não devemos nunca desistir de nossos sonhos, e sim lutar para que eles aconteçam.

À minha querida “mãe-avó” Olga Duarte Chaia, que sempre me incentivou a estudar desde a infância, apesar de não ter tido a mesma oportunidade, como sempre almejou. Obrigado pelo amor, pela dedicação e pela lição de vida. Por tudo que você e meu avô fizeram por nós. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu querido avô Elias Duarte Chaia, onde quer que ele esteja, pela educação, amor e dedicação.

Aos meus pais Elmir Duarte e Chaia e Therezinha de Jesus Lourenço Chaia, pelo dom da vida.

Ao meu irmão e sempre amigo Elmir Lourenço Chaia, pelo apoio, pelo amor, pela confiança inesgotável e pelos momentos de descontração que me ajudaram a superar os momentos difíceis.

Ao eterno amor da minha vida, meu marido Enio Kaippert, que foi o grande incentivador para esta conquista. Serei sempre grata pela amizade, paciência, companheirismo, carinho e amor. Agradeço a Deus por tê-lo colocado em minha vida.

A toda minha família e aos meus amigos pelo estímulo e por compreenderem os momentos de ausência... Obrigado pelos momentos intensos e alegres que foram essenciais para diminuir a tensão e ganhar mais força para chegar até aqui.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do curso.

Às voluntárias participantes do projeto que tornaram possível a realização da pesquisa.

À professora, orientadora e sempre amiga Eliane Lopes Rosado, pela confiança, dedicação e paciência, além de estar sempre disposta a ajudar e orientar em todos os momentos.

À querida Edna Maria Morais Oliveira pela confiança, pela ajuda e orientação desde o início da pesquisa. A todos do Laboratório de Organismos Geneticamente Modificados da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial, a Andréa.

À professora Glorimar Rosa, pela amizade, carinho, alegrias e pela colaboração para que todas as análises fossem realizadas.

À grande amiga Sofia Kimi Uehara, que no sentido mais verdadeiro da palavra, esteve ao meu lado em TODOS os momentos da pesquisa. Obrigado pela paciência, pelo apoio, dedicação e incentivo, sobretudo, em tantos momentos decisivos nas análises moleculares.

À Nívea Amoedo, pela paciência, dedicação e pelo apoio durante momentos essenciais das análises moleculares. Serei sempre grata pela amizade e confiança.

À companheira de mestrado Márcia Fófano do Lago, pela amizade e pelos conselhos e incentivos durante o curso.

Às amigas Carla D'Andrea e Juliana Nogueira que foram muito mais que colaboradoras da pesquisa, participando de todos os momentos com tamanha dedicação.

À bolsista Carla Ribeiro, pela colaboração durante a fase inicial e na realização do estudo piloto.

Aos Professores Franklin D. Rumjanek e Marcelo R. Fantappiè por permitirem que realizássemos as análises moleculares em seu laboratório. Esta parceria foi muito importante para a realização do estudo.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do *Schistosoma mansoni* da UFRJ (Fabiana, Gilson, Isabel, Juliana, Marta, Nelson, Paula, Pedro, Vitor e professoras Ana e Andréa), que estavam sempre dispostos a nos ajudar e esclarecer nossas dúvidas.

Ao professor Marcos e a todos do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) UFRJ, em especial a Ana Lúcia, pela realização das análises bioquímicas.

A todos do Hospital de Ipanema que nos ajudaram no estudo piloto, bem como no recrutamento de voluntárias.

À APAE (Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais) que realizou todas as dosagens de insulina.

Ao professor Ronir Raggio Luiz da UFRJ, pela ajuda na análise estatística.

À professora Andréa Ramalho e sua aluna Silvia, bem como Dr. João Regis e Dr. Vinícius do HUCFF/UFRJ pela cessão de tecido adiposo para realização das análises de expressão gênica.

A todas do grupo de pesquisa, coordenado pela professora Glorimar Rosa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudo.

A FAPERJ pela bolsa de iniciação científica.

Ao CENC (Curso de Especialização em Nutrição Clínica) do Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ, pelo apoio financeiro.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA VINCULADA À DISSERTAÇÃO

✓ Trabalhos apresentados e publicados em anais de eventos científicos:

- **CHAIA, V.**; FÓFANO, M.; UEHARA, S.; D'ANDREA, C. L.; ROSADO, E. L. **“Efeito dos ácidos graxos polinsaturados e do genótipo pro12pro no gene PPAR γ 2 na perda de peso e no perfil lipídico de mulheres obesas de grau 3”**. XX Congresso Brasileiro de Nutrição, Maio de 2008, Rio de Janeiro.

- FÓFANO, M.; **CHAIA, V.**; UEHARA, S.; SOEIRO, J. N.; ROSADO, E. L. **“Relação entre perfil lipídico da dieta e lipídios sanguíneos em mulheres obesas de grau 3”**. XX Congresso Brasileiro de Nutrição, Maio de 2008, Rio de Janeiro.

- SOEIRO, J. N.; D'ANDREA, C. L.; ROSADO, E. L.; UEHARA, S. K.; OLIVEIRA, E. M. M.; LAGO, M. F.; **KAIPPERT, V. C.** **“Avaliação do perfil lipídico sanguíneo e dietético de mulheres obesas de grau 3 sem polimorfismo no gene PPAR γ 2”**. XXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, 2007.

- **CHAIA, V.**; ROSADO, E. L.; FÓFANO, M.; RIBEIRO, C.; UEHARA, S. K. **“Efeito dos lipídios dietéticos nos níveis de lipídios sanguíneos em obesas de grau 3”**. XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, Setembro de 2006, São Paulo.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar a influência do genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2 e dos ácidos graxos polinsaturados (AGPI) na resistência à insulina (RI), insulinemia e glicemia, bem como analisar a expressão do gene em sangue de mulheres obesas de grau 3. Foram estudadas 25 mulheres adultas, obesas de grau 3 (IMC ≥ 40 kg/m²) com o genótipo Pro12Pro no gene (técnica da reação em cadeia da DNA polimerase). As mulheres foram divididas em grupos de acordo com a massa corporal (G1: IMC 40 - 45 kg/m², n=17 e G2: IMC > 45 kg/m², n=8) e a ingestão habitual de lipídios totais (IHLT) (GA: IHLT $\leq 30\%$ VET, n=5 e GB: IHLT > 30% VET, n=20). A ingestão alimentar habitual foi determinada pela análise da composição química de registro alimentar de 3 dias. Para análise do efeito agudo da refeição foi oferecido um desjejum (15-20% VET) rico em AGPI da série n-6. Foram realizadas análises bioquímicas (glicose plasmática, insulina sérica, triglicerídios, colesterol total e frações) e antropométricas (peso, estatura e circunferência da cintura) em jejum, e dosagem de glicose e insulina pós-prandiais. Utilizou-se o cálculo de HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) e QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) para avaliação da RI e sensibilidade à insulina (SI). Quanto à análise de expressão do PPAR γ 2, o RNA total foi extraído de amostras de sangue e de tecido adiposo (TA) omental congelado e fresco, utilizando-se kit comercial (QIAamp[®]) ou reagente TRIzol[®], seguido de síntese de cDNA (RT-PCR), onde diferentes concentrações de RNA total foram testadas. A análise de expressão foi realizada por PCR em tempo real, utilizando-se *primers* específicos para cDNA (exon-exon) e sondas *TaqMan*[®] para o gene alvo e o controle endógeno (rRNA 18S humano) com diferentes volumes de cDNA. O grupo com maior massa corporal (G2) apresentou glicemia de jejum alterada, baixa SI (QUICKI = 0,32 \pm 0,03) e RI mais elevada (HOMA-IR = 3,6 \pm 1,8 e 3,2 \pm 2,2, em G2 e G1, respectivamente). Os valores de glicemia pós-prandial encontravam-se normais, porém, observou-se maior pico de insulina 1 hora após a refeição teste (82,2 \pm 53 μ U/mL) em G2, comparado a G1 (61,2 \pm 46,6 μ U/mL). O grupo com ingestão adequada de lipídios (GA) apresentou valores normais de HOMA-IR (2,3 \pm 0,7) e QUICKI (0,34 \pm 0,02). Entretanto, em GB, observaram-se valores maiores ($p < 0,05$) de IMC e HOMA-IR, e de glicose e insulina em todos os tempos de coleta. Verificou-se ingestão mais elevada ($p < 0,05$) de ácidos graxos saturados (AGS) e monoinsaturados (AGMI) em GB, havendo correlação positiva entre IHLT (%) e estes ácidos graxos. Ainda em GB, a IHLT (%) se correlacionou negativamente com a insulina de jejum e a ingestão de AGMI (%) apresentou correlação negativa com glicemia e insulinemia de jejum, e positiva com QUICKI. Portanto, as mulheres com maior massa corporal demonstraram maior RI, sugerindo

diferenças metabólicas importantes entre os grupos de obesas de grau 3. A dieta hiperlipídica rica em AGS contribuiu para o aumento da massa corporal e RI, contudo, a ingestão de AGMI pode ter reduzido o impacto da dieta hiperlipídica no metabolismo da glicose. Sugere-se que mulheres obesas sem o polimorfismo no PPAR γ 2 evitem a dieta hiperlipídica, principalmente rica em AGS, priorizando gorduras insaturadas, especialmente AGMI. O PPAR γ 2 demonstrou amplificação tardia em poucas amostras nos experimentos realizados com sangue, porém, o controle endógeno se manteve constante. Nas amostras de TA congelado, apenas o rRNA 18S apresentou amplificação em todas as amostras. No TA fresco o gene alvo amplificou, independente da quantidade de RNA total utilizada (440 ng e 2 μ g) para cDNA. Resultados semelhantes foram observados para o gene constitutivo. Conclui-se que não foi possível analisar a expressão do PPAR γ 2 em sangue. Porém, a técnica e os reagentes empregados possibilitaram resultados satisfatórios em amostras de TA omental fresco.

Palavras chave: Obesidade de grau 3, resistência à insulina, PPAR γ 2, lipídios, análise de expressão, ácidos graxos polinsaturados n-6.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of Pro12Pro genotype in the PPAR γ 2 gene and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in insulin resistance (IR), insulin and glucose, and analyze the expression of the gene in blood of morbid obese woman. We studied 25 woman adults, morbid obese (BMI > 40 kg/m²) with the Pro12Pro genotype in the gene (Polimerase Reaction Chain). Women were divided in two groups according to body mass (G1: BMI 40 - 45 kg/m², n=17 and G2: BMI > 45 kg/m², n=8) and the habitual intake of total lipids (HITL) (GA: HITL \leq 30% total energetic intake (TEI), n=5 and GB: HITL > 30% TEI, n=20). The usual food intake was determined by analysis of the chemical composition of dietary records of 3 days. For analysis of the acute effect of meal was offered a breakfast (15-20% TEI) rich in n-6 PUFA. Biochemical (plasma glucose, serum insulin, triglycerides, total cholesterol and fractions) and anthropometric (weight, height and waist circumference) analyses were performed in fasting, and assessed of plasma glucose and serum insulin after meal. It was used HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) and QUICKI (Quantitative Check Insulin Sensitivity Index) for evaluation of the IR and insulin sensitivity (IS). In relation to the analyses of PPAR γ 2 expression, the total RNA was extracted from blood samples and frozen and fresh omental adipose tissue (AT), using a commercial kit (QIAamp[®]) or TRIzol[®] reagent, followed by synthesis of cDNA (RT-PCR), where different concentrations of total RNA were tested. The analysis of expression was performed by real-time PCR, using specific primers for cDNA (exon-exon) and TaqMan[®] probes for the target gene and endogenous control (human 18S rRNA) with different amounts of cDNA. The group with higher body mass (G2), showed altered fasting plasma glucose, low IS (QUICKI = 0,32 \pm 0,03) and higher IR (HOMA-IR = 3,6 \pm 1,8 and 3,2 \pm 2,2, in G2 and G1, respectively). The values of glucose after meal were normal, but there was greater peak of insulin 1 hour after the test meal (82,2 \pm 53 μ U/mL) in G2, compared with G1 (61,2 \pm 46,6 μ U/mL). The group with adequate intake of lipids (GA) showed normal values of HOMA-IR (2,3 \pm 0,7) and QUICKI (0,34 \pm 0,02). However, in GB, there were observed higher values (p < 0,05) of BMI and HOMA-IR, and glucose and insulin at all times of collection. There was higher (p < 0,05) intake of saturated (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) in GB, with a positive correlation between HITL (%) and this fatty acids. Also in GB, the HITL (%) was negatively correlated with fasting insulin and AGMI intake (%) showed negative correlation with fasting glucose and insulin, and a positive correlation with QUICKI. Therefore, women with higher body mass showed greater IR, suggesting significant metabolic differences between groups composed of morbid obese woman. The high fat and SFA diet contributed to the increase in body mass

and IR, however, the MUFA intake may have reduced the impact of high fat diet in the glucose metabolism. It is suggested that obese women without the polymorphism in the PPAR γ 2 avoid high fat diet, especially rich in SFA, prioritizing unsaturated fats, particularly MUFA. The PPAR γ 2 shown late amplification in little samples of the experiments performed with blood, however, the endogenous control remained constant. In frozen AT samples, only the 18S rRNA showed amplification in all samples. In fresh AT, the target gene amplified, regardless of the quantity of total RNA used (440 ng and 2 μ g) for cDNA. Similar results were observed for the gene board. It was conclude that it was not possible to analyze the PPAR γ 2 expression in blood. However, the technical and reagents employees allowed satisfactory results on samples of fresh omental AT.

Key works: Morbid obesity, insulin resistance, PPAR γ 2, lipids, analyses of expression, n-6 PUFA.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo da ativação da transcrição por PPAR.	07
 PRIMEIRO ARTIGO	
Quadro 1 – Condições experimentais para a detecção do genótipo Pro12Pro.	46
 Figura 1: Esquema geral de realização do estudo.	 38
 Figura 2: Eletroforese em gel de agarose visualizando o alelo Pro12Pro do gene PPAR γ 2, produto da digestão dos segmentos de DNA amplificados. Coluna 1: marcador (25 a 766 bp); coluna 2: branco; colunas 3 a 9: fragmentos relativos ao genótipo homocigoto Pro12.	 50
 Figura 3: Concentrações de glicose plasmática (mg/dL) e de insulina sérica (μ U/mL) em jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais dos grupos 1 (G1) e 2 (G2).	 52
 Figura 4: Concentrações de glicose plasmática (mg/dL) e de insulina sérica (μ U/mL) em jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais dos grupos A (GA) e B (GB).	 54
 SEGUNDO ARTIGO	
Quadro 1 – Condições experimentais para a detecção do genótipo Pro12Pro.	83
 Figura 1: Esquema para realização da intervenção transversal.	 81

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose visualizando os produtos da PCR do cDNA (51 pb). Coluna 1: marcador (25 a 766 bp); coluna 2: branco; colunas 3 e 4: controles negativos; colunas 5 a 7: amostras jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais, respectivamente. **93**

Figura 3: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análise em duplicata realizada com amostra de cDNA (500 ng de RNA total) sintetizada a partir de sangue integral. **94**

Figura 4: Curvas de amplificação do gene constitutivo rRNA 18S. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng de RNA total) sintetizadas a partir de sangue integral. **95**

Figura 5: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng de RNA total) sintetizadas a partir de sangue integral. **95**

Figura 6: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de sangue integral. **96**

Figura 7: Curvas de amplificação do gene constitutivo rRNA 18S. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental congelado. **97**

Figura 8: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental congelado. **97**

Figura 9: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental fresco. **98**

Figura 10: Curvas de amplificação do gene constitutivo rRNA 18S. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental fresco. **98**

LISTA DE TABELAS

	Página
PRIMEIRO ARTIGO	
Tabela 1: Variáveis antropométricas e bioquímicas (média ± desvio padrão) dos grupos 1 e 2.	50
Tabela 2: Variáveis antropométricas e bioquímicas (média ± desvio padrão) dos grupos A e B.	53
Tabela 3: Composição lipídica da dieta habitual das mulheres dos grupos A e B.	55
Tabela 4: Estimativa dos coeficientes de correlação dos percentuais de ingestão habitual de lipídios, ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), índice de massa corporal (IMC), glicose de jejum (Glic0), insulina de jejum (Ins0), HOMA-IR (<i>Homeostasis Model Assessment</i>) e QUICKI (<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>), dos grupos A e B.	56
SEGUNDO ARTIGO	
Tabela 1: Síntese dos experimentos realizados com amostras de sangue e de TA.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – ácidos graxos
AGMI – ácidos graxos monoinsaturados
AGPI - ácidos graxos polinsaturados
AGS – ácidos graxos saturados
APAE - Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais
CC – circunferência da cintura
cDNA - DNA complementar
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CT - ciclo *threshold*
CQ – circunferência do quadril
DBD – domínio de ligação do receptor ao DNA
DCNT - doenças crônicas não transmissíveis
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatos
DP – desvio padrão
EDTA – ácido dietiltetraaminoacético
EPA - ácido eicosapentaenóico
GLUT-4 – transportador de glicose 4
GS - gordura saturada
HAT - histona acetiltransferase
HDL – lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR - *Homeostasis Model Assessment*
HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF – *International Federation of Diabetes*
IHLT – ingestão habitual de lipídios totais
IMC – índice de massa corporal
INJC - Instituto de Nutrição Josué de castro
LACFAR - Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia
LANUTRI - Laboratório de Avaliação Nutricional
LBD – domínio de ligação do receptor ao ligante
LDL – lipoproteína de baixa densidade

MgCl₂ – cloreto de magnésio
mRNA – RNA mensageiro
OMS – Organização Mundial da Saúde
PGJ2 - prostaglandina da série J2
pb – par de bases
PCR – reação em cadeia da DNA polimerase
PCR-RFLP – reação em cadeia da DNA polimerase, seguida da análise do polimorfismo pelo comprimento dos fragmentos de restrição
POF - Pesquisa de Orçamento Familiar
PPARs - receptores ativados pela proliferação de peroxissomas
PPAR γ 2 - receptor ativado pela proliferação de peroxissomas da isoforma γ e série 2
PPRE - elemento responsivo a proliferadores de peroxissoma
QA - quantificação absoluta
QR - quantificação relativa
QUICKI – *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*
RI – resistência à insulina
RNA – ácido ribonucléico
RT-PCR - PCR-transcriptase reversa
RXR - receptor do ácido 9-*cis* retinóico
rpm – rotações por minuto
SI – sensibilidade à insulina
TA – tecido adiposo
TBE – tampão tris, ácido bórico, EDTA
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG – triglicerídios
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
Tris – tris hidroximetil aminometano
TZDs - tiazolidinedionas
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
VET – valor energético total
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade
WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

	Página
Produção científica vinculada à dissertação	vii
Resumo	viii
Abstract	x
Lista de quadros e figuras	xii
Lista de tabelas	xv
Lista de abreviaturas	xvi
1 – Introdução	1
1.1 – Obesidade	1
1.2 – Genética e obesidade	3
1.3 – Receptores ativados pela proliferação de peroxissomas (PPARs)	4
1.3.1 – Receptor ativado pela proliferação de peroxissomas da isoforma γ série 2 (PPAR γ 2)	6
1.4 – Ácidos graxos dietéticos e obesidade	16
1.5 – Obesidade e resistência à insulina (RI)	17
1.5.1 - Métodos para avaliação da resistência à insulina (RI)	20
1.5.2 – PPAR γ 2 e resistência à insulina (RI)	22
1.6 – Técnica da reação em cadeia da DNA polimerase	23
2 - Justificativa	27
3 – Objetivos	29
3.1 – Geral	29
3.2 - Específicos	29
4 – Casuística, resultados e discussão	30
5 – Conclusões gerais	112

6 – Referências bibliográficas	114
7 – Anexos	129
Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	129
Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	130
Anexo III: Questionário para a coleta de informações das voluntárias	133
Anexo IV: Registro Alimentar	137
Anexo V: Cálculo da dieta teste	138
Anexo VI: Composição química da dieta teste considerando o VET das voluntárias	139

1. Introdução

1.1 – Obesidade

A obesidade se caracteriza pelo acúmulo de lipídios no tecido adiposo (TA), podendo ser decorrente de um desequilíbrio no balanço energético onde a ingestão de energia é superior ao gasto energético (MONTEIRO e HALPERN, 2000). Portanto, o nível deste reservatório tecidual é dependente da ingestão alimentar e do gasto energético, os quais sofrem influência de fatores genéticos e ambientais (WESTERTERP-PLANTEGA *et al.*, 1994).

Atualmente, a obesidade é considerada como um dos mais graves problemas de saúde pública e vem crescendo de forma acentuada inclusive nos países em desenvolvimento, podendo ser considerada como uma epidemia global (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

No Brasil, observa-se que o sobrepeso aumentou de 18,6% para 41%, nos homens, e de 28,6% para 39,2% nas mulheres, comparando-se a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) realizada em 74-75 e 2002-2003, respectivamente. A obesidade passou de 2,8% para 8,8% nos homens, e de 7,8% para 12,7% nas mulheres, segundo a POF 74-75 e 2002-2003, respectivamente (IBGE, 2004).

Esta enfermidade tem sobrecarregado os serviços de saúde com uma demanda crescente para o atendimento de co-morbidades como diabetes não insulino dependente, doenças cardiovasculares e até mesmo alguns tipos de câncer (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

Atualmente, sabe-se da existência da interação gene-ambiente na gênese da obesidade e os fatores genéticos apresentam papel importante na determinação da gordura corporal total (GCT) em resposta a alterações crônicas no balanço energético (PÉRUSSE e BOUCHARD, 2000).

Durante muitos anos o diagnóstico da obesidade era baseado somente no aumento do peso corporal, no entanto, sabendo-se que esta enfermidade é decorrente do excesso de gordura corporal em relação à massa magra, o diagnóstico preciso deve ter como fundamento a avaliação da composição corporal (Documento do Consenso Latino-americano sobre Obesidade, 1999; Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

Dentre os parâmetros antropométricos, os mais recomendados para indivíduos obesos são avaliação de peso corporal, estatura e circunferências, destacando-se as circunferências da cintura (CC) e do quadril (CQ). Com base nos valores de peso corporal e estatura, calcula-se o índice de massa corporal (IMC) (Documento do Consenso Latino-americano sobre Obesidade, 1999).

Embora o IMC não permita avaliar a distribuição da gordura corporal, é considerado um método útil para o diagnóstico da obesidade na população, além de permitir associações com o risco de co-morbidades de acordo com a sua classificação (Documento do Consenso Latino-americano sobre Obesidade, 1999; DUARTE & CASTELLANI, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), indivíduos com obesidade grau 3 ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) apresentam risco muito alto para o desenvolvimento de co-morbidades (WHO, 1995).

A associação do IMC com outros métodos, como a aferição da CC, é capaz de minimizar as limitações deste método em relação à distribuição de gordura corporal (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

A CC é um método estimativo da gordura intra-abdominal que visa avaliar o risco de alterações metabólicas associadas à obesidade como doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (Documento do Consenso Latino-Americano sobre Obesidade, 1999; DESPRÉS *et al.*, 2001; Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2005), para países sul-americanos se devem considerar os valores de referência estabelecidos para sul-asiáticos até que sejam disponibilizadas referências

específicas para estes países, sendo 90 cm para homens e 80 cm para mulheres, respectivamente.

1.2 – Genética e obesidade

Na gênese da obesidade estão envolvidos aspectos relacionados ao estilo de vida, como a dieta e o exercício físico, alterações neuro-endócrinas e o componente hereditário. Sendo este último um fator determinante para o desenvolvimento de outras doenças crônicas além da obesidade, como o diabetes mellitus, a osteoporose, a hipertensão arterial sistêmica, o câncer, dentre outras (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004).

A influência genética na obesidade é bastante complexa, visto que é determinada pela interação de vários genes (poligênica) (FROGUEL e BOUTIN, 2001; FAROOQI e O'RAHILLY, 2007). Conforme destacado por Cecil *et al.* (2006), as formas mais comuns de sobrepeso e obesidade observadas na população em geral são de origem poligênica e, além disso, envolvem interações complexas entre diferentes genes e entre genes e fatores ambientais, como consequência, há a ocorrência de fenótipos de obesidade multifatoriais.

Estudos de biologia molecular que utilizaram diferentes metodologias identificaram mais de 430 genes, além de diversos marcadores genéticos envolvidos na obesidade. Ademais, estes genes podem agir de várias formas, ou seja, podem afetar o controle do apetite, o gasto energético e a regulação termogênica, a utilização metabólica de combustíveis e a sinalização, como é o caso do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR) (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004).

Segundo Marques-Lopes *et al.* (2004), alguns genes têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, como o gene que codifica a leptina e seu receptor, as proteínas desacopladoras (UCP 2 e 3), moléculas envolvidas na diferenciação de adipócitos e transporte de lipídios (PPAR e aP2), e ainda substâncias relacionadas ao metabolismo, como adenosina

desaminase, fosfatase ácida, fator de necrose tumoral (TNF- α), neuropeptídios hipotalâmicos e seus receptores (receptores 3, 4 e 5 da melanocortina, pró-ópio-melanocortina e neuropeptídeo y) e receptores adrenérgicos (β 2 e β 3).

1.3 – Receptores ativados pela proliferação de peroxissomas (PPARs)

Vários genes que regulam o metabolismo no adipócito podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento da obesidade. Entre os genes candidatos, o receptor ativado pela proliferação de peroxissomas da isoforma γ e série 2 (PPAR γ 2) tem si destacado, estando este relacionado a adipogênese (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1999; KERSTEN *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2005; CECIL *et al.*, 2006) e à sensibilidade à insulina (SI) (DEEB *et al.*, 1998; KUBOTA *et al.*, 1999; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; PIHLAJAMAKI *et al.*, 2000; ZEGHARI *et al.*, 2000; STUMVOLL *et al.*, 2001; VERMA *et al.*, 2004).

Os PPARs foram os primeiros receptores clonados de uma superfamília de receptores hormonais nucleares (GROMMES *et al.*, 2004).

Os PPARs são fatores de transcrição que constituem uma sub-família de três isoformas: PPAR α , PPAR γ e PPAR β/δ . Estes fatores de transcrição exercem funções essenciais na regulação do metabolismo lipídico, variando de acordo com o tipo celular envolvido (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KANUNFRE, 2002; GROMMES *et al.*, 2004).

O PPAR γ está presente em dois subtipos, isto é, γ 1 e γ 2, ambos derivados do mesmo gene. A série γ 2 possui um adicional de 30 aminoácidos na extremidade N-terminal (MUELLER *et al.*, 2002), desta forma, seu domínio de ativação ligante independente é cinco vezes mais efetivo que o domínio de ativação ligante independente do PPAR γ 1 (GROMMES *et al.*, 2004).

Mais recentemente, identificou-se a série $\gamma 3$, a qual é responsável pela tradução de uma proteína diferente da gerada pelo PPAR $\gamma 1$, sendo expressa no cólon e no TA (KANUNFRE, 2002).

O receptor PPAR $\gamma 1$ é expresso nos adipócitos em altos níveis e em outros tecidos (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996, 1997; AUBOEUF *et al.*, 1997; MUELLER *et al.*, 2002), enquanto que a expressão do PPAR $\gamma 2$ ocorre principalmente no TA, correspondendo a aproximadamente 15% dos ácidos ribonucléicos (RNAs) mensageiros (mRNAs) totais da isoforma γ (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; AUBOEUF *et al.*, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999; CHAMBRIER *et al.*, 2002). A série 2 está relacionada ao diabetes mellitus tipo 2 e à obesidade, ambos fenótipos complexos determinados pela combinação de múltiplos fatores genéticos e ambientais (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996, 1997; CLEMENT *et al.*, 2000).

Como destacado por Spurlock *et al.* (2000), é possível que não existam diferenças funcionais entre os subtipos $\gamma 1$ e $\gamma 2$, contudo, a série 2 tem sido exaustivamente estudada por ser altamente expressa no TA comparado a outros tecidos, além de estar associada com a diferenciação dos adipócitos.

Segundo Mueller *et al.* (2002) ambas são capazes de desencadear a adipogênese, levam à expressão de um perfil genético similar e demonstram resposta semelhante à insulina. Todavia, na presença de baixas concentrações de ligante, o PPAR $\gamma 2$ apresenta maior capacidade para induzir a lipogênese.

Em sua revisão, Sharma e Staels (2006) destacaram que a isoforma γ do gene PPAR está presente em uma grande variedade de tecidos e que os subtipos $\gamma 1$ e $\gamma 2$ são expressos em altos níveis em adipócitos e em macrófagos.

Estudo recente demonstrou a expressão específica de PPAR $\gamma 2$ em lesões ateroscleróticas humanas, assim como em macrófagos primários e em células espumosas (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2004).

1.3.1 – Receptor ativado pela proliferação de peroxissomas da isoforma γ série 2 (PPAR γ 2)

A maior parte dos genes ativados pelo PPAR γ 2 codifica proteínas diretamente envolvidas nas vias lipogênicas, incluindo a lipase lipoprotéica (LPL), proteína que media a entrada de ácidos graxos (AG) na célula; a proteína adipocitária de união do ácido graxo; a acil-CoA sintetase, que cataliza a ativação dos ácidos graxos antes de sua esterificação a glicerol; a fosfoenolpiruvato carboquinase, associada com a produção de glicerol para a síntese de triglicerídios (TG); e o GLUT-4 (transportador de glicose 4), que media a entrada de glicose nos adipócitos estimulada pela insulina (DEVERGNE e WAHL, 1999).

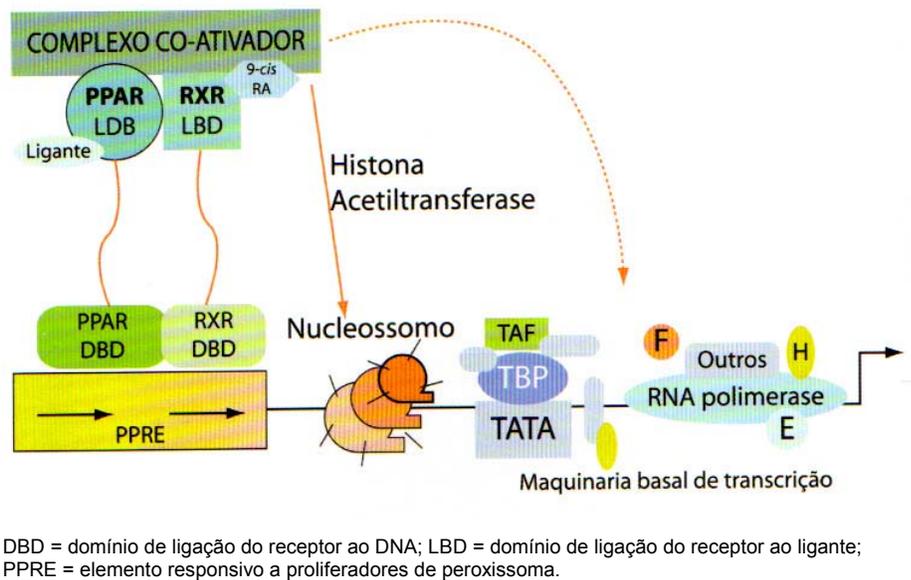
O PPAR γ 2 influencia a reserva de AG no TA participando na diferenciação dos adipócitos, por meio da indução da maturação dos pré-adipócitos em células adiposas maduras (GREGOIRE *et al.*, 1998; RIEUSSET *et al.*, 1999; KERSTEN *et al.*, 2000). Ademais, participa da hipertrofia dos adipócitos, atua estimulando a hidrólise dos TG circulantes que culmina na entrada dos AG nas células adiposas, além de estimular a ligação e ativação dos AG do citossol, eventos estes necessários para a síntese de TG (KUBOTA *et al.*, 1999; KERSTEN *et al.*, 2000).

A ativação do PPAR γ induz a expressão de enzimas envolvidas na captação e no transporte de AG, levando a um aumento no armazenamento de gorduras nos adipócitos e, conseqüentemente, menor concentração de AG livres plasmáticos. Desta forma, ocorre menor deposição de gordura e efeito tóxico desta no fígado e no tecido muscular, proporcionado um aumento na SI nestes tecidos. Tais mecanismos são responsáveis pelas ações antidiabéticas e hipolipemiantes dos seus agonistas sintéticos principais, as tiazolidinedionas (TZDs) (ANAYA e ARIZA, 2004).

Como não necessitam da ativação de cascatas de segundos mensageiros, como ocorre com os receptores de membrana, os receptores intracelulares são considerados fatores de

transcrição, pois atuam diretamente na região promotora dos genes-alvo (KANUNFRE, 2002).

Para que possa agir como fator de transcrição os PPARs precisam formar um heterodímero com outro receptor nuclear, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR), completada a dimerização, o complexo gerado torna-se capaz de se ligar ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE) que está localizado na região promotora dos genes alvos. Ocorre o recrutamento de proteínas co-ativadoras, gerando aumento da atividade transcrricional, por meio da atividade de histona acetiltransferase (HAT) dos co-ativadores, ou por sua interação direta com a maquinaria basal de transcrição (ROSEN *et al.*, 2000; KANUNFRE, 2002) (Figura 1).



Adaptado de Kanunfre (2002).

Figura 1. Mecanismo da ativação da transcrição por PPAR.

Os ligantes endógenos ou naturais do gene incluem ácidos graxos polinsaturados (AGPI) de cadeia longa, derivados de eicosanóides e lipídios oxidados. Além de ligantes sintéticos como drogas hipolipemiantes e antidiabéticas, destacando-se as TZDs

(troglitazona, ciglitazona, rosiglitazona e pioglitazona), que possuem alta afinidade pelo PPAR γ (KERSTEN *et al.*, 2000; ROSEN *et al.*, 2000; KANUNFRE, 2002; GROMMES *et al.*, 2004; PÉGORIER *et al.*, 2004).

As prostaglandinas da série J são consideradas ligantes do PPAR γ e o metabólito da prostaglandina J2 (PGJ2), a 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15-deoxi PGJ₂) é considerado o ligante natural mais potente desta isoforma (FORMAN *et al.*, 1995; KLIEWER, *et al.*, 1995). Os ácidos graxos essenciais, mais especificamente o linoléico, são precursores das PGJ₂, potentes ligantes do PPAR γ (PALOU, 1998).

Os AG, alguns hormônios e vitaminas são considerados ligantes ou agonistas lipofílicos, isto é, moléculas sinalizadoras extracelulares capazes de atravessar a membrana celular por difusão simples ou facilitada e se ligar a receptores intracelulares, como é o caso dos PPARs (KANUNFRE, 2002).

Estudos têm demonstrado que a insulina também é capaz de participar no controle da expressão do PPAR γ (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999).

Vidal-Puig *et al.* (1996) constataram que animais com deficiência de insulina apresentavam redução importante na expressão de PPAR γ (séries 1 e 2), no entanto, a administração de insulina foi capaz de restaurar os níveis de mRNA, alcançando valores próximos aos de ratos normais.

Os efeitos do jejum e da realimentação na expressão de PPAR γ 1 e γ 2 também foram investigados nas amostras de TA dos ratos. A privação de alimentos (jejum de 12 a 48 horas) foi associada à queda significativa na expressão do PPAR γ 2, inclusive nos animais obesos (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996).

Segundo Vidal-Puig *et al.* (1996), a insulina é capaz de regular diferentes caminhos para a utilização de AG pela ativação ou inativação de diferentes membros da família dos PPARs em tecidos distintos. No estado de alimentação, este hormônio estimula a expressão de

PPAR γ no TA e inibe a expressão hepática de PPAR α . No jejum, assim como na deficiência de insulina, há uma diminuição na expressão de PPAR γ nos adipócitos, enquanto que no fígado a isoforma α induz a expressão de enzimas envolvidas na oxidação de AG.

Análises realizadas em hepatócitos de ratos mostraram que tanto a insulina como o ácido oléico foram capazes de aumentar a expressão do gene PPAR γ 2, contudo, a quantidade de mRNA de PPAR γ 1 permaneceu inalterada (EDVARDSSON *et al.*, 2006).

Conforme demonstrado por Memon *et al.* (2000), a expressão hepática do PPAR γ se encontra aumentada em três modelos experimentais de obesidade. O tratamento de ratos *ob/ob* com ligantes sintéticos induziu a expressão hepática de genes responsivos ao PPAR γ (*fatty acid-binding protein* (aP2), *fatty acid translocase* (FAT/CD36) e *uncoupling protein 2* (UCP2)). Esta descoberta reforça a hipótese de que os efeitos dos agonistas deste receptor no metabolismo lipídico podem ser mediados parcialmente por seus efeitos no fígado.

Apesar da capacidade de ativação do PPAR γ pelos agonistas citados anteriormente, a composição da membrana plasmática, que sofre alterações por fatores genéticos e nutricionais, também é capaz de influenciar a atividade deste gene e, conseqüentemente, a SI dos adipócitos (ZEGHARI *et al.*, 2000).

Estudos prévios envolvendo roedores confirmam que a expressão do gene PPAR γ é regulada *in vivo* por dietas ricas em gordura (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; REDONNET *et al.*, 2001; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004).

Após a administração de uma dieta de cafeteria (60% de lipídios) a curto prazo (15 dias) em ratos, Rodríguez *et al.* (2004) investigaram os efeitos desta na expressão de fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o PPAR γ 2, nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo. Foram observados aumentos no peso corporal, no TA e nas concentrações de lipídios séricos, sendo que o incremento na adiposidade foi mais relacionado ao TA visceral devido a expressão elevada de fatores de transcrição adipogênicos, com destaque para o PPAR γ 2.

Resultados semelhantes foram encontrados por Redonnet *et al.* (2001). Após a administração de uma dieta de cafeteria (60% de lipídios) por 28 dias, os animais apresentaram aumento significativo nos níveis de mRNA de PPAR γ 2 no TA branco. Os resultados deste estudo demonstraram que uma dieta rica em gorduras pode induzir modificações precoces no padrão de expressão deste e de outros receptores nucleares.

Os efeitos dos ácidos graxos saturados (AGS) e polinsaturados na expressão dos genes PPAR γ 1 e PPAR γ 2 em adipócitos foram investigados por Spurlock *et al.* (2000). Os animais que receberam dieta suplementada com óleo de açafrão (cerca de 80% de ácido linoléico – 18:2n-6) apresentaram níveis de mRNA de PPAR γ 2 quadruplicados em relação ao grupo controle, todavia, a expressão do PPAR γ 1 não sofreu alterações.

Entre os vários ligantes do PPAR γ 2, os AGPI têm sido destacados, confirmando que o fator ambiental pode efetivamente influenciar na ação do gene (TONTONOZ *et al.*, 1994; KERSTEN *et al.*, 2000; LUAN *et al.*, 2001; CHAMBRIER *et al.*, 2002; HOUSEKNECHT *et al.*, 2002). Portanto, a regulação da expressão gênica pode influenciar a composição corporal e a SI, dependendo do tipo de lipídio ingerido.

A fim de confirmar a possível associação da obesidade com a expressão anormal de PPAR γ no TA, Vidal-Puig *et al.* (1997) quantificaram o mRNA deste gene no TA subcutâneo de indivíduos eutróficos e de obesos mórbidos. Verificou-se que a expressão de PPAR γ 2 estava aumentada nos indivíduos obesos e que a relação PPAR γ 2/ γ 1 era diretamente relacionada ao IMC. Os autores submeteram sete indivíduos obesos a uma dieta com alta restrição energética (800 calorias) e avaliaram novamente a expressão de PPAR γ 2 após apresentarem perda de 10% do peso corporal inicial. Ao final da intervenção dietética, os níveis médios de expressão foram reduzidos em 25%, entretanto, retornaram aos valores pré-tratamento após quatro semanas de manutenção do peso.

Em contraste a Vidal-Puig *et al.* (1997), outros autores não verificaram associação entre expressão do PPAR ($\gamma_1 + \gamma_2$) no TA subcutâneo abdominal e IMC (RIEUSSET *et al.*, 1999; ZEGHARI *et al.*, 2000).

Para determinar os efeitos da resistência à insulina (RI) associada obesidade, Gayet *et al.* (2007) analisaram a expressão do PPAR γ e de alguns de seus genes alvos em cães magros e após obesidade instalada. Observou-se que os níveis de mRNA do PPAR γ no TA visceral e no músculo esquelético foram aproximadamente duas vezes menor nos cães obesos e resistentes à insulina, comparados ao estado de magreza e SI. Semelhantemente, foi encontrada uma redução no mRNA do PPAR γ no TA subcutâneo dos cães obesos, porém, sem significância estatística. Em conclusão, os autores demonstraram uma correlação negativa entre IMC e expressão do PPAR γ .

Resultados semelhantes foram observados por Montague *et al.* (1998). Os autores verificaram correlação inversa altamente significativa entre IMC e expressão do PPAR γ em adipócitos em humanos, com destaque para os adipócitos isolados da região abdominal subcutânea.

Similarmente, Verreth *et al.* (2004) demonstraram que ratos obesos resistentes à insulina apresentavam menor expressão do gene PPAR (α e γ), em relação a ratos magros. A restrição dietética levou ao aumento da expressão de ambas isoformas no tecido adiposo, estando relacionado à expressão aumentada de genes responsáveis pelo transporte da glicose e SI, redução da hipertrigliceridemia, redução do estresse oxidativo e inflamação, melhora da função cardiovascular e aterosclerose reduzida.

Sewter *et al.* (2002) investigaram a relação entre IMC e expressão da isoforma γ do gene PPAR em adipócitos humanos maduros. Os níveis de mRNA do PPAR γ_1 estavam reduzidos em indivíduos com obesidade mórbida quando comparados aos de IMC normal. Quanto à expressão de mRNA do PPAR γ_2 , constatou-se um aumento significativo nos

indivíduos com obesidade mórbida, de forma semelhante ao estudo de Vidal-Puig *et al.* (1997). Os autores concluíram que a relação inversa observada entre IMC e expressão do PPAR γ 1 pode ser decorrente de um mecanismo limitante para a expansão dos adipócitos. Por outro lado, o aumento observado no PPAR γ 2 reflete um efeito patogênico potencial desta isoforma para a promoção da deposição de gordura corporal, reforçando o papel específico que exerce na adipogênese.

Ao analisar os níveis de mRNA do PPAR γ no TA subcutâneo abdominal de mulheres com IMC normal (grupo controle) e obesas (em fase de ganho ou de perda de peso), Redonnet *et al.* (2002) obtiveram uma correlação positiva entre mRNA do PPAR γ (total) e IMC em todas as voluntárias (grupo controle e obesas), entretanto, não houve correlação entre as obesas, quando analisadas separadamente. A expressão de PPAR γ foi 125% mais alta nas mulheres obesas em fase de ganho de peso e apenas 30% mais elevada nas que apresentavam perda de peso, em relação ao grupo controle.

Como citado por alguns autores (CHAMBRIER *et al.*, 2002; REDONNET *et al.*, 2002; SEWTER *et al.*, 2002), estudos que avaliaram a relação entre adiposidade e expressão do PPAR γ no TA têm demonstrado resultados conflitantes.

Muitos variantes genéticos do PPAR γ 2 têm sido identificados, entre estes, o polimorfismo Pro12Ala, que é altamente prevalente em populações caucasianas (BUZZETTI *et al.*, 2004) e vem sendo largamente estudado nos últimos anos. Este polimorfismo é caracterizado pela substituição do aminoácido prolina pela alanina na posição 12 (Pro12Ala e Ala12Ala). Pesquisadores têm buscado elucidar os efeitos deste polimorfismo no PPAR γ 2, entretanto, os resultados permanecem sem consenso.

Em seus estudos, Valve *et al.* (1999), Luan *et al.* (2001) e Meirhaeghe *et al.* (2000) verificaram a associação entre o gene PPAR γ 2 e a obesidade grave, representada pelo aumento do IMC. Porém, destacaram que pesquisas realizadas com o variante Pro12Ala têm

mostrado resultados controversos. Vaccaro *et al.* (2000) concluíram que este polimorfismo não é o principal determinante da obesidade grave em caucasianos, apesar de contribuir para o surgimento da obesidade precoce. De forma semelhante, Oh *et al.* (2000) não encontraram associação entre a forma heterozigota do polimorfismo e a ocorrência de obesidade e de diabetes mellitus em coreanos.

Evans *et al.* (2000) também observaram que o variante Pro12Ala não é o principal responsável pela ocorrência de obesidade mórbida, tendo em vista que a frequência deste polimorfismo não diferiu significativamente entre pacientes obesos mórbidos (n=200) e controles (n=192).

Porém, alguns autores, em estudos com humanos, associam o polimorfismo com o aumento do peso corporal e da CC (BEAMER *et al.*, 1998; COLE *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; ROBITAILLE *et al.*, 2003). Ao contrário, Deeb *et al.* (1998), relataram que o alelo Pro12Ala está associado com menor IMC e maior SI, refletindo provavelmente menor atividade transcricional do PPAR γ e, conseqüentemente, menor acúmulo de TA, que parece ser o fator responsável pelos efeitos positivos na SI.

Semelhantemente ao estudo de Deeb *et al.* (1998), Masugi *et al.* (2000) propuseram que a forma heterozigota pode estar associada com a redução da atividade transcricional, levando a um prejuízo na adipogênese, além de alterações na SI.

Em uma amostra composta por italianos (n=1.215), Buzzetti *et al.* (2004) demonstraram que o variante X12Ala (Pro12Ala ou Ala12Ala) está significativamente associado com melhor SI, contudo, não foi observada uma interação significativa entre IMC e o polimorfismo.

A possível associação entre o polimorfismo do gene PPAR γ com fenótipos da obesidade foi investigada em um estudo envolvendo brasileiros de descendência européia (n=335), com valores de IMC entre 16,2 e 42,4 kg/m². Não houve diferença estatística quanto

ao genótipo dos indivíduos de IMC adequado, com sobrepeso ou obesidade e a frequência do alelo Ala foi de 0,09. Dentre os homens, verificou-se uma associação positiva entre o polimorfismo Pro12Ala e IMC, contudo, a associação não foi detectada nas mulheres (MATTEVI *et al.*, 2007).

Em um estudo caso-controle envolvendo japoneses não-diabéticos (n=541) e diabéticos (n=415), Hara *et al.* (2000) constataram que os indivíduos com sobrepeso ou obesidade que possuíam o alelo Ala eram mais sensíveis à insulina. Além disso, a frequência do variante foi significativamente menor no grupo de diabéticos.

Na população brasileira, Tavares *et al.* (2005) também verificaram que os indivíduos que possuíam o alelo Ala apresentavam maior SI, quando comparados aos indivíduos sem o polimorfismo, contudo, não houve diferença na frequência do alelo Ala entre diabéticos do tipo 2 e o grupo controle.

As associações entre o polimorfismo Pro12Ala e a prevalência de diabetes mellitus tipo 2, o padrão de RI e a possível interação entre os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) dietéticos e este polimorfismo foram investigadas por Soriguer *et al.* (2006) em 538 indivíduos do sul da Espanha. Foi encontrada prevalência de 13,4% para o variante heterozigoto (Pro12Ala) e de 0,8% para a forma homozigota (Ala12Ala). Os indivíduos com o alelo Ala apresentaram menor risco para o diabetes mellitus tipo 2 e houve uma interação entre a ingestão de AGMI e o polimorfismo Pro12Ala, sendo que os obesos com o variante do gene que consumiam menos AGMI demonstraram maior RI segundo HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*). Tal fato sugere uma interação entre o polimorfismo e a obesidade dependendo da dieta.

Em outro estudo desenvolvido na Espanha (dados não publicados), observou-se relação inversa entre o IMC e a ingestão de lipídios em mulheres com o genótipo Pro12Ala/Ala12Ala. A presença do alelo Ala sugeriu aumento na oxidação lipídica,

comparado com o alelo Pro, dependendo da ingestão lipídica, principalmente de AGPI. Os autores sugeriram que as mulheres com polimorfismo no gene apresentavam maior capacidade de oxidação de lipídios, auxiliando no controle da obesidade, e que a lipólise depende do tipo de ácido graxo ingerido. Também os autores observaram que as mulheres com polimorfismo com menor ingestão de AGMI e maior de AGPI apresentaram maior oxidação de lipídios em jejum, sugerindo que os AGPI apresentaram prioridade oxidativa nessas mulheres.

Cecil *et al.* (2006) encontraram associação entre o alelo Pro12Ala e incidência reduzida de obesidade, além de forte associação entre a variação no gene e o percentual de gordura corporal em crianças antes da puberdade. Contudo, este polimorfismo demonstrou efeitos opostos em relação ao crescimento, pois estava associado à utilização energética deficiente, refletindo em crescimento reduzido.

O efeito do polimorfismo Pro12Ala na expressão de genes alvo do PPAR γ foi estudado em amostras de TA de indivíduos com obesidade mórbida (n=30). Os resultados não demonstraram alterações importantes nos níveis de mRNA dos genes alvo do PPAR γ conforme o genótipo dos indivíduos, sugerindo que este tipo de polimorfismo tenha pouca influência na função dos adipócitos de pacientes com obesidade mórbida. Contudo, os autores ressaltaram que o genótipo Ala12Ala, o qual não foi identificado na amostra em questão, possa causar diferenças mais significativas na atividade transcricional deste gene (KOLEHMAINEN *et al.*, 2003).

Apesar da falta de consensos nesta área, muitos estudos apontam que o alelo Ala confere efeitos protetores para o desenvolvimento da obesidade, do diabetes mellitus tipo 2 e da RI (CECIL *et al.*, 2006).

Os resultados controversos das pesquisas podem ser atribuídos a diferentes aspectos quanto à heterogeneidade das populações estudadas, destacando-se fenótipos clínicos como

magreza e obesidade; tipo de estudo; população em questão e aspectos clínicos desta (BUZZETTI *et al.*, 2004); fatores nutricionais (ROBITAILLE *et al.*, 2003); composição lipídica da dieta, destacando-se a relação entre gordura polinsaturada e saturada (LUAN *et al.*, 2001); interações gene-gene ou gene-ambiente (CECIL *et al.*, 2006; SORIGUER *et al.*, 2006), dentre outros. Tais fatores reforçam a idéia de que novos estudos são necessários, além de uma análise criteriosa dos resultados obtidos.

1.4 – Ácidos graxos dietéticos e obesidade

Os AG são nutrientes importantes da dieta, pois além do fornecimento de energia podem ligar-se covalentemente a proteínas, agir como precursores de moléculas sinalizadoras (prostanóides e esteróides) e até mesmo influenciar a expressão de genes levando a alterações no metabolismo, na diferenciação e no crescimento celulares (KANUNFRE, 2002).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004) mostram que os brasileiros aumentaram a ingestão de lipídios de 27,77% para 30,52%, comparando-se a POF 74-75 com a POF 2002-2003. Tal fato, associado à redução da atividade física pode explicar, em parte, o aumento da obesidade observado nos últimos anos.

Segundo Westerterp-Plantega (1998) indivíduos obesos apresentam tendência a consumir maior quantidade de alimentos de alta densidade energética, principalmente com alto conteúdo de lipídios, quando comparados com indivíduos não obesos, e este conteúdo de lipídios tem efeito na gordura corporal. Adicionalmente, dietas ricas em lipídios podem promover maior desejo de comer, comparadas às dietas ricas em sacarose (RABEN e ASTRUP, 2000; PRENTICE e JEBB, 2003).

O grau de saturação dos ácidos graxos também exerce influência na sensação de saciedade. Lawton *et al.* (2000) demonstraram que os AGPI podem exercer um controle do apetite mais intenso que os AGMI e os AGS.

Estudos que não envolveram parâmetros moleculares observaram que os AGS estão fortemente relacionados com o desenvolvimento da obesidade e da RI, o que não ocorre com os AGPI. Isso ocorre, pois os AGS são pobremente oxidados para gerar energia, sendo estocados, são dificilmente mobilizados por estímulo lipolítico e aumentam a expressão dos genes associados com a proliferação dos adipócitos. Por outro lado, os AGPI possuem efeitos contrários, melhorando a ação da insulina e reduzindo a adiposidade (STORLIEN *et al.*, 2000). Neste aspecto, se considerarmos a interação gene-ambiente, a ingestão de AGPI pode resultar em efeitos diferenciados, dependendo do genótipo do indivíduo.

Em sua revisão, Riccardi *et al.* (2004) destacaram que a ausência de relação entre consumo de gordura polinsaturada e marcadores de SI pode depender da dificuldade na avaliação da ingestão de gordura insaturada por recordatórios dietéticos. Estudos com humanos que utilizaram marcadores objetivos da ingestão lipídica, incluindo avaliações do perfil de ácidos graxos séricos e musculares, demonstraram consistentemente que a ingestão de gordura insaturada, determinada pela proporção mais alta de ácidos graxos insaturados no plasma ou músculo, está associada com uma melhor SI.

Conforme demonstrado por Saravanan *et al.* (2005) em estudo experimental, os AGS e os ácidos graxos *trans* dietéticos alteram a expressão de diferentes genes associados à SI no TA.

1.5 – Obesidade e resistência à insulina (RI)

A RI é caracterizada pela diminuição da eficácia da insulina em estimular a captação de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo (CARPENTIER *et al.*, 2006).

A obesidade do tipo visceral está fortemente associada à ocorrência de RI, a qual predispõe o indivíduo a diversas morbidades, incluindo hipertensão arterial, diabetes mellitus do tipo 2, dislipidemias, cardiopatia isquêmica, além de propiciar uma maior atividade

aterogênica generalizada (Documento do Consenso Latino-americano sobre Obesidade, 1999; Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

O excesso de peso corporal está associado ao diabetes mellitus tipo 2, pois o acúmulo de gordura abdominal favorece o aumento de ácidos graxos livres plasmáticos desencadeando efeitos negativos na SI muscular, hepática e no TA. Inicialmente, há um prejuízo na tolerância à glicose estimulando as células β pancreáticas a produzir mais insulina a fim de compensar esta intolerância desencadeando um estado de hiperinsulinemia. Em determinado momento começa a ocorrer um dano às células β , que culmina em deficiência ou ausência de insulina instalando a hiperglicemia e o diabetes (SHEEN, 2000; LENHARD e GOTTSCHALK, 2002; CARPENTIER *et al.*, 2006). Logo, o diabetes mellitus do tipo 2 se desenvolve quando a insulina produzida é insuficiente para superar a resistência aumentada a sua ação (WHO, 2003).

Durante o quadro de hiperinsulinemia pode ocorrer um aumento na ingestão alimentar, devido à redução da glicose sanguínea. Receptores de insulina presentes em regiões do cérebro, especialmente no núcleo arqueado do hipotálamo, são importantes controladores da homeostase energética (WOODS e SEELEY, 2000).

A obesidade constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (LENHARD e GOTTSCHALK, 2002), que resulta de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (WHO, 2003), sendo que a grande maioria dos casos é de caráter poligênico (REIS E VELHO, 2002).

Projeções indicam que o número de diabéticos irá saltar para 300 milhões em 2025 (SEIDELL, 2000; WHO, 2003). Vale ressaltar que os casos de diabetes mellitus tipo 2 constituem 90% de todos os diabéticos, ou seja, apenas 10% destes sofrem de diabetes mellitus tipo 1 e entre os do tipo 2, 80% apresentam excesso de peso corporal (WESTERTEP-PLANTEGA *et al.*, 1994).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), os países com maior incremento na prevalência desta morbidade são as que apresentaram maiores alterações dietéticas, com dietas de alta densidade energética, ricas em AGS e pobres em fibras, além da redução do nível de exercícios físicos e do aumento de sobrepeso e obesidade.

Embora os fatores genéticos exerçam forte influência no desenvolvimento da RI, tanto a dieta como o estilo de vida exerce um importante papel na etiologia desta morbidade (SCHEEN, 2000; SEIDELL, 2000; LENHARD e GOTTSCHALK, 2002; SARAVANAN *et al.*, 2005).

Quanto à influência dietética, merecem destaque a qualidade e quantidade dos lipídios da dieta (BISSCHOP *et al.*, 2001; LENHARD e GOTTSCHALK, 2002). Como ressaltado pela OMS, a alta ingestão de AGS tem sido associada com aumento do risco para intolerância à glicose e altas concentrações de glicemia e insulinemia de jejum, em contrapartida, os AGPI têm demonstrado associação com risco reduzido para o diabetes mellitus tipo 2, além de menores concentrações de glicose em jejum (WHO, 2003).

Em um estudo experimental, a suplementação com ácido eicosapentaenóico (EPA) durante cinco semanas exibiu propriedades anti-diabéticas decorrentes de alterações no TA incluindo, redução nos níveis de mRNA da citocina pró-inflamatória TNF- α e aumento da produção da adipocina sensibilizadora de insulina, adiponectina (PÉREZ-MATUTE *et al.*, 2007).

Segundo Lombardo e Chicco (2006), os efeitos benéficos dos AGPI para a saúde e para o controle de doenças crônicas, incluem, entre outros: a) a alteração da composição dos AG das membranas fosfolipídicas, que provoca a modificação de processos mediados pelas membranas das células como a transdução de sinais da insulina, a atividade de lipases e a síntese de eicosanóides; b) a regulação de eventos nucleares que controlam a transcrição de

genes específicos, incluindo aqueles envolvidos no metabolismo lipídico e da glicose, como é o caso do PPAR γ 2.

1.5.1 - Métodos para avaliação da resistência à insulina (RI)

Em virtude da associação entre RI e várias desordens metabólicas, técnicas para avaliar a SI *in vivo* vem sendo desenvolvidas ao longo dos anos (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

Existem vários métodos de avaliação da RI, sendo considerado padrão ouro para quantificação da SI o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, proposto por De Fronzo *et al.* (1979), entretanto, sua aplicabilidade em grandes estudos e na prática clínica torna-se inviável devido a sua complexidade e alto custo (KATZ *et al.*, 2000; GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

Por ser um método simples, a insulinemia de jejum tem sido utilizada em estudos epidemiológicos para avaliar a SI, contudo, reflete apenas a sensibilidade hepática, pois não considera os tecidos independentes de insulina, como o músculo. Concentrações elevadas de insulina indicam resistência à mesma, porém, em diabéticos, valores menores de insulina não indicam baixa RI e sim falência na função da célula β -pancreática (KATZ *et al.*, 2000; GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

Segundo Sánchez-Margalet *et al.* (2002), valores de insulina de jejum inferiores a 9 μ U/mL são considerados normais e maiores que este valor refletem hiperinsulinemia. Neste estudo, o grupo de obesos com hiperinsulinemia apresentou valores mais altos de glicose e de insulina no sangue, uma e duas horas após a ingestão de glicose, comparado ao grupo de obesos normoinsulinêmicos.

Em 1985, um novo método de avaliação da RI foi proposto por Matthews *et al.* denominado HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*), baseado na seguinte equação:
$$\text{HOMA-IR} = \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicemia de jejum (mmol)} / 22,5.$$

Além de ser uma técnica simples e de fácil aplicação para predizer a RI, o cálculo de HOMA-IR demonstrou boa correlação com o método do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (MATTHEWS *et al.*, 1985).

Segundo Shigeta *et al.* (2001), em indivíduos com sobrepeso ou IMC normal, valores de HOMA-IR iguais ou maiores que 2 indicam quadro de RI. Em um estudo realizado com brasileiros com síndrome metabólica, valores de HOMA-IR maiores ou iguais a 2,71 foram considerados como indicativos de RI (GELONEZE *et al.*, 2005).

Mais recentemente, Katz *et al.* (2000) demonstraram que o QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) constitui um método de avaliação da SI de fácil aplicação, onde $\text{QUICKI} = 1/[\log(I_o) + \log(G_o)]$, sendo I_o = insulina em jejum e G_o = glicose em jejum. Neste método, as concentrações de insulina e de glicose sanguíneas sofrem transformação logarítmica para normalizar a grande variabilidade dos resultados (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

O QUICKI também apresentou alta correlação com o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, demonstrando ser um método simples, reprodutível e de fácil aplicação em pesquisas clínicas (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

Como destacado por Geloneze e Tambascia (2006), embora o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico forneça a mais pura e reprodutível informação sobre a ação tecidual da insulina tanto no fígado como nos tecidos periféricos, métodos simples como o HOMA-IR e o QUICKI ganham cada vez mais adeptos na literatura científica mundial, pela facilidade de aplicação inclusive na prática clínica. Outros autores afirmam que os melhores índices para a avaliação da RI são HOMA e QUICKI (CORRÊA *et al.*, 2007).

1.5.2 – PPAR γ 2 e resistência à insulina (RI)

Estudos moleculares que avaliam a RI têm destacado a importância do PPAR γ , pois este receptor é o alvo celular de drogas como as TZDs, as quais são usadas no tratamento do diabetes mellitus por proporcionarem aumento da SI no tecido muscular (SCHWARTZ e KAHN, 1999; KANUNFRE, 2002).

Alguns estudos mostram que a presença do alelo Ala proporciona efeitos benéficos em relação a SI (DEEB *et al.*, 1998; ALTSHULER *et al.*, 2000; MASUGI *et al.*, 2000; BUZZETTI *et al.*, 2004; CECIL *et al.*, 2006). Se a ocorrência do polimorfismo está associada com menor atividade do gene, os efeitos antidiabéticos das TZDs parecem contraditórios. Contudo, diferentemente dos efeitos fisiológicos dos ligantes endógenos do PPAR γ , o aumento da SI proporcionado por estas drogas pode não estar relacionado apenas às alterações ocorridas no metabolismo do TA (DEEB *et al.*, 1998).

Conforme destacado por Kanunfre (2002), como o tecido muscular apresenta baixa expressão do PPAR γ , o aumento da sensibilidade muscular à insulina proporcionado por estas drogas parece incoerente. Contudo, algumas hipóteses têm sido propostas para explicar este fato. A primeira hipótese é que a ação das TZDs ocorre indiretamente, sendo mediada pelo TA, o qual apresenta alta expressão do PPAR γ . Este efeito ocorreria por meio da expressão de moléculas no TA como TNF- α e leptina que seriam capazes de afetar a SI muscular ou pelo aumento do *clearance* de AG pelo TA, induzido pela ativação do PPAR γ , que resultaria em menor concentração plasmática de AG no músculo, aumentando assim a SI.

Uma segunda explicação para este fato seria a de que as TZDs possam agir diretamente nos tecidos sensíveis à insulina, apesar da baixa expressão do PPAR γ , regulando a expressão de genes envolvidos com o metabolismo da glicose como o GLUT-4. Contudo, são necessários estudos que avaliem se a regulação destes genes é de fato mediada pelo PPAR γ (KANUNFRE, 2002).

Embora a expressão do PPAR γ seja bastante reduzida no tecido muscular, Verma *et al.* (2004) verificaram que a inibição da expressão deste gene em células do músculo esquelético resultou em RI, além disso, houve envolvimento direto do PPAR γ na sensibilização da insulina nestas células, pela ação da TZD.

Apesar dos benefícios, estas drogas possuem a desvantagem de contribuir para o ganho de peso corporal devido ao estímulo para a adipogênese (ROSEN *et al.*, 2000; SOOD *et al.*, 2000; LENHARD e GOTTSCHALK, 2002).

Tendo em vista que a RI é considerada como um ponto chave no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (BUZZETTI *et al.*, 2004) e que a ativação do PPAR γ leva ao aumento da sensibilidade a este hormônio, ligantes naturais como os lipídios dietéticos podem agir de forma semelhante às TZDs contribuindo para a redução das complicações associadas com a obesidade.

Ademais, o polimorfismo no PPAR γ 2 frente aos fatores ambientais, entre eles a dieta, pode refletir em alteração na resposta do organismo em relação ao ganho de peso corporal e a SI.

1.6 – Técnica da reação em cadeia da DNA polimerase

Segundo Molina e Tobo (2004), um dos principais marcos no desenvolvimento dos métodos de diagnóstico molecular foi a técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), um método de clonagem *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1987. Desde então, inúmeros avanços têm ocorrido no campo da biologia molecular.

Técnicas de amplificação como PCR, PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) e a PCR em tempo real permitem analisar os ácidos nucleicos (DNA e RNA) com infinitas aplicações em diversas áreas de pesquisa (MOLINA e TOBO, 2004).

A técnica de PCR é largamente utilizada e permite a amplificação de uma seqüência de interesse contida em uma amostra de ácido desoxirribonucléico (DNA). Nesta reação, utiliza-se uma enzima termoestável (DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA (MOLINA e TOBO, 2004; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

A amplificação é conduzida em equipamentos chamados termocicladores, que permitem repetidos ciclos de temperatura: 94°C para desnaturação do DNA, 45°C a 70°C para hibridização dos oligonucleotídeos às seqüências-alvo e 72°C para a síntese do DNA. Ao final dos ciclos, o DNA amplificado pode ser visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins (MOLINA e TOBO, 2004).

O RT-PCR utiliza a enzima transcriptase reversa que é capaz de converter uma amostra de RNA em DNA complementar (cDNA), permitindo a amplificação por PCR e análises subseqüentes de expressão gênica (MOLINA e TOBO, 2004), permitindo uma análise fenotípica.

A PCR em tempo real é uma inovação tecnológica resultante da PCR que permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente. A reação ocorre em um sistema fechado e específico, composto por termociclador com sistema óptico para o monitoramento da fluorescência emitida pelos reagentes de uso exclusivo para este tipo de sistema (MOLINA e TOBO, 2004; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). Esse monitoramento em tempo real é possibilitado pela construção da curva de amplificação, ciclo a ciclo.

A PCR em tempo real permite a quantificação dos ácidos nucléicos com maior reprodutibilidade, uma vez que os parâmetros que permitirão as análises quantitativas são determinados durante a fase exponencial da reação (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Os sistemas de PCR em tempo real utilizam fluoróforos, que são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, permitindo o acompanhamento das reações ao longo dos ciclos. A fluorescência emitida em resposta a síntese do produto de amplificação é detectada em tempo real. O aumento desse produto nos ciclos iniciais é pouco significativo (representado no gráfico como linhas pontilhadas). Com o progresso da reação, pode se observar um aumento do sinal emitido (fase exponencial, representada por linhas cheias). Quando esse aumento da fluorescência passa a ser estatisticamente significativo, atinge-se o nível *threshold* (linha limite), o ciclo da reação de PCR correspondente é chamado ciclo *threshold* (CT) (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Os fluoróforos podem estar ligados a sondas ou intercalados na dupla fita do DNA amplificado (SYBR[®] Green). As sondas são seqüências de DNA que se ligam à região central da seqüência-alvo, aumentando a seletividade do método. Os sistemas de detecção que utilizam sondas são *Molecular beacons*, sondas FRET, *Scorpions* e sondas TaqMan[®] (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

A sonda TaqMan[®] possui em sua extremidade 5' um fluoróforo (repórter) e um supressor na extremidade 3'. O supressor é uma molécula que absorve a energia emitida pelo repórter, dissipando-a sob a forma de luz ou calor (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Durante a PCR em tempo real esta sonda hibridiza-se com a seqüência alvo para amplificação e a fluorescência do repórter é absorvida pelo supressor, entretanto, durante a amplificação, a sonda TaqMan[®] é degradada devido a atividade de exonuclease 5' → 3' da Taq DNA polimerase, separando o repórter do supressor durante a extensão. Esta separação resulta num aumento da intensidade da fluorescência, que é detectada pelo sistema óptico, permitindo a construção das curvas de amplificação que são visualizadas através de um computador acoplado ao termociclador (SOLINAS *et al.*, 2002; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Os dois métodos mais utilizados para analisar dados da PCR em tempo real são a quantificação absoluta (QA) e a quantificação relativa (QR). A QA determina o número de cópias existente, geralmente relacionado o sinal da PCR para uma curva padrão (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

O método de QR avalia a alteração na expressão de seqüências de ácidos nucléicos (alvo) em uma amostra teste relativa à mesma seqüência da amostra utilizada como calibrador. O calibrador é definido pelo usuário, podendo ser um controle não tratado ou uma amostra no tempo zero em estudos de tempo percorrido (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

A QR é comumente utilizada para comparar níveis de expressão de alelos selvagens com alelos mutados ou níveis de expressão de genes em diferentes tecidos. Este método permite a comparação precisa entre o nível inicial de *template* em cada amostra, sem requerer a cópia exata do número de *template*. Além disso, os níveis relativos de *template* nas amostras podem ser determinados sem o uso de curvas padrões (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

2 – Justificativa

Sabe-se da importância dos fatores genéticos, particularmente do PPAR γ 2 no metabolismo lipídico e na SI, deste modo, alterações na adiposidade corporal e na ingestão dietética, particularmente de lipídios, poderá influenciar na capacidade do gene de regular a insulinemia e glicemia.

Poucos estudos têm avaliado a expressão e regulação deste receptor em modelos experimentais de obesidade, especialmente em tecidos humanos.

Estudos recentes demonstraram que a expressão gênica do PPAR γ pode ser regulada nutricionalmente, seja pela secreção de insulina (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999), pelo jejum ou ingestão alimentar (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996) e até mesmo pela restrição calórica (VIDAL-PUIG *et al.*, 1997).

Várias pesquisas têm analisado os efeitos de seus ligantes sintéticos, porém, apesar da regulação nutricional já constatada, pouco se sabe a cerca das alterações na expressão provocadas por ligantes naturais em curto e em longo prazo. Dentre estes agonistas, os AGPI são considerados candidatos potenciais para a regulação transcricional do PPAR γ 2 (CHAMBRIER *et al.*, 2002).

O estudo das interações gene-ambiente torna-se relevante devido às evidências de que o ambiente pode modificar a ação de determinados genes, assim como mutações e polimorfismos de alguns genes podem resultar em diferentes respostas às intervenções ambientais. Diante disto, sugere-se que a expressão do gene que codifica o PPAR γ 2 possa modificar-se, dependendo do lipídio dietético ingerido.

Também sugerimos que variações na qualidade do lipídio dietético poderão influenciar na resposta glicêmica, dependendo da massa corporal e da ingestão habitual de lipídios.

A RI é uma das principais complicações da obesidade, a qual pode resultar em modificações fisiológicas importantes e predispor a doenças crônicas não-transmissíveis como

o diabetes mellitus tipo 2 e as doenças cardiovasculares. Sabendo-se que a ativação do PPAR γ 2 leva ao aumento da SI, a presente pesquisa visou propor alternativas de dietas com perfil lipídico modificado que favoreçam a sensibilidade a este hormônio.

Houve um progresso científico em torno dos mecanismos de ação da insulina, no entanto, torna-se necessário elucidar as alterações moleculares que propiciam a sensibilidade a este hormônio, bem como as interações entre os genes e o ambiente. Estudos nesta área poderão ser úteis na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis associadas à obesidade e no desenvolvimento de uma abordagem terapêutica individualizada e, portanto, mais eficaz.

Vale à pena salientar que estudos com indivíduos com obesidade avançada, como se propõe no presente estudo, são escassos e difíceis de serem conduzidos devido à própria limitação do excesso de adiposidade.

Os efeitos dos fatores ambientais nos parâmetros destacados neste estudo são amplamente discutidos na literatura científica, porém estudos de intervenção que envolvam parâmetros moleculares são escassos. Considerando que o gene PPAR γ 2 é expresso em altos níveis no tecido adiposo, torna-se extremamente difícil o estudo das interações gene-ambiente como se propõe no presente trabalho. Certamente, a possibilidade de se analisar materiais mais acessíveis, como o sangue, permitiriam o desenvolvimento de pesquisas envolvendo expressão gênica em humanos submetidos à intervenção.

3 - Objetivos:

3.1 - Geral

Avaliar os efeitos do genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2 e dos ácidos graxos polinsaturados (AGPI) na resistência à insulina (RI), insulinemia e glicemia, bem como analisar a expressão do gene em sangue de mulheres obesas de grau 3.

3.2 – Específicos

- Realizar a genotipagem de mulheres obesas grau 3 em relação ao gene PPAR γ 2;
- Comparar os parâmetros antropométricos e bioquímicos de acordo com a massa corporal;
- Associar a massa corporal com a RI, e com a glicemia e insulinemia após dieta rica em AGPI;
- Avaliar os parâmetros antropométricos e bioquímicos segundo a ingestão habitual de lipídios;
- Relacionar a ingestão habitual de lipídios qualitativa e quantitativa com a RI, e com a glicemia e insulinemia após dieta rica em AGPI;
- Correlacionar a ingestão habitual de lipídios qualitativa e quantitativa com o IMC, RI, glicemia e insulinemia;
- Investigar o efeito do tratamento com DNase no RNA total isolado a partir de amostras de sangue na expressão do gene;
- Verificar o efeito da concentração de RNA total na expressão do gene em amostras de sangue;
- Comparar a análise de expressão do gene em amostras de sangue e de tecido adiposo fresco e congelado, a partir de diferentes concentrações de RNA total.

4 – Casuística, resultados e discussão

Serão apresentados sob a forma de artigos científicos intitulados: **“Índice de massa corporal e lipídios dietéticos: efeitos na insulinemia e glicemia de mulheres obesas de grau 3 com o genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2”** e **“Avaliação da expressão do gene PPAR γ 2 em sangue de mulheres obesas de grau 3 em jejum e pós-prandial”**, apresentados a seguir.

**ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E LIPÍDIOS DIETÉTICOS: EFEITOS NA
INSULINEMIA E GLICEMIA DE MULHERES OBESAS DE GRAU 3 COM O
GENÓTIPO PRO12PRO NO GENE PPAR γ 2**

Quadro 1 – Condições experimentais para a detecção do genótipo Pro12Pro.

Vanessa Chaia Kaippert¹, Eliane Lopes Rosado², Edna Maria Morais Oliveira³

1 – Mestranda em Nutrição Humana pelo Programa de Pós-graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

2 – Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Professor Adjunto do Departamento de Nutrição e Dietética do Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ.

3 – Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e Pesquisadora A da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Endereço para correspondência:

Eliane Lopes Rosado

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Nutrição Josué de Castro - Departamento de Nutrição e Dietética

Avenida Brigadeiro Trompovsky , s/nº, Bloco J, 2^o andar, sala 24 - CEP: 21949-900

e-mail: elianerosado@nutricao.ufrj.br, vanessachaia@uol.com.br

Local de realização do trabalho: Departamento de Nutrição e Dietética, Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ.

RESUMO

Objetivos: Avaliar os efeitos da massa corporal, determinada pelo índice de massa corporal (IMC), e dos lipídios dietéticos na resistência à insulina (RI), insulinemia e glicemia, em mulheres obesas de grau 3, com o genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2. **Métodos:** A amostra foi composta por 25 mulheres adultas, obesas de grau 3 (IMC \geq 40 kg/m²) com o genótipo Pro12Pro no gene (PCR-RFLP - reação em cadeia da DNA polimerase, seguida da análise do polimorfismo pelo comprimento dos fragmentos de restrição). As mulheres foram divididas em grupos de acordo com a massa corporal (G1: IMC 40 - 45 kg/m², n=17 e G2: IMC > 45 kg/m², n=8) e a ingestão habitual de lipídios totais (IHLT) (GA: IHLT \leq 30% VET, n=5 e GB: IHLT > 30% VET, n=20). A ingestão alimentar habitual foi determinada pela análise da composição química de registro alimentar de 3 dias, por meio do programa *Food Processor* versão 12. Realizou-se um estudo transversal de intervenção, no qual foi oferecido um jejum (15-20% VET) rico em AGPI (cerca de 15% VET oferecido) da série n-6. Foram realizadas análises bioquímicas (glicose plasmática, insulina sérica, triglicerídios, colesterol total e frações) e antropométricas (peso, estatura e circunferência da cintura) em jejum, e dosagem de glicose e insulina pós-prandiais. Utilizou-se o cálculo de HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) e QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) para avaliação da RI e sensibilidade à insulina (SI). **Resultados:** Na PCR-RFLP foram gerados fragmentos com 267 pb, caracterizando o genótipo Pro12Pro. As mulheres com maior massa corporal (G2) apresentaram glicemia de jejum alterada (101,6 \pm 22,1 mg/dL), baixa SI (QUICKI = 0,32 \pm 0,03) e RI mais elevada (HOMA-IR = 3,6 \pm 1,8 e 3,2 \pm 2,2, em G2 e G1, respectivamente). Os valores de glicemia pós-prandial encontravam-se normais, porém, observou-se maior pico de insulina 1 hora após a refeição teste (82,2 \pm 53 μ U/mL) em G2, comparado com G1 (61,2 \pm 46,6 μ U/mL). O grupo com IHLT adequada (GA) apresentou valores normais de HOMA-IR (2,3 \pm 0,7) e QUICKI (0,34 \pm 0,02). Entretanto, no grupo com IHLT excessiva (GB), se observou valores maiores (p < 0,05) de IMC e HOMA-IR, e de glicose e insulina em todos os tempos de coleta. Verificou-se ingestão mais elevada e significativa (p < 0,05) de ácidos graxos saturados (AGS) e monoinsaturados (AGMI) em GB, havendo correlação positiva entre a IHLT (%) e estes tipos de lipídios. Ainda em GB, a IHLT (%) se correlacionou negativamente com a insulina de jejum e a ingestão de AGMI (%) apresentou correlação negativa com glicemia e insulinemia de jejum, além de correlação positiva com QUICKI. **Conclusões:** As mulheres com maior massa corporal demonstraram maior RI, o que sugere diferenças metabólicas importantes entre os grupos compostos por

obesas de grau 3. A ingestão excessiva de lipídios e de AGS contribuiu para o aumento da massa corporal e RI. Contudo, a ingestão de AGMI pode ter reduzido o impacto da dieta hiperlipídica no metabolismo da glicose. Sugere-se que mulheres obesas sem o polimorfismo no gene PPAR γ 2 evitem a ingestão excessiva de lipídios, principalmente de AGS, priorizando a ingestão de gorduras insaturadas, especialmente AGMI, com o objetivo de evitar o ganho de peso e melhorar a SI.

Palavras-chave: Obesidade de grau 3; resistência à insulina; PPAR γ 2 e lipídios.

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada como um dos mais graves problemas de saúde pública que vem crescendo acentuadamente em todo do mundo. Esta enfermidade vem sobrecarregando os serviços de saúde com uma demanda crescente para o tratamento de outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

É uma doença complexa, de origem multifatorial, com forte influência de fatores hereditários e ambientais (PÉRUSSE e BOUCHARD, 2000; FROGUEL e BOUTIN, 2001; MARQUES-LOPES *et al.*, 2004; CECIL *et al.*, 2006; FAROOQI e O'RAHILLY, 2007).

Embora tenha caráter poligênico (FROGUEL e BOUTIN, 2001; CECIL *et al.*, 2006; FAROOQI e O'RAHILLY, 2007), diversos estudos têm enfatizado a contribuição significativa do fator de transcrição adipogênico receptor ativado pela proliferação de peroxissomas, isoforma γ , série 2 (PPAR γ 2).

Os PPARs fazem parte de uma superfamília de receptores hormonais nucleares (GROMMES *et al.*, 2004), constituindo uma sub-família de três isoformas: PPAR α , PPAR γ e PPAR β/δ , as quais exercem funções essenciais na regulação do metabolismo lipídico (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KANUNFRE, 2002; GROMMES *et al.*, 2004).

O PPAR γ está presente em três subtipos (γ 1, γ 2 e γ 3), os quais são expressos em diferentes tecidos (KANUNFRE, 2002; MUELLER *et al.*, 2002).

A expressão do PPAR γ 2 ocorre principalmente no tecido adiposo (TA) (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; AUBOEUF *et al.*, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999; CHAMBRIER *et al.*, 2002), estando este relacionado a adipogênese (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1999; KERSTEN *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2005; CECIL *et al.*, 2006) e à sensibilidade à insulina (SI) (DEEB *et al.*, 1998; KUBOTA *et al.*, 1999;

MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; PIHLAJAMAKI *et al.*, 2000; ZEGHARI *et al.*, 2000; STUMVOLL *et al.*, 2001; VERMA *et al.*, 2004).

Para que possam agir nos genes alvos, estes fatores de transcrição precisam ser ativados por ligantes naturais, que incluem ácidos graxos polinsaturados (AGPI) de cadeia longa, derivados de eicosanóides e lipídios oxidados ou mesmo ligantes sintéticos, incluindo drogas hipolipidêmicas e antidiabéticas, como as tiazolidinedionas (TZDs), que possuem alta afinidade pelo PPAR γ (KERSTEN *et al.*, 2000; ROSEN *et al.*, 2000; KANUNFRE, 2002; GROMMES *et al.*, 2004; PÉGORIER *et al.*, 2004).

Variantes genéticas do PPAR γ 2 têm sido identificadas, entre estas, o polimorfismo Pro12Ala, caracterizado pela substituição do aminoácido prolina pela alanina na posição 12 (Pro12Ala e Ala12Ala) (BUZZETTI *et al.*, 2004).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos a fim de elucidar os efeitos do genótipo selvagem (Pro12Pro), bem como do alelo variante Ala no gene PPAR γ 2, entretanto, os resultados permanecem sem consenso.

Na presença do genótipo homozigoto Pro12, a ativação do gene por agonistas associa-se com a expressão de enzimas envolvidas na captação e no transporte de ácidos graxos, levando ao aumento na adipogênese e redução das concentrações de ácidos graxos livres plasmáticos. Como resultado, há menor acúmulo de gorduras no fígado e nos tecidos musculares, favorecendo a SI nestes tecidos (ANAYA e ARIZA, 2004). Todavia, em portadores do alelo Ala, há menor afinidade do complexo ligante-PPAR γ com o PPRE dos genes alvos (ROBITAILLE, *et al.*, 2003), o que pode levar a um estímulo menos eficaz e, conseqüentemente, menor acúmulo de TA (DEEB *et al.*, 1998).

A resistência à insulina (RI) caracteriza-se pela diminuição da eficácia do hormônio em estimular a captação de glicose no músculo esquelético e no TA (CARPENTIER *et al.*, 2006). Esta morbidade predispõe o indivíduo a diversas DCNT, incluindo hipertensão arterial

sistêmica, diabetes mellitus do tipo 2, dislipidemias, cardiopatia isquêmica, além de propiciar maior atividade aterogênica generalizada. Dentre os fatores etiológicos para RI, destaca-se o excesso de gordura corporal, em especial a do tipo visceral (Documento do Consenso Latino-americano sobre Obesidade, 1999; Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

A RI também pode ser desencadeada por fatores nutricionais, independentemente de seus efeitos no peso corporal, principalmente pela elevada ingestão de lipídios (LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000; BISSCHOP *et al.*, 2001).

Os ácidos graxos saturados (AGS) contribuem para o excesso de peso, devido à baixa capacidade oxidativa e aumento da expressão de genes envolvidos na proliferação dos adipócitos, ademais, estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de RI. Por outro lado, os ácidos graxos insaturados favorecem a SI (LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000; STORLIEN *et al.*, 2000; WHO, 2003; RICCARDI *et al.*, 2004; PÉREZ-MATUTE *et al.*, 2007).

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos da massa corporal, determinada pelo índice de massa corporal (IMC), e dos lipídios dietéticos na RI, insulinemia e glicemia, em mulheres obesas de grau 3, com o genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2. Sabendo-se que a ativação do PPAR γ 2 leva ao aumento da SI, a presente pesquisa visa, dentre outros, propor alternativas de dietas com perfil lipídico modificado que favoreçam a sensibilidade a este hormônio.

CASUÍSTICA

População

Foi realizado um estudo transversal de intervenção não randomizado e não controlado com 25 mulheres adultas (22 a 48 anos) obesas de grau 3.

A amostra foi recrutada por meio de cartazes expostos em dois hospitais públicos e em um campus universitário, localizados no município do Rio de Janeiro.

O protocolo do estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sendo aprovado em 26/09/2005 (protocolo de pesquisa nº 116/05) (Anexo I). O projeto encontra-se cadastrado no CONEP (CAAE – 0832.0.000.197-05).

Todas as voluntárias assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de iniciarem a pesquisa, segundo a Resolução 196/96 (Anexo II).

Como critérios de inclusão considerou-se as mulheres adultas com história familiar de obesidade, no período pré-menopausa, com índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 40 kg/m² (WHO, 1998).

Foram considerados como critérios de exclusão o tabagismo, diagnóstico prévio de doença renal crônica, doenças infecciosas, diabetes mellitus e/ou outras doenças crônicas não transmissíveis (exceto obesidade), gestação, lactação, uso de fármacos para perda de peso e/ou hipolipemiantes, pacientes em dieta especial ou que apresentaram perda de peso superior a 3 kg no último mês. Ademais, foram excluídas do estudo as voluntárias que não foram capazes de seguir o protocolo proposto.

DESENHO DO ESTUDO

O esquema geral de condução do estudo encontra-se na Figura 1.

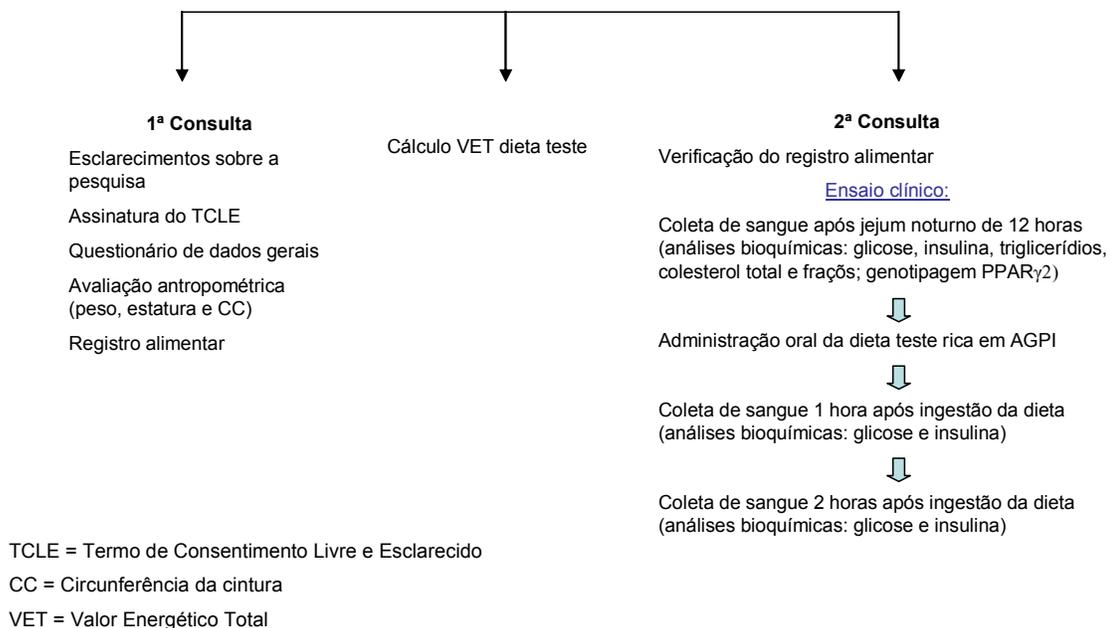


Figura 1. Esquema geral de realização do estudo.

Primeira consulta

A primeira consulta foi realizada no Laboratório de Avaliação Nutricional (LANUTRI) do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da UFRJ.

Após esclarecimentos a cerca da pesquisa, bem como assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foi aplicado o questionário para o levantamento de informações gerais das voluntárias (Anexo III).

A avaliação antropométrica incluiu as variáveis peso corporal e estatura, as quais permitiram verificar se a voluntária atendia ao critério de inclusão (IMC igual ou superior a 40 kg/m²), além de embasarem o cálculo do valor energético total (VET) da refeição teste. Também foi avaliada a circunferência da cintura (CC).

A fim de aumentar a acurácia e precisão quantitativa e qualitativa da avaliação dos hábitos alimentares, foi solicitado que as voluntárias preenchessem registro alimentar de 3 dias, sendo dois dias típicos e um atípico (final de semana ou feriado). Foram fornecidos

formulários, além de orientações para o preenchimento dos mesmos, os quais foram devolvidos na segunda consulta (Anexo IV).

A análise da composição química dos registros dietéticos foi feita por meio do programa computacional *Food Processor* versão 12 (Esha Research, Salem, EUA, 1984), após adaptação dos alimentos à realidade brasileira.

Segunda consulta

Na segunda consulta, as voluntárias se apresentaram ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) da UFRJ às 7h, após jejum noturno de 12 horas.

Para avaliação do efeito agudo da dieta foi realizado ensaio clínico, conforme representado na Figura 1.

As amostras de sangue para avaliações bioquímicas (colesterol total e frações, triglicerídios, glicose e insulina) e para a análise molecular (polimorfismo do gene PPAR γ 2) foram coletadas no LACFAR da UFRJ, por pessoal devidamente treinado e com materiais descartáveis.

Na primeira coleta em jejum, foram coletadas quatro alíquotas de sangue para cada voluntária, sendo 5 mL em um tubo com anticoagulante ácido dietiltetraaminoacético (EDTA) (Vacutainer, Becton Dickinson) destinado à análise molecular, 5 mL em um tubo com anticoagulante Fluoreto (Vacuum II Fluoreto de Sódio) para análise da glicose plasmática e dois tubos sem anticoagulante (Vacuum II Siliconizado), nos volumes de 10 mL cada.

Os tubos sem anticoagulante contendo sangue foram submetidos à centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos (Centrífuga Excelsa Baby II - FANEM[®]) para a obtenção de soro. As alíquotas de soro destinadas à dosagem de triglicerídios, colesterol total e HDL-colesterol

foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. As demais amostras de soro foram estocadas a -20°C até a análise da concentração sérica de insulina.

Após a primeira coleta, foi administrada por via oral a refeição rica em AGPI da série n-6. Nos tempos 60 e 120 minutos após a ingestão da dieta foram coletadas novas amostras de sangue para a avaliação da glicose plasmática (5 mL em um tubo com anticoagulante Fluoreto de Sódio) e insulina sérica (10 mL em um tubo sem anticoagulante). Nos intervalos entre as coletas foi realizada a verificação dos registros alimentares.

Imediatamente após a primeira coleta de sangue (jejum), os tubos com EDTA contendo uma alíquota de sangue (5 mL) foram acondicionados em caixa de isopor contendo gelo e levados até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do *Schistosoma mansoni* – UFRJ/CCS para a realização da análise molecular.

No que se refere ao efeito agudo da refeição rica em AGPI, as voluntárias (n=25) foram divididas em dois grupos de acordo com o IMC, sendo o Grupo 1 formado por mulheres com IMC entre 40 e 45 kg/m^2 (n=17) e o Grupo 2 por mulheres com IMC igual ou maior que 45 kg/m^2 (n=8).

Ainda em relação ao efeito agudo da refeição teste, as voluntárias foram redistribuídas conforme a ingestão habitual de lipídios, baseando-se nos registros alimentares:

Grupo A – ingestão de lipídios totais até 30% do VET (n=5)

Grupo B – ingestão de lipídios totais maior que 30% do VET (n=20)

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

As avaliações antropométricas foram realizadas no LANUTRI. Foram verificados peso e estatura segundo Gibson (1990), utilizando-se balança antropométrica digital do tipo plataforma (Filizola[®]), com precisão de 100 g e capacidade máxima de 150 kg, além de estadiômetro da própria balança antropométrica com escala de 0,1cm. As voluntárias foram

pesadas com o mínimo de vestimentas possível e descalças. Com base nestas variáveis era feito o cálculo do IMC (Peso / Estatura²) (WHO, 1995).

Para a mensuração da CC utilizou-se fita métrica inestensiva e inelástica. A CC foi aferida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (Documento do Consenso Latino-americano sobre Obesidade, 1999).

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Todas as coletas de sangue foram realizadas no LACFAR da UFRJ. Conforme acordo técnico, este laboratório analisou as concentrações de colesterol total e frações, glicose e triglicerídios. A insulina sérica foi analisada no laboratório da Associação dos pais e amigos dos excepcionais (APAE).

Avaliação do perfil lipídico

O colesterol total e frações e os triglicerídios foram analisados para determinar o perfil lipídico da população estudada.

Os valores de referência utilizados para triglicerídios (< 150 mg/dL), colesterol total (< 200 mg/dL), HDL-colesterol (> 60 mg/dL) e LDL-colesterol (< 130 mg/dL) foram àqueles propostos pelas III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001).

Triglicerídios séricos

Os triglicerídios séricos foram determinados por sistema enzimático-colorimétrico com auxílio do kit TRIGLICÉRIDES Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil, Cat. 87), segundo McGowan (1983).

Os triglicerídios do soro são hidrolisados pela lipase lipoprotéica, produzindo glicerol livre que é fosforilado pela glicerolquinase. O produto da fosforilação sofre a ação da glicerol-fosfato-oxidase que, na presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , sob a ação da peroxidase em presença de 4-clorofenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinoneimina), com máximo de absorção em 505 nm.

Colesterol total sérico

As concentrações séricas de colesterol total foram analisadas por método enzimático, por meio do kit comercial COLESTEROL Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil, Cat. 76), segundo Richmond (1973).

Na técnica empregada, os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase produzindo colesterol livre que, na presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz H_2O_2 . O H_2O_2 , na presença de fenol e 4-aminoantipirina sofre ação da peroxidase, produzindo um composto róseo-avermelhado (antipirilquinonimina), com máximo de absorção em 500 nm.

HDL-colesterol

As concentrações séricas de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) foram determinadas por método enzimático-colorimétrico, segundo Kostner *et al.* (1979), utilizando-se o kit comercial COLESTEROL HDL (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil, Cat. 13).

Nesse método, a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio precipita as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol), sem alterar a solubilidade do HDL-colesterol. Após a precipitação, a solução é submetida ao processo de centrifugação, sendo recolhido o líquido sobrenadante que contém a fração HDL cujo conteúdo é determinado enzimaticamente.

LDL-colesterol e VLDL-colesterol

As concentrações de LDL e de VLDL foram calculadas com base na equação de Friedwald (1972), que é exata para amostras cujas concentrações de triglicérides não ultrapassem 400 mg/dL.

Equação de Friedwald:

$$\text{VLDL (mg/dL)} = \text{triglicérides} / 5$$

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

Avaliação da glicemia e insulinemia

As concentrações de glicose plasmática e de insulina sérica foram analisadas em jejum, 60 e 120 minutos após a ingestão da refeição teste.

Glicose plasmática

A determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático-colorimétrico (GOD-POD) (LOTT & TURNER, 1975), utilizando-se o kit comercial GLICOSE PAP Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil, Cat. 84).

Nessa análise, a glicose da amostra, na presença de oxigênio e água, sofre ação da enzima glicose oxidase, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂ reage com 4-aminoantipirina e fenol, que sofre ação da enzima peroxidase, produzindo uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose presente na amostra (LOTT & TURNER, 1975).

Os valores de referência utilizados para a glicemia seguiram as recomendações da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2007):

- Glicose plasmática de jejum < 100 mg/dL = normal
- Glicose plasmática de jejum entre 100 e 125 mg/dL = glicose de jejum alterada

- Glicose plasmática de jejum ≥ 126 mg/dL = suspeita de diabetes mellitus
- Glicose 2 horas pós prandial entre 140 e 199 mg/dL = intolerância à glicose

Insulina sérica

Para a determinação da insulina sérica foi realizada a técnica de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se a insulina COAT-A-COUNT[®] (Diagnostic Products Corporation[®], USA).

Nesse método, a insulina marcada com iodo ¹²⁵I compete, por um período fixo de tempo, com a insulina da amostra pelos sítios específicos do anticorpo anti-insulina. Em razão do anticorpo estar imobilizado na parede do tubo de polipropileno, uma simples decantação do sobrenadante é suficiente para finalizar a competição e isolar a fração de insulina radiomarcada ligada ao anticorpo (REEVES, 1983). A determinação da radioatividade foi feita em contador GAMMA. Os resultados da insulina sérica foram expressos como $\mu\text{IU/mL}$ que equivale à $\mu\text{U/mL}$.

Avaliação da resistência à insulina (RI)

Inicialmente, as voluntárias foram classificadas como normoinsulinêmicas (insulina de jejum < 9 $\mu\text{U/mL}$) ou hiperinsulinêmicas (insulina de jejum > 9 $\mu\text{U/mL}$) (SÁNCHEZ-MARGALET *et al.*, 2002).

A RI foi estimada utilizando-se o cálculo de HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) segundo Matthews *et al.* (1985):

$$\text{HOMA-IR} = \text{nível sérico de insulina em jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose em jejum (mmol/L)} / 22,5$$

Considerou-se como quadro de RI valores de HOMA-IR $\geq 2,71$ (GELONEZE *et al.*, 2005).

Além do HOMA-IR foi utilizado o cálculo de QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) para avaliar a sensibilidade à insulina (SI), conforme proposto por Katz *et al.* (2000):

$$\text{QUICKI} = 1/[\log(Io) + \log(Go)]$$

Onde: Io = insulina em jejum e Go = glicose em jejum.

Para a classificação dos valores de QUICKI, foi utilizado o valor de referência sugerido por Bonneau *et al.* (2006), sendo considerado como baixa SI valores inferiores a 0,33.

GENOTIPAGEM PARA O GENE PPAR γ 2

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do *Schistosoma mansoni*.

Extração do DNA

As amostras de DNA genômico foram isolados a partir de amostras de sangue integral utilizando-se o kit comercial *MasterPureTM Genomic DNA Purification Kit* (EPICENTRE[®] *Biotechnologies*, Cat. MG71100), conforme protocolo proposto pelo fabricante.

As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a etapa subsequente.

Amplificação e digestão das amostras de DNA

As condições experimentais utilizadas na amplificação do gene PPAR γ 2 e na detecção do alelos Pro12Pro, Pro12Ala e Ala12Ala, por meio da ação da enzima de restrição Bst UI constam no Quadro 1.

Quadro 1 – Condições experimentais para a detecção do genótipo Pro12Pro.

PCR	Digestão enzimática
Nº de acesso no GenBank: AB005520 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/	Enzima de restrição: Bst UI (<i>New England Biolabs, Inc.</i>)
Genotipagem: Códon 12: CCG (Pro) ou GCG (Ala)	Local da digestão: CG / CG
Primers: Exon 1 <i>Sense</i> 5' GCC AAT TCA AGC CCA GTC 3' (18 nucleotídeos) <i>Antisense</i> 5' GCC ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G 3' (43 nucleotídeos)	Condições experimentais: Temperatura de digestão: 60° C Tempo: 180 minutos [Enzima]: 6 U
Condições experimentais: Temperatura de anelamento: 59° C Temperatura e tempo de desnaturação: 95° C/5 min. Temperatura e tempo de extensão: 72° C/30 seg. Nº de ciclos: 35	Fragmentos gerados: Pro12Pro: 267 pb Pro12Ala: 267, 224, 43 pb Ala12Ala: 224, 43 pb.
Fragmento gerado: 267 pb	

Adaptado de Rosado (2006).

As amostras de DNA isoladas foram amplificadas por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da DNA polimerase), sendo utilizado um par de iniciadores: *sense* (5'- GCC AAT TCA AGC CCA GTC - 3') e *antisense* (5'- GCC ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G - 3') (GEN BANK DNA, 2003).

A mistura de reação para a PCR continha 10 µM de cada iniciador, 45 µL de PCR Supermix (Invitrogen™, Cat. 10572-114. Componentes: 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, 22 U Taq DNA polimerase recombinante/mL e estabilizadores) e 1 µL de DNA genômico, em um volume final de 50 µL.

As condições para amplificação incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação (95°C de desnaturação por 30 segundos, 59°C de anelamento por 30 segundos e 72°C de extensão por 30 segundos), seguidos por 10 minutos de extensão a 72°C. As reações foram realizadas em um termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems®*, EUA).

Uma alíquota de 10 µL do produto da PCR foi misturada a 2 µL de tampão de corrida *Blue Juice™ Gel Loading Buffer 10X* (Invitrogen™) e submetido à eletroforese em gel de

agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio na quantidade de 1 µL para um gel contendo 100 mL de TBE 1X (0,892M Tris-HCl; 0,019M EDTA; 0,889M ácido bórico).

A eletroforese foi realizada para confirmação da amplificação, em cuba horizontal (*Horizon*[®] 58, *Life Technologies*_{TM}) a 100V por cerca de 40 minutos, usando-se como tampão de corrida TBE 1X. A amplificação gerou um fragmento de 267 pares de bases (pb).

Os géis foram visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta em câmara escura equipada com transluminador (*DigiDoc-It*TM *Darkroom*, P/N 76-0311-01, UVP, USA) e câmara digital (Canon PC 1089) acoplada a um microcomputador dotado de *software* para captura de imagens.

Posteriormente, 10 µL do material amplificado foi digerido com 6 unidades da enzima de restrição Bst UI (*New England Biolabs, Inc.*), em tampão apropriado (*NE Buffer 2, New England Biolabs, Inc.*), a 60°C por 3 horas.

Os fragmentos gerados foram visualizados em géis de agarose a 2%, corados com brometo de etídio na quantidade de 1 µL para um gel contendo 100 mL de TBE 1X. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (*Horizon*[®] 58, *Life Technologies*_{TM}) a 100V por cerca de 40 minutos, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X.

Novamente os géis foram visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta em câmara escura equipada com transluminador e câmara digital acoplada a um microcomputador dotado de *software* para captura de imagens.

REFEIÇÃO TESTE

O VET de cada voluntária foi estimado de acordo com a FAO/OMS (OMS, 1985). O valor calórico da refeição teste foi equivalente a um desjejum (15 a 20% do VET), sendo normoglicídica, normoprotéica e normolipídica, contendo aproximadamente 15% de AGPI (em média 88,6% e 11,4% de AGPI da série n-6 e n-3, respectivamente), em torno de 10% de

AGMI e menos que 10% de AGS (Anexo V). A escolha dos percentuais para a refeição teste foi baseada nas recomendações para indivíduos normais (menos que 10% do VET de AGS, menos que 10% de AGPI e de 10 a 15 % do VET de AGMI) (GIANNINI *et al.*, 2001).

A refeição teste foi composta por bolo de cenoura sem cobertura, torradas, ricota acrescida de óleo de soja e leite desnatado. Foram formuladas dietas com VET entre 2000 a 4000 kcal para auxiliar o cálculo da refeição teste para cada voluntária (Anexo VI).

Em média, a refeição teste fornecia $511,2 \pm 50,4$ kcal, com a seguinte composição química: $50,0 \pm 0,6\%$ de carboidratos, $19,0 \pm 1,7\%$ de proteínas, $35,1 \pm 0,5\%$ de lipídios, $14,6 \pm 0,5\%$ de AGPI, $9,3 \pm 0,2\%$ de AGMI, $9,2 \pm 0,4\%$ de AGS e $5.485,9 \pm 871,4$ UI de vitamina A.

A análise da composição química das dietas foi feita por meio do programa computacional *Food Processor* versão 12 (Esha Research, Salem, EUA, 1984), após adaptação dos alimentos à realidade brasileira.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa computacional SPSS versão 11.0. Foram considerados resultados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Para a verificação da distribuição das variáveis contínuas de interesse (clínicas¹, antropométricas², bioquímicas³ e dietéticas⁴), foi realizado o teste de aderência de Kolmogorov – Smirnov.

1: idade;

2: peso corporal, IMC e CC;

3: insulina sérica, glicose plasmática, triglicerídios, colesterol total e frações (HDL-colesterol, LDL-colesterol e VLDL-colesterol) e valores de HOMA-IR e QUICKI;

4: lipídios, AGPI, AGMI e AGS dietéticos.

De acordo com a verificação da normalidade, todas as variáveis apresentavam distribuição normal.

Para a comparação entre as médias dos grupos, foram calculadas as estatísticas básicas de posição (média) e dispersão (desvio padrão).

Como as variáveis contínuas apresentavam distribuição normal, utilizou-se o teste paramétrico *t*-Student.

Quando as variáveis apresentavam variância menor que 4, utilizou-se o teste *t*-Student para variâncias equivalentes, caso contrário, foi aplicado o teste *t*-Student para variâncias diferentes.

O coeficiente de correlação de Pearson foi realizado para avaliar a relação entre as variáveis quantitativas.

RESULTADOS

O presente estudo foi realizado com 25 mulheres adultas, obesas de grau 3. A genotipagem das voluntárias foi realizada pela técnica da reação em cadeia da DNA polimerase, seguida da análise do polimorfismo pelo comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) que gerou um fragmento com 267 pares de base (pb). Após a amplificação, as amostras foram submetidas à digestão com enzima de restrição, obtendo-se um fragmento com 267 pb confirmando que todas as mulheres eram homozigotas Pro12 (Figura 2).

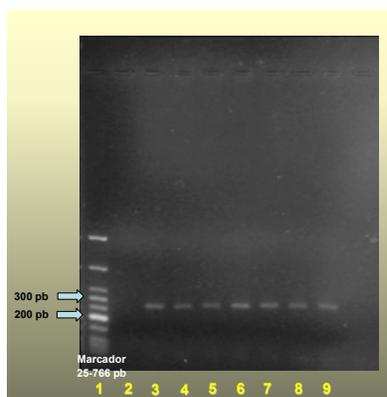


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose visualizando o alelo Pro12Pro do gene PPAR γ 2, produto da digestão dos segmentos de DNA amplificados. Coluna 1: marcador (25 a 766 bp); coluna 2: branco; colunas 3 a 9: fragmentos relativos ao genótipo homozigoto Pro12.

As voluntárias foram divididas em dois grupos de acordo com o índice de massa corporal (IMC). O grupo 1 (G1) (IMC entre 40 e 45 kg/m²) foi constituído por 17 (68%) mulheres e o grupo 2 (G2) (IMC > 45 kg/m²) por 8 (32%) mulheres.

As características antropométricas e bioquímicas de ambos os grupos são demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis antropométricas e bioquímicas (média \pm desvio padrão) dos grupos 1 e 2.

Variável	Grupo 1 (n=17)		Grupo 2 (n=8)		p-valor ²
	Média	DP ¹	Média	DP	
Idade (anos)	35,9	7,2	37,1	7,3	0,69
Peso (kg)	113,4	9,9	129,6	10,3	< 0,01*
IMC ³ (kg/m ²)	42,4	1,5	49,5	4,8	< 0,01*
CC ⁴ (cm)	120,4	6,2	130,9	9,3	< 0,01*
Glicose jejum (mg/dL)	91,9	18,5	101,6	22,1	0,26
Glicose 1h após dieta (mg/dL)	106,6	31,8	104,5	30,0	0,88
Glicose 2h após dieta (mg/dL)	100,1	31,1	95,6	28,5	0,74
Insulina jejum (μ U/mL)	13,3	7,5	14,0	5,2	0,82
Insulina 1h após dieta (μ U/mL)	61,2	46,6	82,2	53,0	0,32
Insulina 2h após dieta (μ U/mL)	45,5	22,0	46,2	28,9	0,95
HOMA-IR ⁵	3,2	2,2	3,6	1,8	0,61
QUICKI ⁶	0,34	0,05	0,32	0,03	0,30
Colesterol total (mg/dL)	201,1	40,7	190,9	39,1	0,56
Colesterol LDL (mg/dL)	128,8	33,3	129,3	35,0	0,98
Colesterol HDL (mg/dL)	49,2	13,4	42,9	8,5	0,23
Triglicerídios (mg/dL)	115,8	71,3	93,6	33,7	0,30

Grupo 1 - IMC 40 - 45 kg/m²; Grupo 2 - IMC > 45 kg/m².

¹ desvio padrão; ² diferenças entre os grupos foram testadas com teste *t*-Student não pareado; ³ índice de massa corporal; ⁴ circunferência da cintura; ⁵ Homeostasis Model Assessment; ⁶ Quantitative Insulin Sensitivity Check Index. * p < 0,05.

Conforme demonstrado na Tabela 1, o peso corporal, o IMC e a CC diferiram significativamente entre os grupos ($p < 0,05$), não havendo diferença significativa quanto às demais variáveis ($p > 0,05$). Todas as voluntárias apresentaram excesso de gordura abdominal, isto é, valores de CC superiores a 80 cm (IDF, 2005).

Quanto à glicose plasmática em jejum, G1 apresentou valor médio normal (< 100 mg/dL), enquanto G2, demonstrou valor médio alterado ($101,6 \pm 22,1$ mg/dL), segundo a ADA (2007) (entre 100 e 125 mg/dL).

Ressalta-se que as mulheres apresentaram secreção de insulina em jejum acima do valor de normalidade ($13,3 \mu\text{U/mL}$ e $14,0 \mu\text{U/mL}$, em G1 e G2, respectivamente) (SÁNCHEZ-MARGALET *et al.*, 2002), assim como valores de HOMA-IR maiores que 2,71, indicando resistência à insulina (RI) (GELONEZE *et al.*, 2005).

Considerando-se os valores de referência propostos por Bonneau *et al.* (2006) para o cálculo de QUICKI de 0,33, G1 apresentou SI normal ($\text{QUICKI} = 0,34 \pm 0,05$), enquanto G2 apresentava baixa SI ($\text{QUICKI} = 0,32 \pm 0,03$).

A Figura 3 mostra as variações na glicemia e insulinemia em G1 e G2, em jejum, 1 hora e 2 horas após a ingestão da refeição rica em ácidos graxos polinsaturados (AGPI).

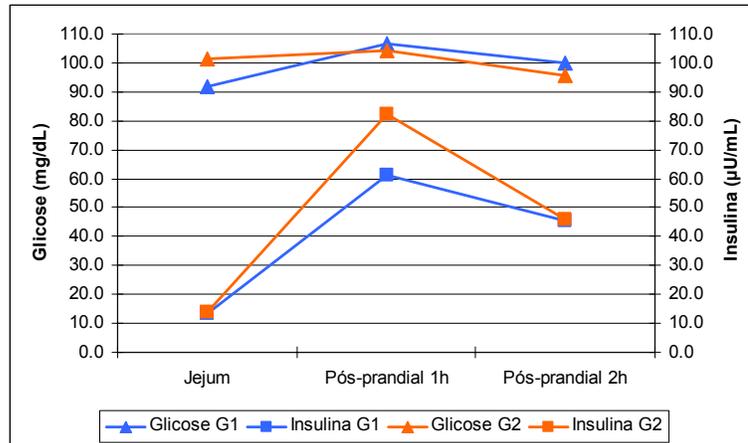


Figura 3: Concentrações de glicose plasmática (mg/dL) e de insulina sérica (µU/mL) em jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais dos grupos 1 (G1) e 2 (G2).

Em relação ao perfil lipídico das mulheres, de acordo com os valores propostos pelas III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001), ambos os grupos apresentaram valores médios normais para triglicerídios e LDL-colesterol e baixas concentrações de HDL-colesterol.

Apesar da grande variabilidade observada nas concentrações de triglicerídios, todas as voluntárias de G2 apresentaram valores adequados e em G1, 23,5% (n=4) apresentaram resultados acima do esperado.

Em G1, o valor médio de colesterol total ($201,1 \pm 40,7$ mg/dL) estava ligeiramente alterado, correspondendo a 47,1% das voluntárias (n=8) deste grupo. Em G2, apesar do desvio padrão elevado (39,1 mg/dL), apenas três mulheres (37,5%) apresentaram concentrações de colesterol total acima do recomendado.

A amostra (n=25) também foi dividida em grupos segundo a ingestão habitual de lipídios, obtida por meio da análise dos registros alimentares, sendo: grupo A (GA) - ingestão de lipídios totais menor ou igual a 30% do valor energético total (VET) e grupo B (GB) -

ingestão de lipídios totais maior que 30% do VET, formados por 5 (20%) e 20 (80%) mulheres, respectivamente.

Na Tabela 2 são apresentadas as características antropométricas e bioquímicas dos grupos A e B. Foi encontrada diferença significativa no IMC e no cálculo de HOMA-IR ($p < 0,05$), sendo superiores nas mulheres que consumiam maior quantidade de lipídios totais na dieta habitual (GB).

Ambos os grupos apresentaram acúmulo excessivo de gordura abdominal, segundo a CC (IDF, 2005).

Tabela 2: Variáveis antropométricas e bioquímicas (média \pm desvio padrão) dos grupos A e B.

Variável	Grupo A (n=5)		Grupo B (n=20)		p-valor ²
	Média	DP ¹	Média	DP	
Idade (anos)	34,0	7,7	36,9	7,0	0,43
Peso (kg)	109,4	8,8	120,9	12,3	0,06
IMC ³ (kg/m ²)	41,7	0,8	45,4	4,6	< 0,01*
CC ⁴ (cm)	120,3	3,4	124,6	9,4	0,11
Glicose jejum (mg/dL)	85,6	13,9	97,4	20,7	0,24
Glicose 1h após dieta (mg/dL)	90,6	16,8	109,8	32,4	0,22
Glicose 2h após dieta (mg/dL)	91,4	17,5	100,5	32,2	0,55
Insulina jejum (μ U/mL)	10,7	2,0	14,2	7,3	0,07
Insulina 1h após dieta (μ U/mL)	46,2	19,6	73,3	52,4	0,08
Insulina 2h após dieta (μ U/mL)	37,3	20,3	47,8	24,6	0,39
HOMA-IR ⁵	2,3	0,7	3,6	2,2	0,04*
QUICKI ⁶	0,34	0,02	0,33	0,05	0,62
Colesterol total (mg/dL)	184,4	15,3	201,2	43,3	0,17
Colesterol LDL (mg/dL)	113,8	14,5	132,8	35,5	0,08
Colesterol HDL (mg/dL)	46,4	13,7	47,4	12,2	0,87
Triglicéridios (mg/dL)	121,8	90,6	105,4	55,2	0,61

Grupo A – ingestão habitual de lipídios totais \leq 30% VET; Grupo B - ingestão habitual de lipídios totais $>$ 30% VET. ¹ Desvio padrão; ² diferenças entre os grupos foram testadas com teste *t*-Student não pareado; ³ índice de massa corporal; ⁴ circunferência da cintura; ⁵ *Homeostasis Model Assessment*; ⁶ *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*. * $p < 0,05$.

As variações nas concentrações de glicose e insulina antes e após a administração da refeição teste em GA e GB podem ser observadas na Figura 4.

Os dois grupos demonstraram valores médios de glicemia de jejum normais (ADA, 2007), bem como insulina de jejum acima do recomendado (SÁNCHEZ-MARGALET *et al.*,

2002), todavia, GB apresentou valores superiores para glicose plasmática e insulina sérica em todos os tempos de coleta. Como citado anteriormente, o cálculo de HOMA-IR também foi superior neste grupo (3,6 e 2,3, em GB e GA, respectivamente).

Considerando-se os indicadores de resistência e de sensibilidade à insulina, apenas GB demonstrou resistência ao hormônio, segundo HOMA-IR (HOMA-IR > 2,71) (GELONEZE *et al*, 2005), contudo, de acordo com o cálculo de QUICKI, ambos os grupos apresentavam SI adequada.

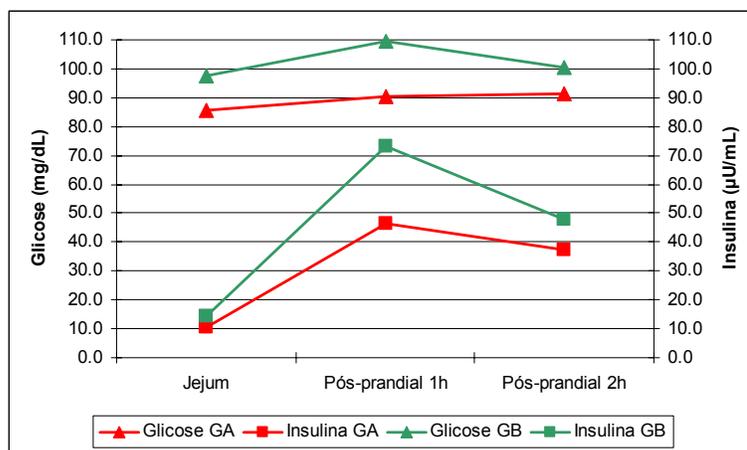


Figura 4: Concentrações de glicose plasmática (mg/dL) e de insulina sérica (µU/mL) em jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais dos grupos A (GA) e B (GB).

Quanto ao perfil lipídico, em média, ambos os grupos apresentaram valores normais para triglicerídios e baixas concentrações de HDL-colesterol (III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001).

Observou-se ampla variabilidade nas concentrações de triglicerídios em ambos os grupos, entretanto, somente 20% de GA (n=1) e 15% de GB (n=3) apresentaram valores acima da normalidade.

O grupo com alta ingestão de lipídios (GB) apresentou valores médios levemente alterados de colesterol total e LDL-colesterol. Das 20 voluntárias deste grupo, 50% (n=10) e

55% (n=11) possuíam valores acima do recomendado para colesterol total e LDL-colesterol, respectivamente.

Em relação à qualidade dos lipídios ingeridos, GB apresentou maior ingestão de ácidos graxos saturados (AGS) e monoinsaturados (AGMI), com diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com GA. Apesar dos ácidos graxos polinsaturados (AGPI) não diferirem entre os grupos, houve tendência à maior ingestão em GB (Tabela 3).

Tabela 3: Composição lipídica da dieta habitual das mulheres dos grupos A e B.

Variável	Grupo A (n=5)		Grupo B (n=20)		p-valor ²
	Média	DP ¹	Média	DP	
Lipídios totais (%)	28,3	2,1	37,8	4,8	< 0,01*
AGMI ³ (%)	9,5	1,6	14,2	2,6	< 0,01*
AGS ⁴ (%)	9,6	1,9	13,4	2,9	0,01*
AGPI ⁵ (%)	5,6	1,8	7,0	2,0	0,17

¹ Desvio padrão; ² diferenças entre os grupos foram testadas com teste *t*-Student não pareado;

³ ácidos graxos monoinsaturados; ⁴ ácidos graxos saturados; ⁵ ácidos graxos polinsaturados.

* $p < 0,05$.

Em GB, a ingestão habitual de lipídios (%) correlacionou-se positivamente com a ingestão habitual de AGS e de AGMI ($r = 0,63$ e $0,83$, respectivamente e $p < 0,05$) e com QUICKI ($r = 0,50$, $p < 0,05$) e, negativamente com os valores de insulina de jejum ($r = - 0,49$, $p < 0,05$) e de HOMA-IR ($r = - 0,54$, $p < 0,05$). No mesmo grupo, a ingestão habitual de AGMI correlacionou-se negativamente com as concentrações de glicose ($r = - 0,45$, $p < 0,05$) e de insulina de jejum ($r = - 0,51$, $p < 0,05$) e com o valor de HOMA-IR ($r = - 0,55$, $p < 0,05$) (Tabela 4) e, positivamente com QUICKI ($r = 0,59$, $p < 0,05$).

Tabela 4: Estimativa dos coeficientes de correlação dos percentuais de ingestão habitual de lipídios, ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), índice de massa corporal (IMC), glicose de jejum (Glic0), insulina de jejum (Ins0), HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) e QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*), dos grupos A e B.

	Grupo A (n=5)		Grupo B (n=20)	
	r ¹	p-valor	r ¹	p-valor
LIPÍDIOS (%)²				
AGS (%) ³	0,34	0,58	0,63	< 0,01**
AGMI (%) ⁴	0,66	0,23	0,83	< 0,01**
AGPI (%) ⁵	0,29	0,64	0,32	0,17
IMC ⁶	- 0,08	0,90	- 0,21	0,39
Glic T0 ⁷ (mg/dL)	0,23	0,71	- 0,43	0,06
Ins T0 ⁸ (μU/mL)	- 0,02	0,97	- 0,49	0,03*
HOMA-IR ⁹	0,14	0,83	- 0,54	0,01*
QUICKI ¹⁰	0,10	0,87	0,50	0,03*
AGS (%)³				
IMC ⁶	- 0,70	0,18	- 0,04	0,88
Glic T0 ⁷ (mg/dL)	0,02	0,97	0,03	0,89
Ins T0 ⁸ (μU/mL)	0,51	0,38	- 0,24	0,31
HOMA-IR ⁹	0,35	0,57	- 0,19	0,42
QUICKI ¹⁰	- 0,26	0,67	0,16	0,50
AGPI (%)⁵				
IMC ⁶	0,78	0,12	- 0,23	0,33
Glic T0 ⁷ (mg/dL)	- 0,04	0,95	- 0,34	0,14
Ins T0 ⁸ (μU/mL)	- 0,67	0,22	- 0,23	0,32
HOMA-IR ⁹	- 0,45	0,45	- 0,30	0,19
QUICKI ¹⁰	0,50	0,39	0,23	0,33
AGMI (%)⁴				
IMC ⁶	0,28	0,65	- 0,05	0,85
Glic T0 ⁷ (mg/dL)	0,33	0,58	- 0,45	0,04*
Ins T0 ⁸ (μU/mL)	- 0,18	0,77	- 0,51	0,02*
HOMA-IR ⁹	0,08	0,90	- 0,55	0,01*
QUICKI ¹⁰	0,05	0,94	0,59	0,01*

¹ Coeficiente de correlação de Pearson; ² ingestão habitual de lipídios (%); ³ ingestão habitual de ácidos graxos saturados (%); ⁴ ingestão habitual de ácidos graxos monoinsaturados (%); ⁵ ingestão habitual de ácidos graxos polinsaturados (%); ⁶ índice de massa corporal; ⁷ glicose jejum; ⁸ insulina jejum; ⁹ *Homeostasis Model Assessment*; ¹⁰ *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*. * p < 0,05; ** p < 0,01.

DISCUSSÃO

A obesidade já é considerada uma epidemia global, estando associada à gênese de outras doenças crônicas não-transmissíveis, como diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007). Constitui um problema complexo, de origem multifatorial e dentre os fatores etiológicos envolvidos, merecem destaque às interações gene-ambiente (PÉRUSSE e BOUCHARD, 2000; MARQUES-LOPES *et al.*, 2004).

Na maioria dos casos, a obesidade é de origem poligênica, envolvendo interações complexas entre gene-gene e gene-ambiente, o que caracteriza o fenótipo de obesidade multifatorial (FROGUEL e BOUTIN, 2001; CECIL *et al.*, 2006; FAROOQI e O'RAHILLY, 2007).

Nos últimos anos, o tecido adiposo (TA) deixou de ser visto apenas como uma massa inerte de energia estocada, sendo reconhecido como um dos principais responsáveis por diversos processos metabólicos, com ênfase no equilíbrio energético e na homeostase da glicose (ROSEN e MACDOUGALD, 2006; ROSEN e SPIEGELMAN, 2006).

Dentre os genes e fatores de transcrição que regulam a adipogênese, o receptor nuclear PPAR γ tem se destacado (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1999; KERSTEN *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2005; CECIL *et al.*, 2006; ROSEN e MACDOUGALD, 2006). Além disso, ligantes do PPAR γ têm demonstrado excelente atividade anti-diabética embora grande parte deste fator de transcrição seja encontrado no TA e não no músculo (ROSEN e MACDOUGALD, 2006).

A ocorrência do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ 2, caracterizada pela substituição do aminoácido prolina pela alanina do códon 12, vem sendo intensamente documentada nos últimos anos devido a influência deste gene no metabolismo da glicose e do tecido adiposo (TA).

No grupo estudado, verificou-se que apenas 3,85% (n=1) apresentou o polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ 2. A frequência dos alelos Pro e Ala foi de 0,98 e 0,02 e dos genótipos Pro12Pro e Pro12Ala foi de 0,96 e 0,04, respectivamente. Devido à baixa frequência do polimorfismo investigado, esta voluntária foi excluída do estudo e incluiu-se apenas o genótipo Pro12Pro nas análises.

A ocorrência deste polimorfismo é bastante variável, conforme demonstrado nos estudos. A frequência do alelo ala em outras populações varia de 0,01 entre chineses a 0,12 entre caucasianos (YEN *et al.*, 1997). Na população brasileira, existem poucos dados sobre a ocorrência dos genótipos Pro12Ala e Ala12Ala do gene PPAR γ 2. Alguns autores encontraram frequência de cerca de 0,10 do alelo variante em indivíduos com diabetes não insulino dependente (TAVARES *et al.*, 2005; MATTEVI *et al.*, 2007), enquanto que Vieira-Filho *et al.* (2004) reportaram frequência de 0,31 em índios da região Amazônica.

Estudos que avaliaram a frequência deste polimorfismo em indivíduos com obesidade grau 3 são muito escassos. Em uma amostra composta por 703 franceses com obesidade mórbida, Vasseur *et al.* (2005) demonstraram que a prevalência do genótipo Pro12Ala foi idêntica entre obesos mórbidos diabéticos e normoglicêmicos (0,89). Sesti *et al.* (2005) avaliaram caucasianos com obesidade grau 3 e verificaram que 14,1% possuíam o variante heterozigoto.

Além da carência de estudos que avaliem a ocorrência do alelo ala na população brasileira, as pesquisas existentes não fizeram distinção quanto ao estado nutricional dos indivíduos (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2005), incluindo em sua amostra desde indivíduos com baixo peso até obesos de grau 3 (MATTEVI *et al.*, 2007). Tal fato demonstra a escassez de informações a respeito da frequência do polimorfismo do gene PPAR γ 2 em indivíduos com obesidade avançada.

No presente estudo, embora não tenha sido possível formar um grupo com polimorfismo, foi possível analisar a influência do genótipo selvagem (Pro12Pro), associado à adiposidade e à ingestão de AGPI na insulinemia e glicemia de mulheres obesas de grau 3. Conforme reportado por Robitaille *et al.* (2003), indivíduos homocigotos Pro12 parecem ser mais sensíveis a diferentes estímulos ambientais, destacando-se a ingestão de lipídios.

A influência da adiposidade nas concentrações sanguíneas de glicose e de insulina e, conseqüentemente na resposta à ação da insulina, já está bem demonstrada na literatura científica (SCHEEN, 2000; LENHARD & GOTTSCHALK, 2002; GAGLIARDI, 2004; ROSEN & SPIEGELMAN, 2006).

Sabendo-se que a obesidade constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina (RI) (LENHARD e GOTTSCHALK, 2002), no presente estudo, as voluntárias foram divididas em grupos de acordo com a massa corporal, tendo como base os valores de IMC. Como esperado, verificou-se diferença significativa para as variáveis peso corporal, IMC e CC entre G1 (IMC entre 40 e 45 kg/m²) e G2 (IMC > 45 kg/m²).

G1 e G2 apresentaram valores médios de insulina de jejum acima de 9 µU/mL, indicando um estado de hiperinsulinemia, segundo Sánchez-Margalet *et al.* (2002).

Quanto às concentrações plasmáticas de glicose de jejum, G1 apresentou valor médio normal, em contrapartida o grupo 2, composto por mulheres com maior grau de IMC, demonstrou valor médio levemente alterado, considerando que a ADA (2007) recomenda valores inferiores a 100 mg/dL. No grupo de maior IMC (G2), metade das voluntárias apresentava glicemia de jejum alterada.

Há poucas informações a cerca do tipo de AGPI mais potente para a ativação do PPAR γ , pois a grande maioria dos autores não faz distinção quanto ao tipo de AGPI utilizado.

Em raras pesquisas, diferentes tipos de AGPI foram testados simultaneamente (SPURLOCK *et al.*, 2000; CHAMBRIER *et al.*, 2002).

No estudo de Spurlock *et al.* (2000), os animais que receberam dieta suplementada com óleo de açafrão (cerca de 80% de ácido linoléico – 18:2 n-6) apresentaram níveis de mRNA de PPAR γ 2 quadruplicados em relação ao grupo controle.

Com o objetivo de analisar os efeitos da ingestão de AGPI da série n-6, ligante natural do PPAR γ 2, nas concentrações de glicose e de insulina pós-prandiais foi oferecido um jejum com cerca de 15% do VET deste tipo de lipídio. Em ambos os grupos, houve aumento da glicemia e da insulinemia uma hora após a ingestão da refeição teste, seguido de queda duas horas após a ingestão da refeição (Figura 3), o que pode sugerir que houve resposta na secreção de insulina frente à dieta oferecida, apesar da redução na sensibilidade à insulina (SI) normalmente detectada em mulheres com obesidade mórbida.

Apesar da não significância ($p > 0,05$), as mulheres com maior IMC (G2) apresentaram maior pico de secreção de insulina 1 hora após a ingestão da refeição teste, comparadas com G1 (Figura 3), além do cálculo de HOMA-IR superior e do valor de QUICKI abaixo do esperado, refletindo RI. Com base nestes resultados, é importante enfatizar que apesar da ausência de significância estatística, as diferenças observadas entre os grupos possuem grande significado fisiológico, tendo em vista os efeitos negativos da RI na gênese de complicações metabólicas relacionadas com a obesidade.

Considerando-se a avaliação da RI pelo cálculo de HOMA-IR, ambos os grupos apresentavam resistência ao hormônio, segundo Geloneze *et al.* (2005). Em contrapartida, ao avaliar a SI pelo cálculo de QUICKI, G1 demonstrou adequada sensibilidade ao hormônio, porém, o grupo composto por mulheres com maior adiposidade (G2) apresentou baixa SI.

Além da adiposidade e da predisposição genética, fatores dietéticos têm sido associados com a patogênese da RI, especialmente a elevada ingestão de lipídios (LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000; BISSCHOP *et al.*, 2001).

A SI também é afetada pela qualidade do lipídio dietético, independentemente de seus efeitos no peso corporal. Estudos evidenciam que o lipídio saturado (AGS) está associado com intolerância à glicose, entretanto, lipídios insaturadas melhoram a resposta à insulina (LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000; STORLIEN *et al.*, 2000; WHO, 2003; RICCARDI *et al.*, 2004).

Os benefícios dos AGPI na SI são decorrentes de modificações na composição das membranas celulares (RICCARDI *et al.*, 2004; LOMBARDO & CHICCO, 2006;), alterações na produção de adipocinas como TNF- α e adiponectina (FLACHS *et al.*, 2006; PÉREZ-MATUTE *et al.*, 2007), além do controle da transcrição de genes específicos, incluindo aqueles envolvidos no metabolismo lipídico e da glicose, como é o caso do PPAR γ 2 (CLARKE, 2000; SPURLOCK *et al.*, 2000; CLARKE, 2001; LOMBARDO & CHICCO, 2006).

Considerando-se a divisão de grupos segundo a ingestão habitual de lipídios totais, os resultados demonstram claramente o efeito do excesso de lipídios dietéticos tanto no peso corporal, quanto na RI, visto que a as mulheres de GB (> 30% VET de lipídios) apresentavam maior IMC, além de RI constatada pelo cálculo de HOMA-IR, diferentemente de GA (< 30% VET de lipídios), no qual não foi detectada RI (HOMA-IR = 2,3) (GELONEZE *et al.*, 2005). Contudo, a estimativa da SI não demonstrou diferença entre os grupos (QUICKI = 0,34 \pm 0,02 e 0,33 \pm 0,05, para GA e GB, respectivamente). O fator ambiental exerceu forte influência em relação aos parâmetros avaliados, destacando-se o IMC e a RI.

Os grupos A e B tiveram valores médios de insulina de jejum acima de 9 μ U/mL, indicando estado de hiperinsulinemia, segundo Sánchez-Margalet *et al.* (2002). Mesmo sem

significância estatística ($p > 0,05$), cabe ressaltar que o grupo com ingestão elevada de lipídios (GB) demonstrou valor médio de insulina de jejum considerável, comparado a GA que consumia menos lipídios (14,2 $\mu\text{U/mL}$ vs. 10,7 $\mu\text{U/mL}$).

Além disso, embora em média GB tenha apresentado glicemia de jejum normal, 40% das voluntárias ($n=8$) apresentaram valores inadequados (≥ 100) (ADA, 2007).

Salientamos que o tipo de ácido graxo ingerido, independente da quantidade total, apresenta influência no peso corporal, perfil lipídico e RI. Em GB, além da ingestão excessiva de lipídios, sugere-se que a alta ingestão de AGS ($p < 0,05$) favoreceu a RI e o ganho de peso. Como destacado por alguns autores, os AGS possuem menor efeito sobre a saciedade (LAWTON *et al.*, 2000), são pobremente oxidados para gerar energia, sendo estocados, são dificilmente mobilizados por estímulo lipolítico e aumentam a expressão dos genes associados com a proliferação dos adipócitos, estando fortemente relacionados ao desenvolvimento da obesidade e da RI (STORLIEN *et al.*, 2000; SARAVANAN *et al.*, 2005).

Possivelmente, a redução da SI proporcionada pelos AGS possa ser decorrente do aumento dos níveis de mRNA de resistina e lipase lipoprotéica e redução de adiponectina e GLUT4, além dos seus efeitos na composição de ácidos graxos das membranas celulares fosfolipídicas (SARAVANAN *et al.*, 2005).

Mesmo sem significância estatística ($p > 0,05$), o grupo B apresentou maiores valores de glicose plasmática e de insulina sérica em todos os tempos de coleta (jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais), assim como maior valor de HOMA-IR ($p < 0,05$), demonstrando que as mulheres que consumiam habitualmente maior percentual de lipídios apresentaram menor SI, independente da dieta em curto prazo, visto que a refeição teste utilizada foi idêntica para os dois grupos.

Considerando o genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2, a literatura demonstra que a ativação do gene por ligantes está associada com a expressão de enzimas envolvidas na

captação e no transporte de ácidos graxos, levando ao aumento no armazenamento de gorduras pelos adipócitos e, conseqüentemente, menores concentrações de ácidos graxos livres plasmáticos. Desta forma, ocorre menor deposição de gorduras e do efeito tóxico destas no fígado e nos tecidos musculares, proporcionando aumento na SI nestes tecidos (ANAYA e ARIZA, 2004).

Tendo em vista que todas as voluntárias apresentavam o genótipo Pro12Pro e devido a ausência de significância na ingestão de AGPI (ligante do PPAR γ 2) entre os grupos, pode-se sugerir que as concentrações elevadas de glicose e insulina e os valores significantes de HOMA-IR e IMC observadas em GB foram decorrentes da ingestão habitual de lipídios (fator ambiental), com destaque para o consumo elevado de AGS. Conforme recomendação de Rosado *et al.* (2006), indivíduos com o genótipo Pro12Pro deveriam controlar a ingestão de gorduras totais e de AGS devido à baixa capacidade de oxidação dos mesmos, em contrapartida, portadores do alelo ala no gene PPAR γ 2 demonstraram aumento na oxidação de gorduras, avaliada por calorimetria indireta. Ademais, a presença do alelo variante neste gene sugere benefícios no controle da ingestão alimentar e facilidade para perda de peso diante de uma dieta rica em lipídios (ROSADO *et al.*, 2007).

Robitaille *et al.* (2003) ressaltaram que embora os AGPI sejam considerados os ligantes naturais preferenciais do PPAR γ 2, os AGS também são capazes de promover a ativação do gene em menor extensão. Portanto, um aumento na ingestão de lipídios totais e saturados favorece a ligação do PPAR γ ao elemento responsivo (PPRE) de genes alvos da lipogênese. Em portadores do alelo Ala12, um aumento na ingestão de ácidos graxos teria pouco ou nenhum efeito na lipogênese devido a baixa afinidade de ligação do complexo ácido graxo-PPAR γ com o PPRE dos genes alvos. Segundo Deeb *et al.* (1998), a isoforma Ala pode levar ao estímulo menos eficaz dos genes alvos do PPAR γ e predispor ao menor acúmulo de tecido adiposo, que pode ser responsável pelo aumento da SI.

A análise de correlação demonstrou que as mulheres que ingeriam lipídios totais acima do recomendado (GB), priorizavam AGS e AGMI, sendo que o aumento na ingestão de lipídios apresentou maior correlação com a ingestão de AGMI ($r = 0,83$). No mesmo grupo, a ingestão habitual de lipídios (%) correlacionou-se negativamente com os valores de insulina de jejum e de HOMA-IR e positivamente com o cálculo de QUICKI, sugerindo que quanto maior a ingestão de lipídios, menor a concentração de insulina e a resistência à sua ação, além de maior sensibilidade à mesma. Tendo em vista as fortes correlações positivas altamente significantes, encontradas entre ingestão de lipídios e AGMI ($r = 0,83$, $p < 0,01$) e AGMI e QUICKI ($r = 0,59$, $p < 0,01$), é provável que este tipo de lipídio tenha sido responsável pela redução do impacto da dieta hiperlipídica na RI. Possivelmente, os mesmos efeitos não tenham sido detectados nas mulheres que consumiam quantidades adequadas de lipídios totais (GA) devido a menor ingestão habitual de AGMI verificada neste grupo comparado a GB (9,5% vs. 14,2%) (Tabela 3). Convém salientar que de acordo com as recomendações nutricionais do Consenso Latino-Americano sobre Obesidade (1999), a ingestão de AGMI deve ser correspondente a 13% do VET.

Confirmando a hipótese acima, ainda no grupo B, a ingestão habitual de AGMI correlacionou-se negativamente com as concentrações de glicose e de insulina em jejum e com o valor de HOMA-IR, o que reforça o papel deste tipo de lipídio na melhora da SI.

Estudos citados anteriormente salientam que os resultados controversos verificados em algumas pesquisas podem ser atribuídos a diferentes aspectos quanto à heterogeneidade das populações estudadas, destacando-se fenótipos clínicos como magreza e obesidade; o tipo de estudo; a população em questão e aspectos clínicos desta; a composição lipídica da dieta; interações gene-gene ou gene-ambiente, dentre outros. Em nosso estudo, buscamos contornar alguns fatores listados acima, considerando que a população foi homogênea, pois trabalhamos apenas com mulheres obesas de grau 3, com características físicas, bioquímicas e clínicas

semelhantes; num estudo de intervenção em curto prazo; incluindo avaliação da ingestão dietética habitual e a interação gene-ambiente.

Observou-se que após a ingestão da refeição rica em AGPI da série n-6, todos os grupos apresentaram valores normais de glicose pós-prandial, (< 140 mg/dL) (ADA, 2007). Contudo, as mulheres com maior IMC (G2) e com alta ingestão habitual de lipídios (GB) apresentaram uma maior secreção de insulina (1 hora e 2 horas pós-prandiais) para manter o controle glicêmico.

De acordo com a divisão dos grupos por ingestão habitual de lipídios totais, os grupos A e B apresentavam ingestão média de $5,6 \pm 1,8\%$ e $7,0 \pm 2,0\%$ do VET sob a forma de AGPI, respectivamente, estando abaixo das recomendações para obesos de 10% do VET (Documento do Consenso Latino-Americano sobre Obesidade, 1999).

No presente estudo, a ingestão habitual de AGPI não se correlacionou com marcadores de RI (glicose, insulina e HOMA-IR). Talvez, diante de uma maior ingestão deste tipo de lipídio, entre 10 e 15% do VET, conforme proposto na refeição teste, poderíamos ter detectado efeitos positivos em relação a SI. No entanto, como a SI é analisada em jejum, não foi possível realizar a mesma após a refeição teste, sendo necessário um estudo longitudinal. Este tipo de estudo foi conduzido em trabalho paralelo realizado pelo grupo de pesquisa.

Outra questão que vale ressaltar é o tipo de AGPI envolvido. Sabemos que os AGPI da série 6 são os mais ingeridos por esta população, visto que as principais fontes deste ácido graxo são as gorduras de origem vegetal (margarinas, óleos de soja, milho e girassol) (TACO, 2006). Em contrapartida, há baixa ingestão de AGPI da série n-3, os quais estão presentes especialmente em peixes de água muito fria (TACO, 2006).

Em resumo, as mulheres com maior massa corporal demonstraram maior RI, o que sugere diferenças metabólicas importantes entre os grupos compostos por obesas de grau 3. A ingestão excessiva de lipídios e de AGS contribuiu para a adiposidade e para a RI. Contudo, a

ingestão de AGMI pode ter reduzido o impacto da dieta hiperlipídica no metabolismo da glicose.

Torna-se fundamental a realização de estudos que avaliem os efeitos dos AGPI, fazendo distinção entre as séries n-3 e n-6, além da análise de outros genes candidatos à obesidade associados a fatores ambientais, particularmente dietéticos. Salientamos que o gene avaliado no presente estudo pode ser regulado nutricionalmente, assim como outros genes relacionados à obesidade, o que reforça a necessidade de pesquisas que simplifiquem a análise de expressão gênica, permitindo estudos de interação gene-nutriente.

Diante do exposto, sugerimos que indivíduos sem o polimorfismo no gene devem evitar a ingestão excessiva de lipídios totais ($\geq 30\%$ do VET), principalmente de AGS, priorizando a ingestão de gorduras insaturadas, principalmente AGMI, com o objetivo de evitar o ganho de peso e melhorar a SI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 30, (Supl.I), p.S42-S47, 2007.

ANAYA, C. O. M.; ARIZA, I. D. S. Avances en obesidad. **Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia**, v.52, n.4, p.270-86, 2004.

AUBOEUF, D.; RIEUSSET, J.; FAJAS, L.; VALLIER, P.; FRERING, V.; RIOU, J. P.; STAELS, B.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**, v.46, p.1319-27, 1997.

BISSCHOP, P. H.; METZ, J.; ACKERMANS, M. T.; ENDERT, E.; PIJL, H.; KUIPERS, F.; MEIJER, A. J.; SAUERWEIN, H. P.; ROMIJN, J. A. Dietary fat content alters insulin-mediated glucose metabolism in healthy men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.554-9, 2001.

BONNEAU, G. A.; RASCON, C. M. S.; PEDROZO, W. R.; CEBALLOS, B.; LEIVA, R. BLANCO, N.; BERG, G. Presencia de insulinoresistencia en Síndrome metabólico. **Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo**, v.43, p.215-23, 2006.

BUZZETTI, R.; PETRONE, A.; RIBAUDO, M. C.; ALEMANNI, I.; ZAVARELLA, S.; MEIN, C. A.; MAIANI, F.; TIBERTI, C.; BARONI, M. G.; VECCI, E.; ARCA, M.; LEONETTI, F.; MARIO, U. D. The common PPAR- γ 2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. **European Journal of Human Genetics**, v.12, p.1050-4, 2004.

CARPENTIER, Y. A.; PORTOIS, L.; MALAISSE, W. J. n-3 Fatty acids and the metabolic syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83(suppl), p.1499S-504S, 2006.

CECIL, J. E.; WATT, P.; PALMER, C. N.; HETHERINGTON, M. Energy balance and food intake: The role of PPAR γ gene polymorphisms. **Physiology & Behavior**, v.88, p.227-33, 2006.

CHAMBRIER, C.; BASTARD, J. P.; RIEUSSET, J.; CHEVILLOTTE, E.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; THEROND, P.; HAINQUE, B.; RIOU, J. P.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Obesity Research**, v.10, n.6, p.518-25, 2002.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **The British Journal of Nutrition**, v.83 (Suppl.1), p.S59-66, 2000.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1129-32, 2001.

DEEB, S. S.; FAJAS, L.; NEMOTO, M.; PIHLAJAMÄKI, J.; MYKKÄNEN, L.; KUUSISTO, J.; LAAKSO, M.; FUJIMOTO, W.; AUWERX, J. A. Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decrease receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nature Genetics**, v.20, p.284-7, 1998.

Diretrizes Brasileiras de Obesidade, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2007.

III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.77 (Supl.III), p.1-48, 2001.

Documento do Consenso Latino-Americano sobre Obesidade, Ministério da Saúde, 1999.
FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetic factors in human obesity. **Obesity Reviews**, v.8, suppl.1, p.37-40, 2007.

FLACHS, P.; MOHAMED-ALI, V.; HORAKOVA, O.; ROSSMEISL, M.; HOSSEINZADEH-ATTAR, M. J.; HENSLER, M.; RUZICKOVA, J.; KOPECKY, J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**, v.49, n.2, 2006.

FOOD PROCESSOR NUTRITION ANALYSIS SYSTEM. Version 12.0. ESHA Corporation: USA, 1984.

FRIEDWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

FROGUEL, P.; BOUTIN, P. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.11, p.991-6, 2001.

GAGLIARDI, A. R. T. Obesidade central, bases hormonais e moleculares da síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.4, p.557-66, 2004.

GELONEZE, B.; GELONEZE, S. R.; ERMETICE, M. N.; REPETTO, E. M.; TAMBASCIA, M. A. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population. IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.72, n.2, p.219-20, 2006.

GEN BANK DNA. AB005520. *Homo sapiens ppar* [gi:2605488]. www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank. Acesso em 24/01/2003.

GIBSON, R. S. **Principles of nutritional assessment**. New York: Oxford, 1990. 691 p.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. **The Lancet Oncology**, v.5, p.419-29, 2004.

JONES, J. R.; BARRICK, C.; KIM, K.; LINDNER, J.; BLONDEAU, B.; FUJIMOTO, Y.; SHIOTA, M.; KESTERSON, R. A.; KAHN, B. B.; MAGNUSON, M. A. Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, n.17, p.6207–12, 2005.

KANUNFRE, C. A. PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma um receptor nuclear para ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura – os ácidos graxos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002. Cap.18, p.227-48.

KATZ, A.; NAMBI, S. S.; MATHER, K.; BARON, A. D.; FOLLMANN, D. A.; SULLIVAN, G.; QUON, M. J. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n.7, p.2402-10, 2000.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and diseases. **Nature**, v.405, n.25, p.421-4, 2000.

KOSTNER, G. M.; AVOGARO, P.; BOM, G. B.; CAZZOLATO, G.; QUINCI, G. B. Determination of high-density lipoproteins screening methods compared. **Clinical Chemistry**, v.25, p.939-42, 1979.

KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MIKI, H.; TAMEMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; KOMEDA, K.; SATOH, S.; NAKANO, R.; ISHII, C.; SUGIYAMA, T.; ETO, K.; TSUBAMOTO, Y.; OKUNO, A.; MURAKAMI, K.; SEKIHARA, H.; HASEGAWA, G.; NAITO, M.; TOYOSHIMA, Y.; TANAKA, S.; SHIOTA, K.; KITAMURA, T.; FUJITA, T.; EZAKI, O.; AIZAWA, S.; KADOWAKI, T. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Molecular Cell**, v.4, n.4, p.597-609, 1999.

LAWTON, C. L.; DELARGY, H. J.; BROCKMAN, J.; SMITH, F. C.; BLUNDELL, J. E. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. **British Journal of Nutrition**, v.83, p.473-82, 2000.

LENHARD, J. M.; GOTTSCHALK, W. K. Preclinical development in type 2 diabetes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.1199-212, 2002.

LICHTENSTEIN, A. H.; SCHWAB, U. S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. **Atherosclerosis**, v.150, p.227-43, 2000.

LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.1-13, 2006.

LOTT, J. A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v.21, n.12, p.1754-60, 1975.

MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTINEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.327-38, 2004.

MATTEVI, V. S.; ZEMBRZUSKI, V. M.; HUTZ, M. H. Effects of a PPAR γ gene variant on obesity characteristics in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.927-32, 2007.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, B. A.; NAYLOR D. F.; TREACHER D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, p.412-19, 1985.

MCGOWAN, M. W.; ARTISS, J. D.; STRANDBERGH, D. R.; ZAK, B. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, v.29, p.538-42, 1983.

MEIRHAEGHE, A.; FAJAS, L.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AUWERX, J.; DEEB, S. S.; ARMOUYEL, P. Impact of the peroxisome proliferator Activated Receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.24, p.195-9, 2000.

MUELLER, E.; DRORI, S.; AIYER, A.; YIE, J.; SARRAF, P.; CHEN, H.; HAUSER, S.; ROSEN, E. D.; GE, K.; ROEDER, R. G.; SPIEGELMAN, B. M. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor γ isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.44, p.41925-30, 2002.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos. Ginebra, 1985.

PÉGORIER, J. P.; LE MAY, C.; GIRARD, J. Control of gene expression by fatty acids. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.2444S-49S, 2004.

PÉREZ-MATUTE, P.; PÉREZ-ECHARRI, N.; MARTINEZ, J. A.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . **British Journal of Nutrition**, v.97, p.389-98, 2007.

PÉRUSSE, L.; BOUCHARD, C. Gene-diet interactions in obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p. 1285S-90S, 2000.

PIHLAJAMAKI, J.; MIETTINEN, R.; VALVE, R.; KARJALAINEN, L.; MYKKANEN, L.; KUUSISTO, J.; DEEB, S.; AUWERX, J.; LAAKSO, M. The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in non-diabetic elderly subjects with dyslipidemia. **Atherosclerosis**, v.15, p.567-74, 2000.

REEVES, W. G. Insulin antibody determination: theoretical and practical considerations. **Diabetologia**, v.24, p.399-403, 1983.

RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A. A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, v.23, p.447-56, 2004.

RICHMOND, W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. **Clinical Chemistry**, v.19, p.1350-56, 1973.

RIEUSSET, J.; ANDREELLI, F.; AUBOEUF, D.; ROQUES, M.; VALLIER, P.; RIOU, J. P.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human adipocytes. **Diabetes**, v.48, p.699-705, 1999.

ROBITAILLE, J.; DESPRÉS, J-P.; PÉRUSSE, L.; VOHL, M-C. The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Québec Family Study. **Clinical Genetics**, v.63, p.109-16, 2003.

ROSADO, E. L.; BRESSAN, J.; HERNÁNDEZ, J. A. M.; MARTINS, M. F.; CECON, P. R. Efecto de la dieta y de los genes PPAR γ 2 y β 2-adrenérgico en el metabolismo energético y en la composición corporal de mujeres obesas. **Nutrición Hospitalaria**, v.21, n.3, p.317-31, 2006.

ROSADO, E. L.; BRESSAN, J.; MARTINS, M. F.; CECON, P. R.; MARTÍNEZ, J. A. Polymorphism in the PPAR γ 2 and beta2-adrenergic genes and diet lipid effects on body composition, energy expenditure and eating behavior of obese women. **Appetite**, v.49, n.3, p.635-43, 2007.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews**, v.7, p.885-96, 2006.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, p.847-53, 2006.

ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes and Development**, v.14, p.1293-307, 2000.

SÁNCHEZ-MARGALET, V.; VALLE, M.; RUZ, F. J.; GASCÓN, F.; MATEO, J.; GOBERNA, R. Elevated plasma total homocysteine levels in hyperinsulinemic obese subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.75-79, 2002.

SARAVANAN, N.; HASEEB, A.; EHTESHAM, N. Z.; GHAFORUNISSA. Diferencial efetua de dietético saturou e ácidos trans-gordurosos em expressão de genes associada com sensibilidade de insulina em rato tecido gorduroso. **European Journal of Endocrinology**, v.153, p.159-65, 2005.

SCHEEN, A. J. From obesity to diabetes: why, when and who? **Acta Clinica Belgica**, v.55, n.1, p.9-15, 2000.

SESTI, G.; PEREGO, L.; CARDELLINI, M.; ANDREOZZI, F.; RICASOLI, C.; VEDANI, P.; GUZZI, V.; MARCHI, M.; PAGANELLI, M.; FERLA, G.; PONTIROLI, A. E.; HRIBAL, M. L.; FOLLI, F. Impact of common polymorphisms in candidate genes for insulin resistance and obesity on weight loss of morbidly obese subjects after laparoscopic adjustable gastric banding and hypocaloric diet. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, n.9, p.5064-69, 2005.

SPURLOCK, M. E.; HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P.; CORNELIUS, S. G.; WILLIS, G. M.; BIDWELL, C. A. Regulation of PPAR γ but not obese gene expression by dietary fat supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.260-66, 2000.

STATISTICAL PACKAGE FOR SOCIAL SCIENCES 11.0 (SPSS 11.0) for Mac[®] OS X.

STORLIEN, L. H.; HIGGINS, J. A.; THOMAS, T. C.; BROWN, M. A.; WANG, H. Q.; HUANG, X. F.; ELSE, P. L. Diet composition and insulin action in animal models. **British Journal of Nutrition**, v.83, suppl.1, p.S85-90, 2000.

STUMVOLL, M.; WAHL, H. G.; LOBLEIN, K.; BECKER, R.; MACHICAO, F.; JACOB, S.; HARING, H. Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene is associated with increase antilipolytic insulin sensitivity. **Diabetes**, v.50, p.876-81, 2001.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) / NEPA (Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação) – UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas). Versão II. 2.ed. Campinas: SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.

TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C.; RODRIGUES, A. C.; MONTE, O. ; SALLES, J. E. N.; SCALISSI, N.; SPERANZA, A. C.; HIRATA, M. H. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v.7, p.605–11, 2005.

The International Federation of Diabetes (IDF) consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. **International Diabetes Federation**, 2005.

VASSEUR, F.; HELBECQUE, N.; LOBBENS, S.; VASSEUR-DELANNOY, V.; DINA, C.; CLÉMENT, K.; BOUTIN, P.; KADOWAKI, T.; SCHERER, P. E.; FROGUEL, P. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. **Diabetologia**, v.48, p.892-99, 2005.

VERMA, N. K.; SINGH, J.; DEY, C. S. PPAR- γ expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v.143, p.1006–13, 2004.

VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; LOWELL, B. B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J. S.; MOLLER, D. E. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, v.97, p.2553–61, 1996.

VIEIRA-FILHO, J. P. B.; REIS, A. F.; KASAMATSU, T. S.; TAVARES, E. F.; FRANCO, L. J.; MATIOLI, S. R.; MOISES, R. S. Influence of the polymorphisms Tpr64Arg in the β 3-adrenergic receptor gene and Pro12Ala in the PPAR γ 2 gene on metabolic syndrome-related phenotypes in an indigenous population of the Brazilian Amazon. **Diabetes Care**, v.26, n.2, p.621-22, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. Technical report series 854, p.1-452, Geneva, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: prevention and managing the global epidemic. Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, 2003.

YEN, C-J.; BEAMER, B. A.; NEGRI, C.; SILVER, K.; BROWN, K. A.; YARNALL, D. P.; BURNS, D. K.; ROTH, J.; SHULDINER, A. R. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 missense mutation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.241, p.270-4, 1997.

ZEGHARI, N.; VIDAL, H.; YOUNSI, M.; ZIEGLER, O.; DROUIN, P.; DONNER, M. Adipocyte membrana phospholipids e expressão de PPAR-g em mulheres obesas: relação para hyperinsulinemia. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.279, p.E736-E743, 2000.

**AValiação da expressão do gene PPAR γ 2 em sangue de mulheres
obesas de grau 3 em jejum e pós-prandial**

Vanessa Chaia Kaippert¹, Eliane Lopes Rosado², Edna Maria Morais Oliveira³

1 – Mestranda em Nutrição pelo Programa de Pós-graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

2 – Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Professor Adjunto do Departamento de Nutrição e Dietética do Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ.

3 – Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e Pesquisadora A da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Endereço para correspondência:

Eliane Lopes Rosado

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Nutrição Josué de Castro - Departamento de Nutrição e Dietética

Avenida Brigadeiro Trompovisky , s/n^o, Bloco J, 2^o andar, sala 24 - CEP: 21949-900

e-mail: elianerosado@nutricao.ufrj.br, vanessachaia@uol.com.br

Local de realização do trabalho: Departamento de Nutrição e Dietética, Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ.

Resumo

O receptor nuclear PPAR γ 2 é um fator de transcrição chave na diferenciação dos adipócitos e no metabolismo da glicose. Informações a cerca da expressão do mesmo são escassas e conflitantes. Além disso, poucos estudos avaliaram os efeitos de fatores nutricionais na expressão deste gene em humanos, provavelmente devido a dificuldades no acesso de amostras de tecido adiposo (TA). **Objetivos:** Avaliar a expressão do PPAR γ 2 em amostras de sangue de mulheres obesas de grau 3. **Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue em jejum, 1 hora e 2 horas após a ingestão de refeição rica em ácidos graxos polinsaturados (AGPI) da série n-6. A extração de RNA total das amostras de sangue foi realizada com kit comercial (QIAamp[®]) e TRIzol[®], seguida de síntese de cDNA (RT-PCR), onde diferentes quantidades de RNA total foram testadas. Algumas amostras tratadas com DNase antes da síntese de cDNA. A análise de expressão foi realizada por PCR em tempo real, utilizando-se *primers* e sondas *TaqMan*[®] para o gene alvo e o controle endógeno (rRNA 18S humano) com diferentes volumes de cDNA. A análise da expressão também foi conduzida em amostras de TA humano congelado e fresco com diferentes quantidades de RNA. Nestes tecidos, a extração de RNA total foi realizada com reagente TRIzol[®] e os demais procedimentos foram mantidos. **Resultados:** A PCR em tempo real demonstrou a presença de contaminação nos controles negativos do cDNA. Iniciou-se o tratamento das amostras de RNA com DNase antes da síntese de cDNA, entretanto, este foi suspenso devido a degradação das amostras e, conseqüentemente, ausência de amplificação do PPAR γ 2. Desta forma, a contaminação com DNA genômico foi excluída utilizando-se *primers* específicos para cDNA (exon-exon). O PPAR γ 2 demonstrou amplificação tardia em poucas amostras nos experimentos realizados com cDNA produzido a partir de sangue, porém, o controle endógeno manteve-se constante. Nas amostras de TA congelado, apenas o rRNA 18S apresentou amplificação em todas as amostras. No TA fresco o PPAR γ 2 amplificou independente da quantidade de RNA utilizada (440 ng e 2 μ g) para síntese de cDNA. Resultados semelhantes foram observados para o gene constitutivo. **Conclusões:** A expressão do PPAR γ 2 foi detectada em baixos níveis em algumas amostras de sangue, mesmo utilizando-se a quantidade máxima de RNA total para o cDNA, sugerindo que o gene é pouco expresso em amostras de sangue periférico. Portanto, não foi possível analisar a expressão do PPAR γ 2 em amostras de sangue. Resultados satisfatórios foram obtidos em amostras de TA omental fresco.

Palavras-chave: PPAR γ 2; análise de expressão; sangue; tecido adiposo, obesidade de grau 3; AGPI n-6.

Introdução

Vários genes que regulam o metabolismo no adipócito podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento da obesidade. Entre os genes candidatos, o receptor ativado pela proliferação de peroxissomas da isoforma γ e série 2 (PPAR γ 2) tem se destacado, estando este relacionado a adipogênese (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1999; KERSTEN *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2005; CECIL *et al.*, 2006) e à sensibilidade à insulina (SI) (DEEB *et al.*, 1998; KUBOTA *et al.*, 1999; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; PIHLAJAMAKI *et al.*, 2000; ZEGHARI *et al.*, 2000; STUMVOLL *et al.*, 2001; VERMA *et al.*, 2004).

O PPAR γ é expresso em duas isoformas principais, γ 1 e γ 2, as quais são derivadas do mesmo gene. A série γ 2 possui um adicional de 30 aminoácidos na extremidade N-terminal (MUELLER *et al.*, 2002), porém, apesar desta diferença estrutural, até o momento, não há informações claras a respeito das diferenças funcionais entre as duas isoformas (SEWTER *et al.*, 2002).

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes que constituem uma sub-família de três isoformas: PPAR α , PPAR γ e PPAR β/δ . Estes receptores nucleares exercem funções essenciais na regulação do metabolismo lipídico, as quais variam de acordo com o tipo celular envolvido (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; KANUNFRE, 2002; GROMMES *et al.*, 2004).

Para que possam agir como fatores de transcrição os PPARs precisam formar um heterodímero com outro receptor nuclear, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR), desta forma, o complexo gerado torna-se capaz de se ligar ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE) que está localizado na região promotora dos genes alvos (ROSEN *et al.*, 2000; KANUNFRE, 2002).

Os ligantes endógenos ou naturais do gene incluem ácidos graxos polinsaturados (AGPI) de cadeia longa, derivados de eicosanóides e lipídios oxidados. Além de ligantes sintéticos como drogas hipolipemiantes e antidiabéticas, destacando-se as tiazolidinedionas (TZDs), que possuem alta afinidade pelo PPAR γ (KERSTEN *et al.*, 2000; ROSEN *et al.*, 2000; KANUNFRE, 2002; GROMMES *et al.*, 2004; PÉGORIER *et al.*, 2004).

As prostaglandinas da série J são consideradas ligantes do PPAR γ e o metabólito da prostaglandina J2 (PGJ2), a 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15-deoxi PGJ₂) é considerado o ligante natural mais potente desta isoforma (FORMAN *et al.*, 1995; KLIEWER, *et al.*, 1995). Os ácidos graxos essenciais, mais especificamente o linoléico, são precursores das PGJ2, potentes ligantes do PPAR γ (PALOU, 1998).

A expressão do gene também é regulada nutricionalmente, estando reduzida no jejum e em indivíduos submetidos a dietas hipocalóricas (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996, 1997), por outro lado, os níveis de mRNA do PPAR γ se elevam na presença de insulina (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999; EDVARDSSON *et al.*, 2006).

A grande maioria dos estudos ressalta que a expressão do PPAR γ 2 ocorre principalmente no tecido adiposo (TA) (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; AUBOEUF *et al.*, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999; CHAMBRIER *et al.*, 2002). Porém, em sua revisão, Sharma e Staels (2006) destacaram que os subtipos γ 1 e γ 2 são altamente expressos em adipócitos e macrófagos. Ademais, estudo recente demonstrou a expressão específica de PPAR γ 2 em lesões ateroscleróticas humanas, assim como em macrófagos primários e em células espumosas (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2004).

Resultados conflitantes têm sido encontrados em pesquisas que avaliaram a relação entre adiposidade e expressão do PPAR γ no TA (CHAMBRIER *et al.*, 2002; REDONNET *et al.*, 2002; SEWTER *et al.*, 2002). Segundo Vidal-Puig *et al.* (1997), Redonnet *et al.* (2002) e Sewter *et al.* (2002), a expressão do PPAR γ se correlacionou positivamente com o índice de

massa corporal (IMC). Entretanto, foi encontrada correlação negativa em outros estudos (MONTAGUE *et al.*, 1998; VERRETH *et al.*, 2004; GAYET *et al.*, 2007), enquanto outros autores não verificaram associação entre a expressão do gene e IMC (RIEUSSET *et al.*, 1999; ZEGHARI *et al.*, 2000).

Apesar das fortes evidências acerca da influência dos fatores nutricionais na expressão do PPAR γ 2, poucos estudos têm avaliado esta associação. Vale ressaltar que pesquisas com indivíduos com obesidade grave são escassas e difíceis de serem conduzidas devido à própria limitação do excesso de adiposidade.

Convém destacar que além da influência dietética, especialmente a composição lipídica da mesma, outros fatores podem ser responsáveis pelo conflito de informações existente, incluindo diferenças metodológicas importantes como: *primers* utilizados para análise de expressão (γ total ou específico para a isoforma de interesse), estudo com animais ou seres humanos, gênero, estado nutricional, tipo de TA utilizado para análise de expressão, além de estudos com pequeno número de indivíduos.

Infelizmente, análises de expressão gênica não são frequentemente realizadas devido ao custo e às dificuldades no acesso aos materiais necessários (TEBOUL *et al.*, 2005), principalmente em seres humanos.

Diferentemente de biópsias teciduais, o sangue periférico é um material que pode ser obtido rotineiramente, em poucos minutos e com baixo custo, além de permitir várias dosagens bioquímicas. Desta forma, as células brancas presentes no sangue periférico podem representar uma opção para investigações a nível molecular (TEBOUL *et al.*, 2005) de forma menos invasiva, permitindo várias análises após diferentes intervenções.

Diante da dificuldade de se coletar várias amostras de TA para avaliação da expressão do gene após intervenção nutricional contendo ligantes do gene, optou-se por avaliar os níveis de mRNA do PPAR γ 2 em amostras de sangue periférico.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão do gene PPAR γ 2 em amostras de sangue integral de mulheres obesas de grau 3.

Casuística

Estudo *in vivo* com amostras de sangue integral

Foi realizado um estudo transversal de intervenção não randomizado, não controlado, com 25 mulheres adultas (22 a 48 anos) obesas de grau 3 (IMC \geq 40 kg/m²) com o genótipo Pro12Pro no gene PPAR γ 2.

A amostra foi recrutada por meio de cartazes expostos em dois hospitais públicos e em um campus universitário, localizados no município do Rio de Janeiro.

O protocolo do estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sendo aprovado em 26/09/2005 (protocolo de pesquisa nº 116/05) (Anexo I). O projeto encontra-se cadastrado no CONEP (CAAE – 0832.0.000.197-05).

Todas as voluntárias assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de iniciarem a pesquisa, segundo a Resolução 196/96 (Anexo II).

Como critérios de inclusão considerou-se as mulheres adultas com história familiar de obesidade, não menopausadas, com índice de massa corporal (IMC) \geq 40 kg/m² (WHO, 1998).

Foram considerados como critérios de exclusão o tabagismo, presença de doença renal crônica, doenças infecciosas, diabetes mellitus e/ou outras doenças crônicas não transmissíveis, gestação, lactação, uso de drogas para perda de peso e/ou anti-lipidêmicas, pacientes em dieta especial ou que apresentaram perda de peso superior a 3 kg no último mês. Além disso, foram excluídas do estudo as voluntárias que não foram capazes de seguir o protocolo proposto.

Desenho do estudo

O esquema geral da intervenção transversal encontra-se na Figura 1.

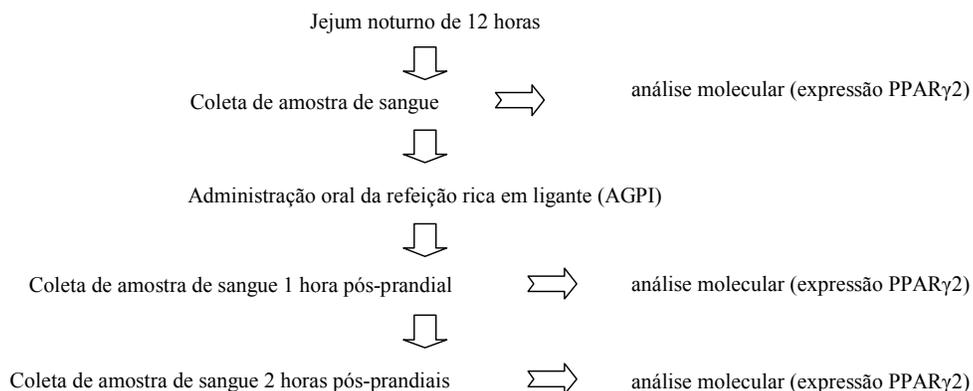


Figura 1. Esquema para realização da intervenção transversal.

As voluntárias apresentaram-se ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) da UFRJ às 7h, após jejum noturno de 12 horas, para a primeira coleta de sangue (5 mL em tubo com anticoagulante EDTA - ácido dietiltetraaminoacético, Vacutainer, Becton Dickinson).

Todas as amostras de sangue foram coletadas por pessoal devidamente treinado utilizando-se materiais descartáveis.

Após a primeira coleta, foi administrada por via oral uma refeição rica em ligante natural do gene PPAR γ 2 (AGPI da série n-6). Nos tempos 60 e 120 minutos após a ingestão da mesma foram coletadas novas amostras de sangue para a avaliação da expressão do gene (5 mL em tubo com EDTA).

Imediatamente após cada coleta de sangue (jejum, 60 e 120 minutos após a ingestão da refeição teste), os tubos com sangue (5 mL) foram acondicionados em caixa de isopor contendo gelo e levados até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do *Schistosoma mansoni* para a realização das análises moleculares.

Refeição teste

O valor energético total (VET) de cada voluntária foi estimado de acordo com a FAO/OMS (OMS, 1985). O valor calórico da refeição oferecida foi equivalente a um desjejum (15 a 20% do VET), sendo normoglicídica, normoprotéica e normolipídica, contendo aproximadamente 15% de AGPI (em média 88,6% e 11,4% de AGPI da série n-6 e n-3, respectivamente), em torno de 10% de AGMI e < 10% de AGS (Anexo V).

A refeição foi composta basicamente por bolo de cenoura sem cobertura, torradas, ricota acrescida de óleo de soja e leite desnatado. A análise da composição química das refeições foi feita por meio do programa computacional *Food Processor* versão 12 (Esha Research, Salem, EUA, 1984).

Genotipagem para o gene PPAR γ 2

Extração do DNA

As amostras de DNA genômico foram isolados a partir de amostras de sangue integral utilizando-se o kit comercial *MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit* (EPICENTRE® *Biotechnologies*, Cat. MG71100), conforme protocolo proposto pelo fabricante.

As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a etapa subsequente.

Amplificação e digestão das amostras de DNA

As condições experimentais utilizadas na amplificação do gene PPAR γ 2 e na detecção do alelos Pro12Pro, Pro12Ala e Ala12Ala, por meio da ação da enzima de restrição Bst UI constam no Quadro 1.

Quadro 1 – Condições experimentais para a detecção do genótipo Pro12Pro.

PCR	Digestão enzimática
Nº de acesso no <i>GenBank</i> : AB005520 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/	Enzima de restrição: Bst UI (<i>New England Biolabs, Inc.</i>)
Genotipagem: Códon 12: CCG (Pro) ou GCG (Ala)	Local da digestão: CG / CG
Primers: Exon 1 <i>Sense</i> 5' GCC AAT TCA AGC CCA GTC 3' (18 nucleotídeos) <i>Antisense</i> 5' GCC ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G 3' (43 nucleotídeos)	Condições experimentais: Temperatura de digestão: 60° C Tempo: 180 minutos [Enzima]: 6 U
Condições experimentais: Temperatura de anelamento: 59° C Temperatura e tempo de desnaturação: 95° C/5 min. Temperatura e tempo de extensão: 72° C/30 seg. Nº de ciclos: 35	Fragmentos gerados: Pro12Pro: 267 pb Pro12Ala: 267, 224, 43 pb Ala12Ala: 224, 43 pb.
Fragmento gerado: 267 pb	

Adaptado de Rosado (2006).

As amostras de DNA isoladas foram amplificadas por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da DNA polimerase), sendo utilizado um par de iniciadores: *sense* (5'- GCC AAT TCA AGC CCA GTC - 3') e *antisense* (5'- GCC ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G - 3') (GEN BANK DNA, 2003).

A mistura de reação para a PCR continha 10 µM de cada iniciador, 45 µL de PCR Supermix (Invitrogen™, Cat. 10572-114. Componentes: 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, 22 U Taq DNA polimerase recombinante/mL e estabilizadores) e 1 µL de DNA genômico, em um volume final de 50 µL.

As condições para amplificação incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação (95°C de desnaturação por 30 segundos, 59°C de anelamento por 30 segundos e 72°C de extensão por 30 segundos), seguidos por 10 minutos de extensão a 72°C. As reações foram realizadas em um termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems®*, EUA).

Uma alíquota de 10 µL do produto da PCR foi misturada a 2 µL de tampão de corrida *Blue Juice™ Gel Loading Buffer 10X* (Invitrogen™) e submetido à eletroforese em gel de

agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio na quantidade de 1 µL para um gel contendo 100 mL de TBE 1X (0,892M Tris-HCl; 0,019M EDTA; 0,889M ácido bórico).

A eletroforese foi realizada para confirmação da amplificação, em cuba horizontal (*Horizon*[®] 58, *Life Technologies*_{TM}) a 100V por cerca de 40 minutos, usando-se como tampão de corrida TBE 1X. A amplificação gerou um fragmento de 267 pares de bases (pb).

Os géis foram visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta em câmara escura equipada com transluminador (*DigiDoc-It*TM *Darkroom*, P/N 76-0311-01, UVP, USA) e câmara digital (Canon PC 1089) acoplada a um microcomputador dotado de *software* para captura de imagens.

Posteriormente, 10 µL do material amplificado foi digerido com 6 unidades da enzima de restrição Bst UI (*New England Biolabs, Inc.*), em tampão apropriado (*NE Buffer 2, New England Biolabs, Inc.*), a 60°C por 3 horas.

Os fragmentos gerados foram visualizados em géis de agarose a 2%, corados com brometo de etídio na quantidade de 1 µL para um gel contendo 100 mL de TBE 1X. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (*Horizon*[®] 58, *Life Technologies*_{TM}) a 100V por cerca de 40 minutos, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X.

Novamente os géis foram visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta em câmara escura equipada com transluminador e câmara digital acoplada a um microcomputador dotado de *software* para captura de imagens.

Análise da expressão do gene PPAR γ 2 em amostras de sangue integral

Extração do RNA total

Devido ao elevado risco de degradação de RNA, o procedimento para extração do mesmo foi realizado imediatamente após a coleta das amostras de sangue.

Primeiramente foi feita a extração do RNA total a partir de amostras sanguíneas coletadas em jejum, uma hora e duas horas após a ingestão da refeição teste, utilizando-se o kit comercial QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc, EUA, Cat. 52304) ou reagente TRIzol[®] (Invitrogen[™]). Nestes procedimentos, para a extração do RNA proveniente de sangue, os eritrócitos são lisados seletivamente e os leucócitos são recuperados por centrifugação.

O protocolo original proposto para o kit QIAamp[®] foi mantido e o RNA total foi extraído a partir de volumes de 0,5 mL e 1 mL de sangue integral.

Quanto à extração com reagente TRIzol[®], primeiramente foi realizada a separação das células brancas presentes no sangue.

Foram adicionados 2,5 mL de tampão para lise de eritrócitos (*Buffer* EL QIAGEN Inc., EUA, Cat. 79217) a 0,5 mL de sangue integral. Esta mistura foi incubada por 20 minutos no gelo, sendo misturada brevemente duas vezes durante este período. Após a incubação, a suspensão turva tornava-se translúcida indicando lise de eritrócitos.

O material lisado foi submetido à centrifugação (400 x g à 4°C) por 10 minutos (centrífuga SORVALL[®] SUPER T21). Ao término do procedimento, o sobrenadante foi completamente removido e descartado. Nesta etapa, os leucócitos formavam um precipitado após a centrifugação.

O tampão para lise de eritrócitos foi novamente adicionado às células do precipitado no volume de 1 mL, seguido de uma breve agitação.

As etapas de centrifugação e de remoção do sobrenadante foram repetidas nas mesmas condições. O precipitado final de leucócitos foi acrescido de 0,5 mL de reagente TRIzol[®] e o protocolo original foi mantido nas etapas subsequentes.

Ao término da extração, a quantidade de RNA total foi determinada por absorvância mensurada a 260 e 280 nm com auxílio de espectrofotômetro (*Ultrospec[®] 3000 Pharmacia Biotech*). As amostras foram congeladas a -20°C.

Tratamento com DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase, utilizando-se kit comercial (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, InvitrogenTM*), para remoção de contaminações com DNA genômico.

O protocolo original proposto foi mantido, ao final, as amostras de RNA tratadas foram submetidas à síntese de cDNA, conforme descrito abaixo.

Síntese do DNA complementar (RT-PCR)

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizou-se o kit comercial *TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems[®], P/N: N808-0234)*. Para a transcrição reversa, diferentes alíquotas de RNA total foram testadas (250 ng, 300 ng, 440 ng, 500 ng e 2 µg), assim como amostras de RNA com e sem tratamento com DNase.

Os seguintes reagentes foram utilizados na RT-PCR: 2,5 µM de Hexâmeros Randômicos, Tampão *TaqMan[®] RT (1X)*, 5,5 mM de MgCl₂, mistura de desoxinucleotídeos (500 µM por dNTP - dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 0,4 U/µL de inibidor de RNase e 1,25 U/µL de *MultiScribeTM Reverse Transcriptase*.

Foram realizadas reações com amostras de RNA na ausência da enzima *MultiScribeTM Reverse Transcriptase* para detectar possíveis contaminações com DNA genômico.

As seguintes condições de ciclagem foram conduzidas no termociclador *Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems[®], EUA)*: incubação a 25°C por 10 minutos, transcrição

reversa a 48°C por 30 minutos, seguida da inativação da transcrição reversa a 95°C por 5 minutos.

Amplificação do cDNA

Para confirmar a presença de cDNA, foi realizada a amplificação das amostras por meio de PCR, sendo utilizado um par de iniciadores para o gene constitutivo rRNA 18S humano: *sense* (5'- AGT GCG GGT CAT AAG CTT GC - 3') e *antisense* (5'- GGT GTG TAC AAA GGG CAG GG - 3') (Alpha DNA, Montreal, nº de síntese: 252858 / 252859).

Os *primers sense* e *antisense* do r18S humano foram desenhados utilizando o programa *Primer Express*[®] versão 2.0 (*Applied Biosystems*[®]).

A mistura de reação para a PCR continha 2,5 µM de cada *primer*, tampão com MgCl₂ 2X (*Reaction Buffer 10X with MgCl₂ Biotools B&M Labs, S. A.*), mix de dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatos) (10 µM), 1,5 U de DNA polimerase (*Biotools B&M Labs, S. A.*) e 1 µL de cDNA, em um volume final de 20 µL.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de amplificação (94°C de desnaturação por 15 segundos, 55°C de anelamento por 30 segundos e 72°C de extensão por 30 segundos), seguidos por 5 minutos de extensão a 72°C. As reações foram realizadas em um termociclador *Gene Amp*[®] *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*[®], EUA).

Retirou-se 5,5 µL do produto da PCR, o qual foi misturado em 0,5 µL de tampão de corrida *Blue Juice*[™] *Gel Loading Buffer 10X* (*Invitrogen*[™]) e submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio na quantidade de 1 µL para um gel contendo 100 mL de TBE 1X.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (*Horizon*[®] 58, *Life Technologies*_{TM}) a 100V por cerca de 40 minutos, usando-se como tampão de corrida TBE 1X. A amplificação gerou um fragmento de aproximadamente 51 pares de bases (pb).

Os géis foram visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta em câmara escura equipada com transluminador e câmera digital acoplada a um microcomputador dotado de *software* para captura de imagens.

Real Time PCR (PCR em tempo real)

A partir das amostras de cDNA, realizou-se a análise da expressão gênica do PPAR γ 2 por meio da condução da PCR em tempo real em uma mistura de 20 μ L contendo: *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* 1X (*Applied Biosystems*[®], P/N: 4304-437), *primers* PPAR γ 2 1X *sense* (5'- TCA CGC CCC TCA CAA GAC A - 3') e *antisense* (5'- ATT ACA GGG AAA ATA TTG CCA CACT - 3') (*Applied Biosystems*[®], P/N: 185384234-1 / 185384234-2) e sonda *TaqMan*[®] PPAR γ 2 1X (TGA ACA TGT GGG TCA CCG GCG A) (TAMRA *TaqMan*[®] Probe P/N: 450025) ou sonda *TaqMan*[®] MGB/*primers* PPAR γ 2 1X (*Custom TaqMan*[®] *Gene Expression Assays*, P/N: 4331348, *Applied Biosystems*[®], U.S.A.), sonda e *primers* rRNA 18S humano 1X (*Human 18S rRNA Applied Biosystems*[®], P/N: 4310-893E) e diferentes volumes de cDNA (1, 2, 3 e 4 μ L).

Para a síntese da sonda *TaqMan*[®] MGB/*primers* do PPAR γ 2, foram selecionadas as seqüências alvos dos *primers*, bem como a localização da sonda do PPAR γ 2, utilizando-se oligonucleotídeos exclusivos para cDNA (seqüências exons), sendo solicitado o serviço de desenho e otimização dos mesmos (*Assays-by-Design*SM *Service for Gene Expression Assays*, *TaqMan*[®] MGB probes, FAMTM dye-labeled, *Applied Biosystems*[®]).

Utilizou-se o controle de reagentes da reação, colocando-se todos os itens para a reação de amplificação, exceto o cDNA, o qual foi substituído por água mili-Q, além do controle negativo do cDNA, conforme descrito anteriormente.

O gene rRNA 18S humano foi escolhido como controle pelo fato de ser expresso de maneira constante e abundante nas células de mamíferos.

A sonda *TaqMan*[®] do gene PPAR γ 2 foi marcada na extremidade 5' com o repórter FAM, enquanto que a sonda de hidrólise do controle interno r18S foi marcada na extremidade 5' com o repórter VIC e ambos tiveram o supressor TAMRA (extremidade 3'). A sonda *TaqMan*[®] MGB (*Minor Groove Binder*) do gene PPAR γ 2 foi marcada com o repórter FAM na extremidade 5', tendo como supressor uma substância não fluorescente, garantindo alta sensibilidade para a quantificação.

As análises foram conduzidas em duplicata ou triplicata, em placas ópticas de 96 poços (*MicroAmp*[®] *Optical 96-well reaction plate*, *Applied Biosystems*[®], P/N: N8010-560), lacradas com adesivos ópticos apropriados (*MicroAmp*[®] *Optical Adhesive Cover*, *Applied Biosystems*[®], P/N: 4360-954).

As placas eram centrifugadas rapidamente a fim de remover bolhas de ar e coletar líquidos presentes nas paredes dos poços. Em seguida, as mesmas foram transferidas para o termociclador com sistema óptico (*7.500 Real Time PCR System*, *Applied Biosystems*[®]).

As condições da PCR em tempo real utilizadas no sistema *TaqMan*[®] foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Ao final, os níveis de expressão gênica foram analisados com auxílio do programa *7500 Real-Time PCR System SDS Software* (*Applied Biosystems*[®], U.S.A.).

Estudo *in vivo* com amostras de tecido adiposo (TA)

As amostras de TA humano foram obtidas de mulheres que não participaram do estudo, durante a realização de procedimentos cirúrgicos.

Utilizou-se uma amostra de TA omental a qual foi congelada (-20°C) até o momento do isolamento do RNA e uma amostra de TA omental fresco.

Extração do RNA total

O RNA total foi isolado utilizando-se o reagente TRIzol[®] (*Invitrogen*TM). As análises foram conduzidas em duplicata para ambas amostras, sendo utilizados 100 mg de TA fresco e 80 e 50 mg de TA congelado.

Após pesagem, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de TRIzol[®]. Por se tratar de amostras com altíssimo conteúdo de gordura, após a homogeneização, foi feita a remoção do material insolúvel por centrifugação (Eppendorf[®] 5415 C) a 12.000 x g a 4°C, durante 10 minutos.

As demais etapas foram mantidas, conforme descrito anteriormente, utilizando-se os seguintes volumes de reagentes: 200 µL de clorofórmio, 500 µL de álcool isopropílico e 1 mL de etanol 75% (preparado com água livre de RNase).

Ao término da extração, a concentração de RNA total foi determinada por absorbância mensurada a 260 e 280 nm com auxílio de espectrofotômetro (*Ultrospec*[®] 3000 *Pharmacia Biotech*).

Síntese do cDNA (RT-PCR)

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit comercial *TaqMan*[®] *Reverse Transcription Reagents* (*Applied Biosystems*[®], P/N: N808-0234) e diferentes alíquotas de RNA total foram

testadas (440 ng e 2 µg). Os demais procedimentos foram mantidos, como descrito anteriormente.

Real Time PCR (PCR em tempo real)

A partir das amostras de cDNA, realizou-se a análise da expressão gênica do PPAR γ 2 por meio da condução da PCR em tempo real em uma mistura de 20 µL contendo: *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems*[®], P/N: 4304-437), sonda *TaqMan*[®] *MGB/primers PPAR γ 2 1X (Custom TaqMan*[®] *Gene Expression Assays, P/N: 4331348, Applied Biosystems*[®], U.S.A.), sonda e *primers rRNA 18S humano 1X (Human 18S rRNA Applied Biosystems*[®], P/N: 4310-893E) e diferentes volumes de cDNA (2 e 4 µL para cDNA com 2 µg e 440 ng de RNA total, respectivamente).

Utilizou-se o controle de reagentes da reação, colocando-se no controle todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto o cDNA, sendo substituído por água mili-Q.

As análises foram conduzidas em duplicata, seguindo as mesmas condições descritas acima.

O resumo geral dos diferentes experimentos realizados com os dois tipos de amostra (sangue integral e TA) encontra-se na tabela a seguir.

Tabela 1: Síntese dos experimentos realizados com amostras de sangue e de TA.

Amostra	Extração RNA total	Tratamento DNase	Quantidade	Volume cDNA
			RNA total cDNA	PCR Tempo Real
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Sim	250 ng	2, 3 e 4 µL
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Sim	500 ng	2 e 3 µL
Sangue integral	Reagente TRIzol [®]	Sim	500 ng	2 e 3 µL
Sangue integral	Reagente TRIzol [®]	Não	250 ng	1, 2, 3 e 4 µL
Sangue integral	Reagente TRIzol [®]	Não	500 ng	2 e 3 µL
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Não	250 ng	1, 2, 3 e 4 µL
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Não	300 ng	4 µL
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Não	440 ng	4 µL
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Não	500 ng	2 e 3 µL
Sangue integral	Kit QIAamp [®]	Não	2 µg	2 e 3 µL
TA ¹ congelado	Reagente TRIzol [®]	Não	440 ng	4 µL
TA ¹ fresco	Reagente TRIzol [®]	Não	440 ng	4 µL
TA ¹ congelado	Reagente TRIzol [®]	Não	2 µg	2 µL
TA ¹ fresco	Reagente TRIzol [®]	Não	2 µg	2 µL

¹ Tecido adiposo.

Resultados

Inicialmente, obteve-se o RNA total a partir de amostras de sangue integral em jejum, uma hora e duas horas após a ingestão da refeição rica em AGPI.

Posteriormente, uma alíquota equivalente a 250 ng de RNA total foi empregada para a obtenção do DNA complementar (cDNA). Após a síntese do cDNA, realizou-se a sua amplificação através da técnica de PCR (reação em cadeia da DNA polimerase), sendo utilizado um par de iniciadores para o gene constitutivo rRNA 18S humano.

Na avaliação eletroforética, a amplificação das amostras gerou um fragmento de 51 pb, confirmando a síntese de cDNA, contudo, verificou-se a presença de bandas nos controles negativos do cDNA, sinalizando a contaminação das mesmas com DNA genômico (Figura 2).

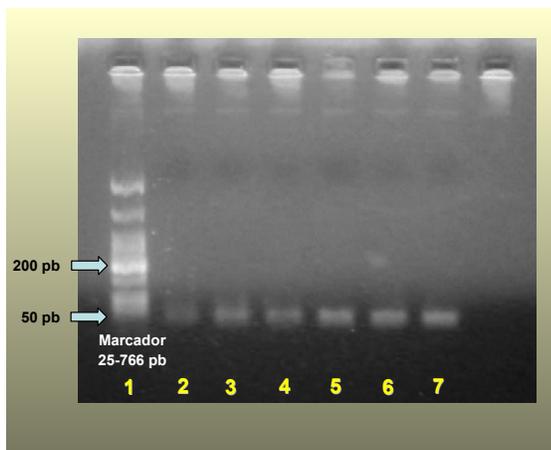


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose visualizando os produtos da PCR do cDNA (51 pb). Coluna 1: marcador (25 a 766 bp); coluna 2: branco; colunas 3 e 4: controles negativos; colunas 5 a 7: amostras jejum, 1 hora e 2 horas pós-prandiais, respectivamente.

Os resultados da PCR em tempo real demonstraram a amplificação do controle endógeno, exclusivamente, nas amostras positivas. Em relação ao PPAR γ 2 ambos amplificaram, sobretudo, o valor de *Cycle Threshold* (CT) do controle negativo da amostra de jejum (CT = 26,67) foi menor do que a respectiva amostra positiva (CT = 27,14), demonstrando que a amplificação do controle negativo ocorreu antes da amostra, confirmando a presença de DNA genômico.

Desta forma, optou-se pelo tratamento das amostras de RNA com DNase, seguido da síntese de novo cDNA.

Na análise da expressão gênica, não houve amplificação dos controles negativos do cDNA para o gene PPAR γ 2 e para o controle endógeno, indicando ausência de contaminação com DNA genômico e eficiência do tratamento. Porém, a amplificação das amostras positivas

ocorreu tardiamente, sendo os valores de CT próximos de 40, independentemente do volume de cDNA empregado na PCR em tempo real.

O mesmo procedimento foi realizado com o dobro da quantidade de RNA para o cDNA (500 ng), entretanto, a amplificação do gene alvo (PPAR γ 2) se manteve semelhante (CT médio = 38,6) (Figura 3).

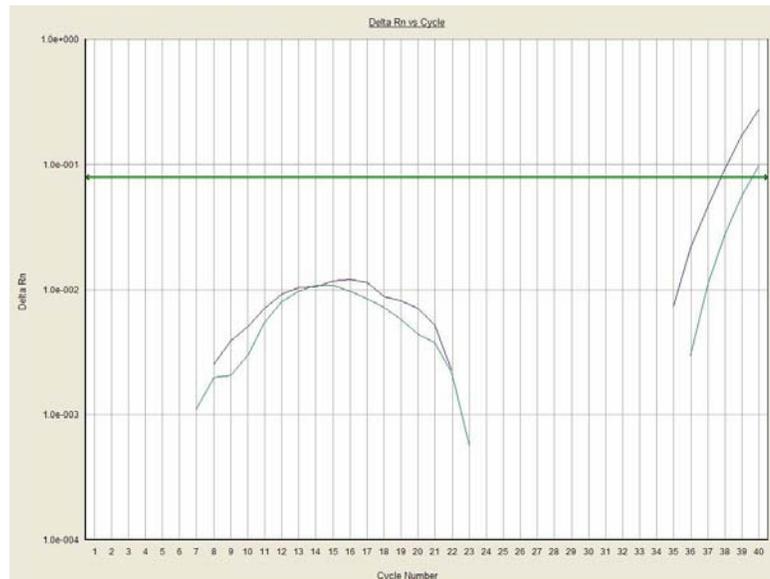


Figura 3: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análise em duplicata realizada com amostra de cDNA (500 ng de RNA total) sintetizada a partir de sangue integral.

O tratamento com DNase deixou de ser realizado e outros testes de expressão foram conduzidos com novos *primers* e sonda para o gene PPAR γ 2, os quais eram específicos para cDNA, devido a ausência de introns.

Foi feita uma nova síntese de cDNA a partir de 440 ng de RNA total. Como esperado não houve amplificação do gene alvo e do rRNA 18S no branco da reação e nos controles negativos do cDNA. Em relação às amostras positivas, somente o controle endógeno apresentou amplificação em todas as amostras positivas (Figura 4).

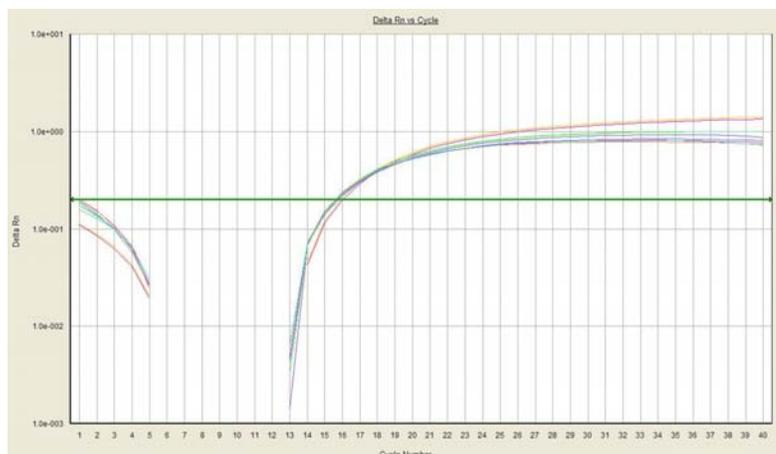


Figura 4: Curvas de amplificação do gene constitutivo rRNA 18S. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng de RNA total) sintetizadas a partir de sangue integral.

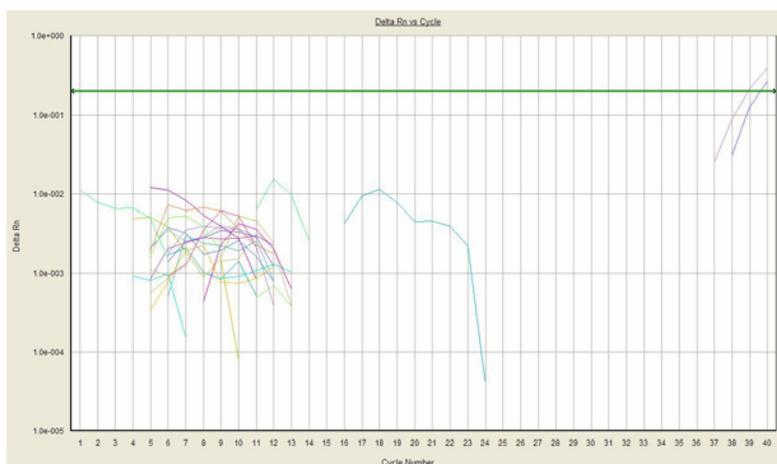


Figura 5: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng de RNA total) sintetizadas a partir de sangue integral.

Como pode ser observado na figura 5, das vinte e uma amostras submetidas a PCR em tempo real, apenas duas demonstraram amplificação do gene PPAR γ 2 com valores de CT entre 39 e 40.

A partir de amostras de cDNA com 2 μg de RNA, foi realizada nova PCR em tempo real, utilizando-se diferentes quantidades de cDNA (2 e 3 μL). Novamente, ambos os genes (controle endógeno e alvo) não foram detectados no branco da reação e no controle negativo do cDNA. O gene PPAR γ 2 demonstrou amplificação em apenas duas amostras (Figura 6) e o rRNA 18S se manteve constante em todas as amostras positivas.

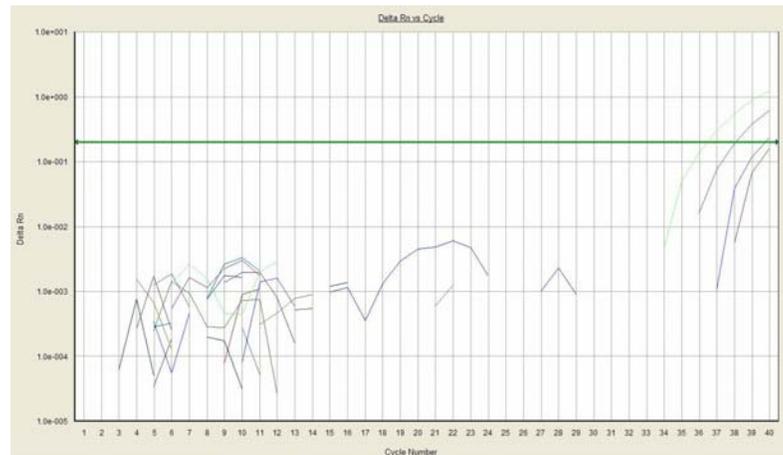


Figura 6: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (2 μg de RNA total) sintetizadas a partir de sangue integral.

Uma nova tentativa de análise de expressão do gene PPAR γ 2 foi realizada a partir de RNA total isolado de amostras de TA omental congelado e fresco de mulheres obesas de grau 3.

Foram sintetizados cDNAs com diferentes quantidades de RNA total (440 ng e 2 μg) a fim de testar se este fator poderia influenciar na determinação dos níveis de expressão do gene no TA.

Para a PCR em tempo real, utilizou-se um volume de 4 μL de cDNA para as amostras sintetizadas a partir de 440 ng de RNA e 2 μL de cDNA para as amostras sintetizadas a partir de 2 μg de RNA.

Como esperado, não houve amplificação (PPAR γ 2 e rRNA 18S) no branco da reação e no controle negativo do cDNA. Nas amostras de TA omental congelado apenas o controle endógeno demonstrou amplificação constante (Figura 7). Em relação ao PPAR γ 2, algumas amostras apresentaram amplificação (Figura 8).

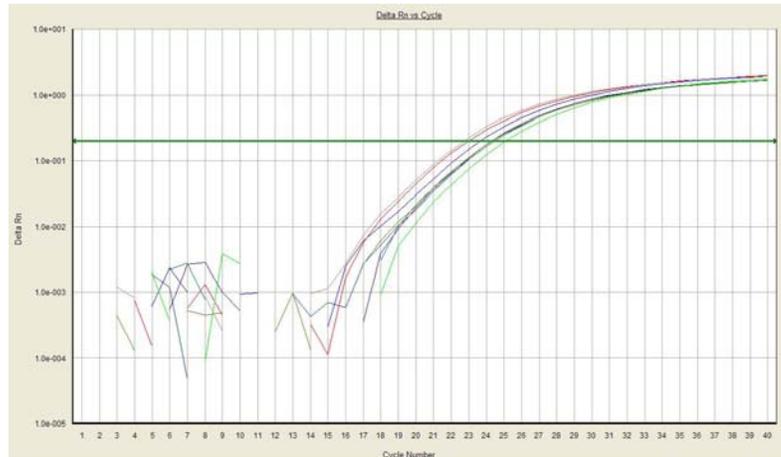


Figura 7: Curvas de amplificação do gene constitutivo rRNA 18S. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental congelado.

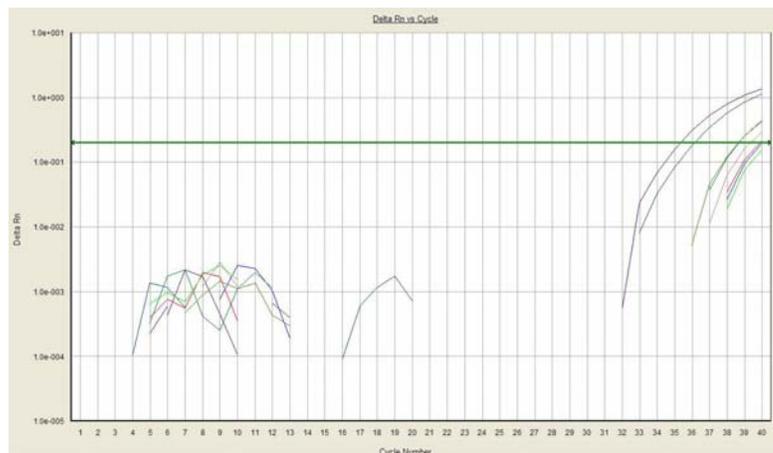


Figura 8: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental congelado.

Quanto ao TA omental fresco, tanto o controle endógeno como o gene alvo amplificaram em todas as amostras com os dois tipos de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA). As curvas de amplificação do gene PPAR γ 2 e do rRNA 18S são demonstradas nas figuras 9 e 10, respectivamente.

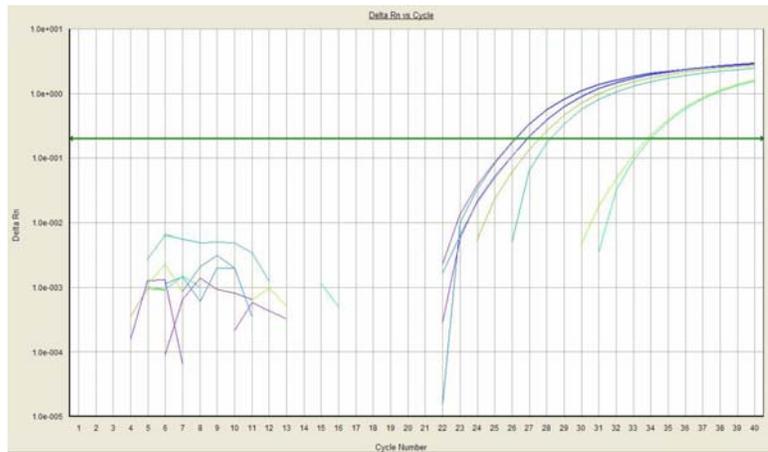


Figura 9: Curvas de amplificação do gene PPAR γ 2. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental fresco.

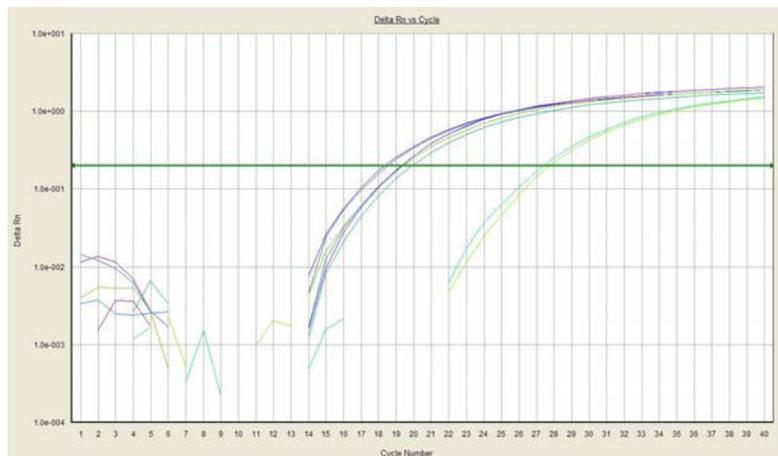


Figura 10: Curvas de amplificação do gene constitutivo rRNA 18S. Análises em duplicata realizadas com amostras de cDNA (440 ng e 2 μ g de RNA total) sintetizadas a partir de tecido adiposo humano omental fresco.

Considerando as amostras de TA fresco, as duas duplicatas de cDNA com 440 ng de RNA e uma das duplicatas de cDNA com 2 µg de RNA total apresentaram valores de CT bem semelhantes (26, 27-29 e 27, respectivamente) para o gene PPAR γ 2. A outra duplicata com maior concentração de RNA (2 µg) apresentou amplificação mais tardia (CT = 34). Como esperado, os níveis do controle endógeno permaneceram constantes (CT entre 19 e 20), com exceção da mesma duplicata que apresentou maior CT para o PPAR γ 2 (CT entre 27 e 28).

Discussão

A obesidade é uma doença multifatorial que possui um componente hereditário significativo, o qual sofre a influência de outros genes e de fatores ambientais (PÉRUSSE e BOUCHARD, 2000; FROGUEL e BOUTIN, 2001; MARQUES-LOPES *et al.*, 2004; CECIL *et al.*, 2006; FAROOQI e O'RAHILLY, 2007).

Sabendo-se que o receptor ativado pela proliferação de peroxissomas da isoforma γ e série 2 (PPAR γ 2) é um fator de transcrição chave na ativação da diferenciação dos adipócitos e no metabolismo da glicose, além de agir como importante modulador da expressão gênica de células especializadas como os adipócitos, o estudo de sua regulação *in vivo* é de grande relevância.

Vários autores destacam que a expressão do PPAR γ 2 ocorre principalmente no TA (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; AUBOEUF *et al.*, 1997; RIEUSSET *et al.*, 1999; CHAMBRIER *et al.*, 2002), contudo recentes pesquisas detectaram o gene em células brancas sangüíneas, especificamente em macrófagos (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2004; SHARMA & STAELS, 2006).

Existem poucos estudos de expressão do PPAR γ 2 envolvendo interações gene-ambiente, especialmente em humanos, ademais, não há na literatura científica informações a respeito da análise da expressão deste gene a partir de amostras de sangue integral.

O número limitado de indivíduos incluído nos estudos pode ser um dos principais fatores responsáveis pelos resultados conflitantes observados (AUBOEUF *et al.*, 1997).

Conforme destacado por Teboul *et al.* (2005), muitas vezes informações sobre expressão de genes permanecem limitadas devido ao acesso restrito a materiais necessários para estudos de expressão gênica. Sendo assim, as células brancas do sangue periférico podem representar o material ideal para investigações a nível molecular de forma não invasiva. Convém salientar que além da baixa agressividade comparado a outros métodos, o sangue é um material obtido rotineiramente, que pode ser utilizado para várias dosagens bioquímicas, podendo ser coletado várias vezes em curto período de tempo e com baixo custo, o que é favorável em avaliações moleculares que utilizam equipamentos e reagentes que por si só já oneram as análises.

Portanto, a utilização de amostras de sangue periférico pode constituir uma alternativa atrativa para análises moleculares em substituição à biópsias de tecidos, principalmente em estudos envolvendo seres humanos.

Além das limitações éticas para realização de estudos invasivos em seres humanos, certamente, haveria uma grande resistência por parte das voluntárias para se submeterem à biópsias de TA. Ademais, a necessidade de se realizar três biópsias no dia da administração da dieta rica em AGPI, inviabilizaria a pesquisa.

Por se tratar de um procedimento doloroso, a expectativa de realização da biópsia também afetaria as concentrações de glicose e insulina devido à sensação de medo e ansiedade, caracterizando um viés para o estudo. Embora a relação entre atividade simpática e metabolismo da insulina e glicose não seja totalmente compreendida, sabe-se que há um aumento da RI e elevação da glicemia em situações de estresse (LOURES *et al.*, 2002).

Conforme apontado por Auboeuf *et al.* (1997), o estresse dos indivíduos antes da biópsia também pode induzir alterações em curto prazo nos níveis de mRNA de PPAR γ 2,

podendo ser um dos fatores responsáveis pela grande variabilidade observada em estudos que analisaram a expressão do gene.

Na tentativa de analisar os níveis de mRNA do gene PPAR γ 2 a partir de amostras de sangue integral de mulheres obesas de grau 3, uma série de experimentos foram realizados no presente estudo.

No primeiro teste de análise da expressão gênica, o controle endógeno não foi detectado no branco e no controle negativo do cDNA, confirmando a inexistência de cDNA nestas amostras, uma vez que a sonda e *primers* do rRNA 18S, disponíveis comercialmente, são capazes de se anelar exclusivamente com seqüências de exons do cDNA.

Contudo, em relação ao gene PPAR γ 2, a amplificação do controle negativo do cDNA ocorreu antes da amostra, sugerindo a presença de contaminação das amostras com DNA genômico.

Sabendo que esta contaminação superestimaria a expressão gênica do PPAR γ 2, foi iniciado o tratamento das amostras de RNA com DNase.

Na análise da expressão gênica, utilizando-se os cDNAs submetidos ao tratamento com DNase, não se observou a amplificação do gene alvo e do controle interno nos controles negativos do cDNA, indicando eficácia no tratamento. Contudo, mesmo utilizando-se o dobro da quantidade de RNA (500 ng) para cDNA, verificou-se a amplificação tardia do gene alvo, o que dificultaria o cálculo de expressão relativa do mesmo. Este resultado sugere que a expressão do PPAR γ 2 no sangue integral é muito baixa (Figura 3).

Diante dos resultados, optou-se por não mais realizar o tratamento das amostras de RNA com DNase. Desta forma, o controle da contaminação com DNA genômico durante a execução da PCR em tempo real foi realizado utilizando-se oligonucleotídeos desenhados exclusivamente para o gene, usando como referência as seqüências de exons do cDNA do gene PPAR γ 2.

Para uma maior segurança nas análises, foi selecionada a seqüência alvo do gene em questão, bem como a localização da sonda, sendo solicitado um serviço de otimização de *primers* (*Assays-by-DesignSM Service for Gene Expression Assays, TaqMan[®] MGB probes, FAMTM dye-labeled, Applied Biosystems[®]*).

Novos testes de expressão foram conduzidos com os novos *primers* e sonda do PPAR γ 2. Inicialmente, foi realizada a PCR em tempo real a partir de amostras de cDNA sintetizadas com 440 ng de RNA total, pois esta seria a concentração máxima que poderia ser utilizada de acordo com a extração inicial, permitindo que o estudo com todas as voluntárias fosse realizado e as análises de expressão do PPAR γ 2 conduzidas. Entretanto, das vinte e uma amostras submetidas à análise de expressão, apenas duas demonstraram amplificação tardia do PPAR γ 2 (valores de CT entre 39 e 40) (Figura 5).

Com o objetivo de verificar se a ausência de amplificação do PPAR γ 2 teria ocorrido em função de quantidade insuficiente de RNA para a síntese de cDNA, foram selecionadas as amostras com maior rendimento e, a partir destas, foram sintetizados cDNAs com 2 μ g de RNA total, que corresponde a quantidade máxima de RNA total recomendada conforme o protocolo do kit utilizado.

A expressão do rRNA 18S se manteve constante, confirmando a presença de cDNA em todas as amostras. Porém, das 12 amostras, somente duas demonstraram amplificação para o gene PPAR γ 2 (Figura 6), com valores de CT menores (CT entre 36 e 38) que aqueles verificados utilizando-se 440 ng de RNA. Este resultado sugere que, apesar da baixa expressão do gene em sangue integral, foi possível detectá-lo em algumas amostras utilizando-se maior quantidade de RNA total para o cDNA.

Vale ressaltar que outros autores encontraram expressão do PPAR γ 2 em culturas de células brancas, incluindo macrófagos e células espumosas (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2004). Deste modo, no presente estudo, o perfil de células brancas presente nas

diferentes amostras analisadas pode ter influenciado a detecção do gene em amostras de sangue integral.

A grande maioria dos estudos afirma que a expressão do gene PPAR γ 2 ocorre exclusivamente no tecido adiposo (TA). Portanto, para confirmar a eficiência da metodologia empregada e, principalmente, dos *primers* utilizados para o gene de interesse, optou-se por realizar as mesmas análises em amostras de TA.

A análise de expressão do PPAR γ 2 foi bem sucedida nas amostras de TA humano omental fresco, tanto com 440 ng como com 2 μ g de RNA total para o cDNA, confirmando a eficácia dos procedimentos e reagentes empregados. Porém, nas amostras de TA humano omental congeladas, somente o gene constitutivo demonstrou amplificação em todas as amostras. Possivelmente, o aumento do número de ciclos durante a amplificação permitiria a detecção da expressão do gene alvo em um maior número de amostras.

Alguns estudos que avaliaram a expressão deste gene no TA (humano ou de animais) realizaram a extração de RNA imediatamente após a retirada do tecido (MONTAGUE *et al.*, 1998; SEWTER *et al.*, 2002; GIUSTI *et al.*, 2003) como foi feito no presente estudo com a amostra de TA fresco. Nas pesquisas em que o material foi armazenado para análise posterior, o TA foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a - 80°C até o momento das análises a fim de minimizar a degradação de RNA (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996; AUBOEUF *et al.*, 1997; VIDAL-PUIG *et al.*, 1997; REDONNET *et al.*, 2002; KOLEHMAINEN *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; SARAVANAN *et al.*, 2005). Esta pode ter sido a causa da ausência de amplificação do gene em algumas das amostras de TA congelado, pois após o procedimento cirúrgico, o tecido foi mantido em isopor com gelo e acondicionado em freezer a - 20°C.

As diferenças observadas nos valores de CT para as duas duplicatas de cDNA com 2 μ g de RNA total de TA fresco podem ter ocorrido em função de uma ineficiência na PCR em

tempo real devido a elevada concentração de cDNA. Convém destacar que para a otimização de análises quantitativas de expressão gênica, é necessária a construção de curvas de eficiência da reação, a fim de determinar o volume ideal de cDNA a ser utilizado, evitando-se assim inibições na amplificação.

O objetivo inicial do presente estudo era avaliar as alterações agudas e crônicas na expressão do gene PPAR γ 2 provocadas pelos AGPI dietéticos e pela restrição calórica em longo prazo (45 dias), realizada em estudo paralelo, bem como associar os níveis de expressão do gene com as concentrações de insulina e glicose, em mulheres obesas de grau 3.

Segundo Viguerie *et al* (2005), embora dietas restritas em energia sejam prescritas freqüentemente a indivíduos obesos, há pouquíssima informação a cerca das mudanças que acontecem na expressão de genes durante dietas hipocalóricas em humanos. Quanto ao PPAR γ 2, algumas pesquisas demonstraram redução em sua expressão após período de restrição energética (VIDAL-PUIG *et al.*, 1997; VIGUERIE *et al.*, 2005).

Optou-se por oferecer uma refeição rica em AGPI, pois estes são importantes reguladores diretos da expressão gênica, especialmente de genes envolvidos na lipogênese, síntese de triglicerídios e oxidação de ácidos graxos (CLARKE, 2000), incluindo o PPAR γ 2.

Portanto, mesmo que os níveis de mRNA do PPAR γ 2 estivessem reduzidos após o período de jejum que precedeu a primeira coleta de sangue, como relatado por alguns autores (VIDAL-PUIG *et al.*, 1996), provavelmente a expressão do mesmo estaria elevada após a ingestão de uma refeição rica em ligantes, favorecendo sua detecção.

Na presente pesquisa, apesar de algumas amostras terem demonstrado amplificação, não foi possível analisar alterações nos níveis de mRNA do PPAR γ 2 em células brancas presentes no sangue integral, embora outros pesquisadores tenham detectado a expressão deste gene em macrófagos, como apontado por Sharma e Staels (2006). Convém salientar que o PPAR γ 2 foi detectado em células brancas isoladas, como macrófagos e células espumosas

(TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2004) e que no presente estudo a extração do RNA total foi realizada em leucócitos totais presentes no sangue integral.

O primeiro estudo a reportar uma interação gene-nutriente com o PPAR γ 2 foi o de Luan *et al.* (2001), os quais encontraram uma forte interação entre a razão de gordura dietética polinsaturada para gordura saturada (razão P:S) e o polimorfismo Pro12Ala no IMC e na insulina de jejum. No entanto, a análise de polimorfismo é mais simples que a análise de expressão gênica, pois a coleta poderá ocorrer em qualquer momento do estudo, utiliza-se sangue para as análises, não exige coleta repetida e o material pode permanecer congelado para posterior análise.

Uma vantagem que tivemos em comparação a alguns estudos foi a utilização de *primers* específicos para a isoforma γ série 2 do PPAR. Muitas vezes, os resultados conflitantes encontrados entre estudos que analisaram a expressão do gene são decorrentes de diferenças nos iniciadores empregados, pois alguns utilizaram oligonucleotídeos específicos (REDONNET *et al.*, 2001; SEWTER *et al.*, 2002; GIUSTI *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004), enquanto outros avaliaram a expressão total da isoforma γ (MONTAGUE *et al.*, 1998; ZEGHARI *et al.*, 2000; REDONNET *et al.*, 2002; VERRETH *et al.*, 2004; SARAVANAN *et al.*, 2005).

Concluindo, a expressão do PPAR γ 2 foi detectada em baixos níveis em algumas amostras de sangue, mesmo utilizando-se a quantidade máxima de RNA total para a síntese de cDNA, o que sugere que o gene é pouco expresso em amostras de sangue integral periférico. Entretanto, a técnica utilizada se mostrou satisfatória em amostras de TA.

Diante da dificuldade de se detectar a expressão do gene a partir de amostras de sangue integral periférico e da inviabilidade de se realizar várias biópsias em um mesmo indivíduo, propõe-se que análises de interação gene-nutriente envolvendo este fator de transcrição sejam testadas em experimentos *in vivo* ou *in vitro*, utilizando-se macrófagos

isolados na tentativa de aumentar a eficiência da extração de mRNA do gene PPAR γ 2 ou em pacientes que estejam aguardando algum tipo de intervenção cirúrgica, facilitando assim a retirada de TA.

Referências bibliográficas

AUBOEUF, D.; RIEUSSET, J.; FAJAS, L.; VALLIER, P.; FRERING, V.; RIOU, J. P.; STAELS, B.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**, v.46, p.1319-27, 1997.

CECIL, J. E.; WATT, P.; PALMER, C. N.; HETHERINGTON, M. Energy balance and food intake: The role of PPAR γ gene polymorphisms. **Physiology & Behavior**, v.88, p.227-33, 2006.

CHAMBRIER, C.; BASTARD, J. P.; RIEUSSET, J.; CHEVILLOTTE, E.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; THEROND, P.; HAINQUE, B.; RIOU, J. P.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Obesity Research**, v.10, n.6, p.518-25, 2002.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **The British Journal of Nutrition**, v.83 (Suppl.1), p.S59-66, 2000.

DEEB, S. S.; FAJAS, L.; NEMOTO, M.; PIHLAJAMÄKI, J.; MYKKÄNEN, L.; KUUSISTO, J.; LAAKSO, M.; FUJIMOTO, W.; AUWERX, J. A. Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decrease receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nature Genetics**, v.20, p.284-7, 1998.

EDVARDSSON, U.; LJUNGBERG, A. N. N. A.; OSCARSSON, J. Insulin and oleic acid increase PPAR γ 2 expression in cultured mouse hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.340, p.111-17, 2006.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetic factors in human obesity. **Obesity Reviews**, v.8, suppl.1, p.37-40, 2007.

FOOD PROCESSOR NUTRITION ANALYSIS SYSTEM. Version 12.0. ESHA Corporation: USA, 1984.

FORMAN, B. M.; TONTONOZ, P.; CHEN, J.; BRUN, R. P.; SPIEGELMAN, B. M.; EVANS, R. M. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, v.83, p.803-12, 1995.

FROGUEL, P.; BOUTIN, P. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. *Experimental Biology and Medicine*, v.226, n.11, p.991-6, 2001.

GAYET, C.; LERAY, V.; SAITO, M.; SILIART, B.; NGUYEN, P. The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes, in dogs. *British Journal of Nutrition*, v.98, p.497-503, 2007.

GIUSTI, V.; VERDUMO, C.; SUTER, M.; GAILLARD, R. C.; BURCKHARDT, P.; PRALONG, F. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma 1$ and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma 2$ in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. *Diabetes*, v.52, p.1673-76, 2003.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *The Lancet Oncology*, v.5, p.419-29, 2004.

JONES, J. R.; BARRICK, C.; KIM, K.; LINDNER, J.; BLONDEAU, B.; FUJIMOTO, Y.; SHIOTA, M.; KESTERSON, R. A.; KAHN, B. B.; MAGNUSON, M. A. Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.17, p.6207-12, 2005.

KANUNFRE, C. A. PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma um receptor nuclear para ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura – os ácidos graxos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002. Cap.18, p.227-48.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and diseases. *Nature*, v.405, n.25, p.421-4, 2000.

KLIEWER, S. A.; LENHARD, J. M.; WILSON, T. M.; PATEL, I.; MORRIS, D. C.; LEHMANN, J. M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, v.83, p.813-9, 1995.

KOLEHMAINEN, M.; UUSITUPA, M. I. J.; ALHAVA, E.; LAAKSO, M.; VIDAL, H. Effect of the Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 gene on the expression of PPAR γ target genes in adipose tissue of massively obese subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.4, p.1717-22, 2003.

KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MIKI, H.; TAMEMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; KOMEDA, K.; SATOH, S.; NAKANO, R.; ISHII, C.; SUGIYAMA, T.; ETO, K.; TSUBAMOTO, Y.; OKUNO, A.; MURAKAMI, K.; SEKIHARA, H.; HASEGAWA, G.; NAITO, M.; TOYOSHIMA, Y.; TANAKA, S.; SHIOTA, K.; KITAMURA, T.; FUJITA, T.; EZAKI, O.; AIZAWA, S.; KADOWAKI, T. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Molecular Cell**, v.4, n.4, p.597-609, 1999.

LOURES, D. L.; SANT'ANNA, I.; BALDOTTO, C. S. R.; SOUSA, E. B.; NÓBREGA, A. C. L. Estresse mental e sistema cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.78, n.5, p.525-30, 2002.

LUAN, J.; BROWNE, P. O.; HARDING, A. H.; HALSALL, D. J.; O'RAHILLY, S.; CHATTERJEE, K.; WAREHAM, N. J. Evidence for Gene-Nutrient Interaction at the PPAR γ Locus. **Diabetes**, v.50, p. 686-89, 2001.

MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTINEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.327-38, 2004.

MEIRHAEGHE, A.; FAJAS, L.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AUWERX, J.; DEEB, S. S.; ARMOUYEL, P. Impact of the peroxisome proliferator Activated Receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.24, p.195-9, 2000.

MONTAGUE, C. T.; PRINS, J. B.; SANDERS, L.; ZHANG, J.; SEWTER, C. P.; DIGBY, J.; BYRNE, C. D.; O'RAHILLY, S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes**, v.47, p.1384-91, 1998.

MUELLER, E.; DRORI, S.; AIYER, A.; YIE, J.; SARRAF, P.; CHEN, H.; HAUSER, S.; ROSEN, E. D.; GE, K.; ROEDER, R. G.; SPIEGELMAN, B. M. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor γ isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.44, p.41925-30, 2002.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos. Ginebra, 1985.

- PALOU, A. Los genes de la obesidad. **Nutrición y Obesidad**, v.1, n.6, p.280-97, 1998.
- PÉGORIER, J. P.; LE MAY, C.; GIRARD, J. Control of gene expression by fatty acids. **The Journal of Nutrition**, v.134; p.2444S–49S, 2004.
- PÉRUSSE, L.; BOUCHARD, C. Gene-diet interactions in obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p. 1285S-90S, 2000.
- PIHLAJAMAKI, J.; MIETTINEN, R.; VALVE, R.; KARJALAINEN, L.; MYKKANEN, L.; KUUSISTO, J.; DEEB, S.; AUWERX, J.; LAAKSO, M. The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in non-diabetic elderly subjects with dyslipidemia. **Atherosclerosis**, v.15, p.567-74, 2000.
- REDONNET, A.; BONILLA, S.; NOËL-SUBERVILLE, C.; PALLET, V.; DABADIE, H.; GIN, H.; HIGUERET, P. Relationship between peroxisome proliferators-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v.26, p.920–27, 2002.
- REDONNET, A.; GROUBET, R.; NOËL-SUBERVILLE, C.; BONILLA, S.; MARTINEZ, A.; HIGUERET, P. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. **Metabolism**, v.50, n.10, p.1161-67, 2001.
- RIEUSSET, J.; ANDREELLI, F.; AUBOEUF, D.; ROQUES, M.; VALLIER, P.; RIOU, J. P.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human adipocytes. **Diabetes**, v.48, p.699-705, 1999.
- RODRÍGUEZ, E.; RIBOT, J.; RODRÍGUEZ, A. M.; PALOU, A. PPAR γ 2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. **Obesity Research**, v.12, n.9, p.1455-63, 2004.
- ROSADO, E. L.; BRESSAN, J.; HERNÁNDEZ, J. A. M.; MARTINS, M. F.; CECON, P. R. Efecto de la dieta y de los genes PPAR γ 2 y β 2-adrenérgico en el metabolismo energético y en la composición corporal de mujeres obesas. **Nutrición Hospitalaria**, v.21, n.3, p.317-31, 2006.
- ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes and Development**, v.14, p.1293-307, 2000.

SARAVANAN, N.; HASEEB, A.; EHTESHAM, N. Z.; GHAFORUNISSA. Diferencial efetua de dietético saturou e ácidos trans-gordurosos em expressão de genes associada com sensibilidade de insulina em rato tecido gorduroso. **European Journal of Endocrinology**, v.153, p.159-65, 2005.

SHARMA, A. M.; STAELS, B. Peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) and adipose tissue – understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.92, n.2, p.386-95, 2006.

SEWTER, C.; BLOWS, F.; CONSIDINE, R.; VIDAL-PUIG, A.; O'RAHILLY, S. Differential effects of adiposity on peroxisomal proliferator-activated receptor γ 1 and γ 2 messenger ribonucleic acid expression in human adipocytes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.9, p.4203-07, 2002.

STUMVOLL, M.; WAHL, H. G.; LOBLEIN, K.; BECKER, R.; MACHICAO, F.; JACOB, S.; HARING, H. Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene is associated with increase antilipolytic insulin sensitivity. **Diabetes**, v.50, p.876-81, 2001.

TEBOUL, M.; BARRAT-PETIT, M. A.; LI, X. M.; CLAUSTRAT, B.; FORMENTO, J. L.; DELAUNAY, F.; LÉVI, F.; MILANO, G. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Molecular Medicine**, v.83, p.693-99, 2005.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; HANEFELD, M.; CHINETTI, G.; ZAWADZKI, C.; HAULON, T.; KUBASZEK, A.; KOEHLER, C.; LEONHARDT, W.; STAELS, B.; LAAKSO, M. Ala12ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protects against atherosclerosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, n.9, p.4238-42, 2004.

VERMA, N. K.; SINGH, J.; DEY, C. S. PPAR- γ expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v.143, p.1006–13, 2004.

VERRETH, W.; DE KEYSER, D.; PELAT, M.; VERHAMME, P.; GANAME, J.; BIELICKI, J. K.; MERTENS, A.; QUARCK, R.; BENHABILÈS, N.; MARGUERIE, G.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; NINIO, E.; HERREGODS, M. C.; BALLIGAND, J. L.; HOLVOET, P. Weight loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor- α and peroxisome proliferators-activated receptor- γ correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. **Circulation**, v.110, p.3259-69, 2004.

VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; LOWELL, B. B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J. S.; MOLLER, D. E. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, v.97, p.2553–61, 1996.

VIDAL-PUIG, A.; CONSIDINE, R. V.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; WERMAN, A.; PORIES, W. J.; CARO, J. F.; FLIER, J. S. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.10, p.2416-22, 1997.

VIGUERIE, N.; VIDAL, H.; ARNER, P.; HOLST, C.; VERDICH, C.; AVIZOU, S.; ASTRUP, A.; SARIS, W. H. M.; MACDONALD, I. A.; KLIMCAKOVA, E.; CLÉMENT, K.; MARTINEZ, A.; HOFFSTEDT, J.; SØRENSEN, T. I. A.; LANGIN, D. Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. **Diabetologia**, v.48, p.123-31, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: prevention and managing the global epidemic. Geneva, 1998.

ZEGHARI, N.; VIDAL, H.; YOUNSI, M.; ZIEGLER, O.; DROUIN, P.; DONNER, M. Adipocyte membrana phospholipids e expressão de PPAR-g em mulheres obesas: relação para hiperinsulinemia. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.279, p.E736-E743, 2000.

7.500 REAL-TIME PCR SYSTEM SEQUENCE DETECTION SOFTWARE, 1.3. **Applied Biosystems**, USA, 2004.

5 – Conclusões gerais

- As mulheres com maior massa corporal demonstraram maior resistência à insulina (RI), bem como maior secreção de insulina 1 hora após ingestão da refeição rica em ácidos graxos polinsaturados (AGPI) em comparação com as demais, porém, a diferença não foi significativa.
- As voluntárias com ingestão excessiva de lipídios totais (> 30% VET) apresentaram maior índice de massa corporal (IMC), colesterol total e LDL-colesterol, comparadas àquelas com ingestão lipídica normal.
- Além da RI constatada no grupo com maior ingestão de lipídios totais, observou-se maiores valores de glicose plasmática e insulina sérica em jejum e pós-prandial (1 e 2 horas após a refeição).
- Os AGMI ingeridos habitualmente pelas voluntárias refletiram em diminuição da glicemia e da insulinemia em jejum, além de redução da RI.
- As mulheres com maior massa corporal demonstraram maior RI, o que sugere diferenças metabólicas importantes entre os grupos compostos exclusivamente por obesas de grau 3.
- A ingestão excessiva de lipídios e de AGS contribuiu para a adiposidade e para a RI. Contudo, a ingestão de AGMI pode ter reduzido o impacto da dieta hiperlipídica no metabolismo da glicose.
- O tratamento das amostras de RNA total com DNase levou a degradação de RNA extraído de sangue integral.
- Não foi possível analisar a expressão do gene PPAR γ 2 em amostras de sangue integral, independentemente da quantidade de RNA total utilizada para a síntese de cDNA, o que sugere que o gene é pouco expresso em amostras de sangue integral periférico.

- A expressão do gene PPAR γ 2 não foi bem sucedida em amostras de tecido adiposo (TA) omental congelado, independente da quantidade de RNA total utilizada para a síntese de cDNA.
- A técnica utilizada para avaliação da expressão do gene PPAR γ 2 demonstrou resultados satisfatórios em amostras de TA omental fresco, independente das concentrações de RNA total.

6 - Referências bibliográficas

1. ALTSHULER, D.; HIRSCHHORN, J. N.; KLANNEMARK, M.; LINDGREN, C. M.; VOHL, M. C.; NEMESH, J.; LANE, C. R.; SCHAFFNER, S. F.; BOLK, S.; BREWER, C.; TUOMI, T.; GAUDET, D.; HUDSON, T. J.; DALY, M.; GROOP, L.; LANDER, E. S. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v.26, p.76-80, 2000.
2. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 30, (Supl.I), p.S42-S47, 2007.
3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care in Diabetes – 2007. **Diabetes Care**, v. 30, (Supl.I), p.S4-S41, 2007.
4. ANAYA, C. O. M.; ARIZA, I. D. S. Avances en obesidad. **Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia**, v.52, n.4, p.270-86, 2004.
5. **APPLIED BIOSYSTEMS**. Getting started guide: relative quantification. 7300/7500 Real Time PCR System. USA: Applied Biosystems, 2004.
6. AUBOEUF, D.; RIEUSSET, J.; FAJAS, L.; VALLIER, P.; FRERING, V.; RIOU, J. P.; STAELS, B.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**, v.46, p.1319-27, 1997.
7. BEAMER, B. A.; YEN, C. J.; ANDERSEN, R. E.; MULLER, D.; ELAHI, D.; CHESKIN, L. J.; ANDRES, R.; ROTH, J.; SHULDINER, A. R. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator activated receptor γ 2 gene with obesity in two Caucasian populations. **Diabetes**, v.47, p.1806-8, 1998.
8. BISSCHOP, P. H.; METZ, J.; ACKERMANS, M. T.; ENDERT, E.; PIJL, H.; KUIPERS, F.; MEIJER, A. J.; SAUERWEIN, H. P.; ROMIJN, J. A. Dietary fat content alters insulin-mediated glucose metabolism in healthy men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.554-9, 2001.
9. BONNEAU, G. A.; RASCON, C. M. S.; PEDROZO, W. R.; CEBALLOS, B.; LEIVA, R. BLANCO, N.; BERG, G. Presencia de insulinorresistencia en Síndrome metabólico. **Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo**, v.43, p.215-23, 2006.

10. BUZZETTI, R.; PETRONE, A.; RIBAUDO, M. C.; ALEMANNI, I.; ZAVARELLA, S.; MEIN, C. A.; MAIANI, F.; TIBERTI, C.; BARONI, M. G.; VECCI, E.; ARCA, M.; LEONETTI, F.; MARIO, U. D. The common PPAR- γ 2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. **European Journal of Human Genetics**, v.12, p.1050-4, 2004.
11. CARPENTIER, Y. A.; PORTOIS, L.; MALAISSE, W. J. n-3 Fatty acids and the metabolic syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83(suppl), p.1499S-504S, 2006.
12. CECIL, J. E.; WATT, P.; PALMER, C. N.; HETHERINGTON, M. Energy balance and food intake: The role of PPAR γ gene polymorphisms. **Physiology & Behavior**, v.88, p.227-33, 2006.
13. CHAMBRIER, C.; BASTARD, J. P.; RIEUSSET, J.; CHEVILLOTTE, E.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; THEROND, P.; HAINQUE, B.; RIOU, J. P.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Obesity Research**, v.10, n.6, p.518-25, 2002.
14. CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **The British Journal of Nutrition**, v.83 (Suppl.1), p.S59-66, 2000.
15. CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1129-32, 2001.
16. CLEMENT, K.; HERCBERG, S.; PASSINGE, B.; GALAN, P.; VARROUD-VIAL, M.; SHULDINER, A. R.; BEARMER, B. A.; CHARPENTIER, G.; GUY-GRAND, B.; FROGUEL, P.; VAISSE, C. The pro115Gln and Pro12Ala PPAR gamma gene mutations in obesity and type 2 diabetes. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.24, p.391-3, 2000.
17. COLE, S. A.; MITCHELL, B. D.; HSUEH, W-C.; PINEDA, P.; BEAMER, B. A.; SHULDINER, A. R.; COMUZZIE, A. G.; BLANGERO, J.; HIXSON, J. E. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. **International Journal of Obesity**, v.24, p.522-24, 2000.

18. CORRÊA, F. H.; NOGUEIRA, V. G.; BEVILÁCQUA, M. F.; GOMES, M. B. Avaliação da secreção e resistência insulínica em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose - do metabolismo normal ao diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.51, n.9, p.1498-1505, 2007.
19. DEEB, S. S.; FAJAS, L.; NEMOTO, M.; PIHLAJAMÄKI, J.; MYKKÄNEN, L.; KUUSISTO, J.; LAAKSO, M.; FUJIMOTO, W.; AUWERX, J. A. Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decrease receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nature Genetics**, v.20, p.284-7, 1998.
20. DE FRONZO, R. A.; TOBIN, J. D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **American Journal of Physiology**, v.237, p.E214-E223, 1979.
21. DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I.; PRUD'HOMME, D. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. **British Medical Journal**, v.322, p.716-720, 2001.
22. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2007.
23. **III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.77 (Supl.III), p.1-48, 2001.
24. **Documento do Consenso Latino-Americano sobre Obesidade**, Ministério da Saúde, 1999.
25. DUARTE, A. C.; CASTELLANI, F. R. **Semiologia nutricional**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Axcel Books, 2002. 115p.
26. EDVARDSSON, U.; LJUNGBERG, A. N. N. A.; OSCARSSON, J. Insulin and oleic acid increase PPAR γ 2 expression in cultured mouse hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.340, p.111-17, 2006.
27. EVANS, D.; MANN, W. A.; HEER, J.; MICHEL, U.; WENDT, D.; KORTNER, B.; WOLF, A.; BEISIEGEL, U. Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) does not play a major role in the development of morbid obesity. **International Journal of Obesity**, v.24, p.647-51, 2000.

28. FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetic factors in human obesity. **Obesity Reviews**, v.8, suppl.1, p.37-40, 2007.
29. FLACHS, P.; MOHAMED-ALI, V.; HORAKOVA, O.; ROSSMEISL, M.; HOSSEINZADEH-ATTAR, M. J.; HENSLER, M.; RUZICKOVA, J.; KOPECKY, J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**, v.49, n.2, 2006.
30. FOOD PROCESSOR NUTRITION ANALYSIS SYSTEM. Version 12.0. ESHA Corporation: USA, 1984.
31. FORMAN, B. M.; TONTONOZ, P.; CHEN, J.; BRUN, R. P.; SPIEGELMAN, B. M.; EVANS, R. M. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . **Cell**, v.83, p.803-12, 1995.
32. FRIEDWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.
33. FROGUEL, P.; BOUTIN, P. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.11, p.991-6, 2001.
34. GAGLIARDI, A. R. T. Obesidade central, bases hormonais e moleculares da síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.4, p.557-66, 2004.
35. GAYET, C.; LERAY, V.; SAITO, M.; SILIART, B.; NGUYEN, P. The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes, in dogs. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.497-503, 2007.
36. GELONEZE, B.; GELONEZE, S. R.; ERMETICE, M. N.; REPETTO, E. M.; TAMBASCIA, M. A. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population. IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.72, n.2, p.219-20, 2006.
37. GELONEZE, B; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, n.2, p.208-215, 2006.

38. GEN BANK DNA. AB005520. *Homo sapiens ppar* [gi:2605488]. www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank. Acesso em 24/01/2003.
39. GIBSON, R. S. **Principles of nutritional assessment**. New York: Oxford, 1990. 691 p.
40. GIUSTI, V.; VERDUMO, C.; SUTER, M.; GAILLARD, R. C.; BURCKHARDT, P.; PRALONG, F. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. **Diabetes**, v.52, p.1673-76, 2003.
41. GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, A. H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**, v.78, n.3, p.783-809, 1998.
42. GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. **The Lancet Oncology**, v.5, p.419-29, 2004.
43. HARA, K.; OKADA, T.; TOBE, K.; YASUDA, K.; MORI, Y.; KADOWAKI, H.; HAGURA, R.; AKANUMA, Y.; KIMURA, S.; ITO, C.; KADOWAKI, T. The Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2 may confer resistance to type 2 diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.2171, p.212-16, 2000.
44. HOUSEKNECHT, K. L.; COLE, B. M.; STEELE, P. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: A review. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, p.1-23, 2002.
45. **IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA**. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) - Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. IBGE, Rio de Janeiro, 2004.
46. JONES, J. R.; BARRICK, C.; KIM, K.; LINDNER, J.; BLONDEAU, B.; FUJIMOTO, Y.; SHIOTA, M.; KESTERSON, R. A.; KAHN, B. B.; MAGNUSON, M. A. Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.17, p.6207-12, 2005.
47. KANUNFRE, C. A. PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma um receptor nuclear para ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura – os ácidos graxos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002. Cap.18, p.227-48.

48. KATZ, A.; NAMBI, S. S.; MATHER, K.; BARON, A. D.; FOLLMANN, D. A.; SULLIVAN, G.; QUON, M. J. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n.7, p.2402-10, 2000.
49. KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and diseases. **Nature**, v.405, n.25, p.421-4, 2000.
50. KLIEWER, S. A.; LENHARD, J. M.; WILSON, T. M.; PATEL, I.; MORRIS, D. C.; LEHMANN, J. M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferators-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v.83, p.813-9, 1995.
51. KOLEHMAINEN, M.; UUSITUPA, M. I. J.; ALHAVA, E.; LAAKSO, M; VIDAL, H. Effect of the *Pro12Ala* polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 gene on the expression of PPAR γ target genes in adipose tissue of massively obese subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.4, p.1717-22, 2003.
52. KOSTNER, G. M.; AVOGARO, P.; BOM, G. B.; CAZZOLATO, G.; QUINCI, G. B. Determination of high-density lipoproteins screening methods compared. **Clinical Chemistry**, v.25, p.939-42, 1979.
53. KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MIKI, H.; TAMEMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; KOMEDA, K.; SATOH, S.; NAKANO, R.; ISHII, C.; SUGIYAMA, T.; ETO, K.; TSUBAMOTO, Y.; OKUNO, A.; MURAKAMI, K.; SEKIHARA, H.; HASEGAWA, G.; NAITO, M.; TOYOSHIMA, Y.; TANAKA, S.; SHIOTA, K.; KITAMURA, T.; FUJITA, T.; EZAKI, O.; AIZAWA, S.; KADOWAKI, T. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Molecular Cell**, v.4, n.4, p.597-609, 1999.
54. LAWTON, C. L.; DELARGY, H. J.; BROCKMAN, J.; SMITH, F. C.; BLUNDELL, J. E. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. **British Journal of Nutrition**, v.83, p.473-82, 2000.
55. LENHARD, J. M.; GOTTSCHALK, W. K. Preclinical development in type 2 diabetes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.1199-212, 2002.
56. LICHTENSTEIN, A. H.; SCHWAB, U. S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. **Atherosclerosis**, v.150, p.227-43, 2000.

57. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001.
58. LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.1-13, 2006.
59. LOTT, J. A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v.21, n.12, p.1754-60, 1975.
60. LOURES, D. L.; SANT'ANNA, I.; BALDOTTO, C. S. R.; SOUSA, E. B.; NÓBREGA, A. C. L. Estresse mental e sistema cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.78, n.5, p.525-30, 2002.
61. LUAN, J.; BROWNE, P. O.; HARDING, A. H.; HALSALL, D. J.; O'RAHILLY, S.; CHATTERJEE, K.; WAREHAM, N. J. Evidence for Gene-Nutrient Interaction at the PPAR γ Locus. **Diabetes**, v.50, p. 686-89, 2001.
62. MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTINEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.327-38, 2004.
63. MASUGI, J.; TAMORI, Y.; MORI, H.; KOIKE, T.; KASUGA, M. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, p.178-82, 2000.
64. MATTEVI, V. S.; ZEMBRZUSKI, V. M.; HUTZ, M. H. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.927-32, 2007.
65. MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, B. A.; NAYLOR D. F.; TREACHER D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, p.412-19, 1985.
66. MCGOWAN, M. W.; ARTISS, J. D.; STRANDBERGH, D. R.; ZAK, B. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, v.29, p.538-42, 1983.

67. MEIRHAEGHE, A.; FAJAS, L.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AUWERX, J.; DEEB, S. S.; ARMOUYEL, P. Impact of the peroxisome proliferator Activated Receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.24, p.195-9, 2000.
68. MEMON, R. A.; TECOTT, L. H.; NONOGAKI, K.; BEIGNEUX, A.; MOSER, A. H.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α) and PPAR- γ messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR- γ -responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. **Endocrinology**, v.141, p.4021-31, 2000.
69. MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v.2, n.2, p.139-42, 2004.
70. MONTAGUE, C. T.; PRINS, J. B.; SANDERS, L.; ZHANG, J.; SEWTER, C. P.; DIGBY, J.; BYRNE, C. D.; O'RAHILLY, S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes**, v.47, p.1384-91, 1998.
71. MONTEIRO, C. A.; HALPERN, A. Epidemiología de la obesidad en Brasil. **Nutrición y Obesidad**, v.3, n.2, p.98-105, 2000.
72. MUELLER, E.; DRORI, S.; AIYER, A.; YIE, J.; SARRAF, P.; CHEN, H.; HAUSER, S.; ROSEN, E. D.; GE, K.; ROEDER, R. G.; SPIEGELMAN, B. M. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor γ isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.44, p.41925-30, 2002.
73. NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real – uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.10-13, 2004.
74. OH, E. Y.; MIN, K. M.; CHUNG, J. H.; MIN, Y. K.; LEE, M. S.; KIM, K. W.; LED, M. K. Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 in Korean diabetic and obese subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n.5, p.1801-4, 2000.
75. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos. Ginebra, 1985.

76. PALOU, A. Los genes de la obesidad. **Nutrición y Obesidad**, v.1, n.6, p.280-97, 1998.
77. PÉGORIER, J. P.; LE MAY, C.; GIRARD, J. Control of gene expression by fatty acids. **The Journal of Nutrition**, v.134; p.2444S-49S, 2004.
78. PÉREZ-MATUTE, P.; PÉREZ-ECHARRI, N.; MARTINEZ, J. A.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . **British Journal of Nutrition**, v.97, p.389-98, 2007.
79. PÉRUSSE, L.; BOUCHARD, C. Gene-diet interactions in obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p. 1285S-90S, 2000.
80. PIHLAJAMAKI, J.; MIETTINEN, R.; VALVE, R.; KARJALAINEN, L.; MYKKANEN, L.; KUUSISTO, J.; DEEB, S.; AUWERX, J.; LAAKSO, M. The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in non-diabetic elderly subjects with dyslipidemia. **Atherosclerosis**, v.15, p.567-74, 2000.
81. PRENTICE, A. M.; JEBB, S. A. Fast foods, energy density and obesity: a possible mechanistic link. **Obesity reviews**, v.4, p.187-94, 2003.
82. RABEN, A.; ASTRUP, A. Leptin is influenced both by predisposition to obesity and diet composition. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.24, n.4, p.450-9, 2000.
83. REDONNET, A.; BONILLA, S.; NOËL-SUBERVILLE, C.; PALLET, V.; DABADIE, H.; GIN, H.; HIGUERET, P. Relationship between peroxisome proliferators-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v.26, p.920-27, 2002.
84. REEVES, W. G. Insulin antibody determination: theoretical and practical considerations. **Diabetologia**, v.24, p.399-403, 1983.
85. REDONNET, A.; GROUBET, R.; NOËL-SUBERVILLE, C.; BONILLA, S.; MARTINEZ, A.; HIGUERET, P. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. **Metabolism**, v.50, n.10, p.1161-67, 2001.

86. REIS, A. F.; VELHO, G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.46, n.4, p.426-32, 2002.
87. RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A. A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, v.23, p.447-56, 2004.
88. RICHMOND, W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. **Clinical Chemistry**, v.19, p.1350-56, 1973.
89. RIEUSSET, J.; ANDREELLI, F.; AUBOEUF, D.; ROQUES, M.; VALLIER, P.; RIOU, J. P.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human adipocytes. **Diabetes**, v.48, p.699-705, 1999.
90. ROBITAILLE, J.; DESPRÉS, J-P.; PÉRUSSE, L.; VOHL, M-C. The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Québec Family Study. **Clinical Genetics**, v.63, p.109-16, 2003.
91. RODRÍGUEZ, E.; RIBOT, J.; RODRÍGUEZ, A. M.; PALOU, A. PPAR γ 2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. **Obesity Research**, v.12, n.9, p.1455-63, 2004.
92. ROSADO, E. L.; BRESSAN, J.; HERNÁNDEZ, J. A. M.; MARTINS, M. F.; CECÓN, P. R. Efecto de la dieta y de los genes PPAR γ 2 y β 2-adrenérgico en el metabolismo energético y en la composición corporal de mujeres obesas. **Nutrición Hospitalaria**, v.21, n.3, p.317-31, 2006.
93. ROSADO, E. L.; BRESSAN, J.; MARTINS, M. F.; CECÓN, P. R.; MARTÍNEZ, J. A. Polymorphism in the PPARgamma2 and beta2-adrenergic genes and diet lipid effects on body composition, energy expenditure and eating behavior of obese women. **Appetite**, v.49, n.3, p.635-43, 2007.
94. ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews**, v.7, p.885-96, 2006.
95. ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, p.847-53, 2006.

96. ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes and Development**, v.14, p.1293-307, 2000.
97. SÁNCHEZ-MARGALET, V.; VALLE, M.; RUZ, F. J.; GASCÓN, F.; MATEO, J.; GOBERNA, R. Elevated plasma total homocysteine levels in hyperinsulinemic obese subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.75-79, 2002.
98. SARAVANAN, N.; HASEEB, A.; EHTESHAM, N. Z.; GHAFORUNISSA. Diferencial efetua de dietético saturou e ácidos trans-gordurosos em expressão de genes associada com sensibilidade de insulina em rato tecido gorduroso. **European Journal of Endocrinology**, v.153, p.159-65, 2005.
99. SHARMA, A. M.; STAELS, B. Peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) and adipose tissue – understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.92, n.2, p.386-95, 2006.
100. SCHEEN, A. J. From obesity to diabetes: why, when and who? **Acta Clinica Belgica**, v.55, n.1, p.9-15, 2000.
101. SCHWARTZ, M. W.; KAHN, S. E. Insulin resistance and obesity. **Nature**, v.402, n.23, p.860-61, 1999.
102. SEIDELL, J. C. Obesity, insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic. **The British Journal of Nutrition**, v.83, p.S5-S8, 2000.
103. SESTI, G.; PEREGO, L.; CARDELLINI, M.; ANDREOZZI, F.; RICASOLI, C.; VEDANI, P.; GUZZI, V.; MARCHI, M.; PAGANELLI, M.; FERLA, G.; PONTIROLI, A. E.; HRIBAL, M. L.; FOLLI, F. Impact of common polymorphisms in candidate genes for insulin resistance and obesity on weight loss of morbidly obese subjects after laparoscopic adjustable gastric banding and hypocaloric diet. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, n.9, p.5064-69, 2005.
104. SEWTER, C.; BLOWS, F.; CONSIDINE, R.; VIDAL-PUIG, A.; O'RAHILLY, S. Differential effects of adiposity on peroxisomal proliferator-activated receptor γ 1 and γ 2 messenger ribonucleic acid expression in human adipocytes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.9, p.4203-07, 2002.
105. SHIGETA, H.; SHIGETA, M.; NAKAZAWA, A.; NAKAMURA, N.; YOSHIKAWA, T. Lifestyle, obesity and insulin resistance. **Diabetes Care**, v.24, n.3, p.608, 2001.

106. SOLINAS, A.; THELWELL, N.; BROWN, T. Intramolecular TaqMan probes for genetic analysis. **Chemical Communications**, p.2272-73, 2002.
107. SOOD, V.; COLLERAN, K.; BURGE, M. R. Thiazolidinediones: a comparative review of approved uses. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v.2, n.3, p.429-40, 2000.
108. SORIGUER, F.; MORCILLO, S.; CARDONA, F.; ROJO-MARTÍNEZ, G.; ALMARÁZ, M. C.; ADANA, M. S. R.; OLVEIRA, G.; TINAHONES, F.; ESTEVA, I. Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.2325-30, 2006.
109. SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. **Cell**, v.87, p. 377-89, 1996.
110. SPURLOCK, M. E.; HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P.; CORNELIUS, S. G.; WILLIS, G. M.; BIDWELL, C. A. Regulation of PPAR γ but not obese gene expression by dietary fat supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.260-66, 2000.
111. STATISTICAL PACKAGE FOR SOCIAL SCIENCES 11.0 (SPSS 11.0) for Mac[®] OS X.
112. STORLIEN, L. H.; HIGGINS, J. A.; THOMAS, T. C.; BROWN, M. A.; WANG, H. Q.; HUANG, X. F.; ELSE, P. L. Diet composition and insulin action in animal models. **British Journal of Nutrition**, v.83, suppl.1, p.S85-90, 2000.
113. STUMVOLL, M.; WAHL, H. G.; LOBLEIN, K.; BECKER, R.; MACHICAO, F.; JACOB, S.; HARING, H. Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene is associated with increase antilipolytic insulin sensitivity. **Diabetes**, v.50, p.876-81, 2001.
114. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) / NEPA (Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação) – UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas). Versão II. 2.ed. Campinas: SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.**
115. TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C.; RODRIGUES, A. C.; MONTE, O. ; SALLES, J. E. N.; SCALISSI, N.; SPERANZA, A. C.; HIRATA, M. H. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v.7, p.605–11, 2005.

116. TEBOUL, M.; BARRAT-PETIT, M. A.; LI, X. M.; CLAUSTRAT, B.; FORMENTO, J. L.; DELAUNAY, F.; LÉVI, F.; MILANO, G. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Molecular Medicine**, v.83, p.693-99, 2005.
117. TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; HANEFELD, M.; CHINETTI, G.; ZAWADZKI, C.; HAULON, T.; KUBASZEK, A.; KOEHLER, C.; LEONHARDT, W.; STAELS, B.; LAAKSO, M. Ala12ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protects against atherosclerosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, n.9, p.4238-42, 2004.
118. The International Federation of Diabetes (IDF) consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. **International Diabetes Federation**, 2005.
119. TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v.79, p.1147-56, 1994.
120. VACARO, O.; MANCINI, F. P.; SABATINO, L.; COLANTUONI, V.; RICCARDI, G. Pro12Ala mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) and severe obesity: a case-control study. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.24, p.1195-9, 2000.
121. VALVE, R.; SIVENIUS, K.; MIETTINEN, R.; PIHLAJAMÄKI, J.; RISSANEN, A.; DEEB, S. S.; AUWERX, J.; UUSITUPA, M.; LAAKSON, M. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene are associated with severe overweight among obese women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, n.10, p.3708-12, 1999.
122. VASSEUR, F.; HELBECQUE, N.; LOBBENS, S.; VASSEUR-DELANNOY, V.; DINA, C.; CLÉMENT, K.; BOUTIN, P.; KADOWAKI, T.; SCHERER, P. E.; FROGUEL, P. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. **Diabetologia**, v.48, p.892-99, 2005.
123. VERMA, N. K.; SINGH, J.; DEY, C. S. PPAR- γ expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v.143, p.1006-13, 2004.

124. VERRETH, W.; DE KEYSER, D.; PELAT, M.; VERHAMME, P.; GANAME, J.; BIELICKI, J. K.; MERTENS, A.; QUARCK, R.; BENHABILÈS, N.; MARGUERIE, G.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; NINIO, E.; HERREGODS, M. C.; BALLIGAND, J. L.; HOLVOET, P. Weight loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor- α and peroxisome proliferators-activated receptor- γ correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. **Circulation**, v.110, p.3259-69, 2004.
125. VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; LOWELL, B. B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J. S.; MOLLER, D. E. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, v.97, p.2553-61, 1996.
126. VIDAL-PUIG, A.; CONSIDINE, R. V.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; WERMAN, A.; PORIES, W. J.; CARO, J. F.; FLIER, J. S. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.10, p.2416-22, 1997.
127. VIEIRA-FILHO, J. P. B.; REIS, A. F.; KASAMATSU, T. S.; TAVARES, E. F.; FRANCO, L. J.; MATIOLI, S. R.; MOISES, R. S. Influence of the polymorphisms Trp64Arg in the β 3-adrenergic receptor gene and Pro12Ala in the PPAR γ 2 gene on metabolic syndrome-related phenotypes in an indigenous population of the Brazilian Amazon. **Diabetes Care**, v.26, n.2, p.621-22, 2004.
128. VIGUERIE, N.; VIDAL, H.; ARNER, P.; HOLST, C.; VERDICH, C.; AVIZOU, S.; ASTRUP, A.; SARIS, W. H. M.; MACDONALD, I. A.; KLIMCAKOVA, E.; CLÉMENT, K.; MARTINEZ, A.; HOFFSTEDT, J.; SØRENSEN, T. I. A.; LANGIN, D. Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. **Diabetologia**, v.48, p.123-31, 2005.
129. WESTERTERP-PLANTEGA, M. S.; FREDRIX, E. W. H. M.; STEFFENS, A. B. **Food intake and energy expenditure**. Florida: CRC, 1994. 408p.
130. WESTERTERP-PLANTEGA, M. S.; WIJCKMANS-DUIJSENS, N. E. G.; VERBOEKET-VAN DE VENNE, W. P. G.; GRAAF, K. H.; WESTSTRATE, J. A. Energy intake and body weight effects of six months reduced or full fat diets, as a function of dietary restraint. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.22, n.1, p.14-22, 1998.
131. **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. Technical report series 854, p.1-452, Geneva, 1995.

132. **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Obesity: prevention and managing the global epidemic. Geneva, 1998.
133. **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, 2003.
134. WOODS, S. C.; SEELEY, R. L. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. **Nutrition**, v.16, p.894-902, 2000.
135. YEN, C-J.; BEAMER, B. A.; NEGRI, C.; SILVER, K.; BROWN, K. A.; YARNALL, D. P.; BURNS, D. K.; ROTH, J.; SHULDINER, A. R. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 missense mutation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.241, p.270-4, 1997.
136. ZEGHARI, N.; VIDAL, H.; YOUNSI, M.; ZIEGLER, O.; DROUIN, P.; DONNER, M. Adipocyte membrana phospholipids e expressão de PPAR-g em mulheres obesas: relação para hyperinsulinemia. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.279, p.E736-E743, 2000.
137. 7.500 REAL-TIME PCR SYSTEM SEQUENCE DETECTION SOFTWARE, 1.3. **Applied Biosystems**, USA, 2004.

7 – Anexos

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

Luiz Carlos Duarte
de Miranda

Médico - Prof. Adjunto

Secretário:

Mário Teixeira Antonio

Farmacêutico - Especialista

Membros Titulares:

Alice Helena Dama Viçente

Médico - Prof. Adjunto

Antonio de Magalhães

Marinho

Enfermeiro - Mestre

Beatriz Moriz Triope

Médico - Doutorado

Beatriz Rocha Miranda

Venturi

Odonólogo - Prof. Substituto

Eduardo Jorge Bastos

Côrtes

Médico - Prof. Assistente

Eliza Regina Ambrosio

Assistente Social - Mestre

Luiz Bonfim Pereira da

Carvalho

Médico - Especialista

Maria de Fátima Gustavo

Lopes

Representante dos Usuários

Paulo Feijó Barros

Médico - Prof. Adjunto

Rodrigo Teixeira Santos

Aluno de Graduação - FM

Zuzanna Rodrigues da Silva

Professora

Membros Suplentes

Alberto Kravym Arbex

Médico - Doutorado

Alexandre Carvalho

Aluno de Graduação - FM

Daniel Savignon Marinho

Farmacêutico - Especialista

Helena Warzynsky

Representante dos Usuários

Lúzia da Conceição de

Anaújo Marques

Enfermeiro - Mestre

Maria Adelaide Moreira

dos Santos

Nutricionista - Mestre

Mário Fernando Petzhold

Engenheiro - Doutor

Orlando Nunes Coesma

Sociólogo - Doutor

Roberto Blanco dos Santos

Médico - Bacharel de

Direito

Roberto Coury Pedrosa

Médico - Doutor

Vania Dias de Oliveira

Assistente Social

CEP - MEMO - n° 869/05

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2005.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dr. Eliane Lopes Rosado.

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 116/05 - CEP

Título: "Efeito do Polimorfismo no gene PPAR γ 2 e dos lipídios da dieta na resistência à insulina e na composição corporal de indivíduos obesos de grau 3".

Pesquisador (a) responsável: Dr. Eliane Lopes Rosado.

Data de apreciação do parecer: 26/09/2005

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 26/03/06, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

Anexo II: TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E DIETÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Conselho Nacional de Saúde

1º) Termo de Esclarecimento

Efeito do Polimorfismo no gene PPAR γ 2 e dos lipídios da dieta na resistência à insulina e na composição corporal de indivíduos obesos de grau 3

A Sra está convidada a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar o efeito de um gene e das gorduras da dieta na ação do hormônio chamado insulina, que está relacionado com várias complicações que ocorrem na obesidade. Também analisaremos o efeito do mesmo gene e da gordura da dieta na sua composição corporal. Os resultados fornecerão conhecimentos para avanços no tratamento dietético da obesidade.

A Sra deverá responder a questionários de informações gerais e dietéticas e doar amostras de sangue em jejum e após ingerir uma dieta teste. O sangue será coletado na sua veia do antebraço, por pessoal devidamente treinado com assepsia e higiene, sendo que no início do estudo faremos uma coleta em jejum e três coletas após a ingestão da dieta teste, e após 45 dias de estudo faremos apenas uma coleta em jejum. Iremos avaliar seu peso, sua altura, sua circunferência da cintura e do quadril.

Em seguida lhe passaremos a dieta para perda de peso, a qual será seguida durante dois meses. Faremos revisões quinzenais e individuais. Após 45 dias de dieta, novamente coletaremos a amostra de sangue e avaliaremos seu peso e as circunferências.

A Sra não sofrerá nenhum risco com a participação no estudo. Os desconfortos são aqueles associados com a coleta de sangue. Em raras ocasiões a coleta de sangue poderá provocar um hematoma. Os equipamentos e materiais usados para estes procedimentos serão descartáveis. Não haverá perfuração ou formação de ferida na pele.

Qualquer problema que não seja da pesquisa e que a Sra tenha durante o tempo que estiver participando do estudo, deverá ser tratado pela Sra, ou seja, o estudo não assume nenhum compromisso no tratamento de outras doenças, já que o mesmo não está associado a nenhum dano à saúde. Nestes casos, a Sra deverá comunicar a equipe do estudo todas as informações referentes à doença e o seu tratamento. Se existir algum problema resultante da pesquisa, a Sra deverá comunicar às pessoas que estão te atendendo, qualquer horário do dia.

Os resultados da pesquisa serão fornecidos somente no final do estudo, quando a Sra será orientado nutricionalmente para ajudar no seu tratamento.

Em qualquer etapa do estudo, a Sra terá acesso ao profissional responsável que poderá ser encontrado na Rua Brigadeiro Trompowski s/n - edifício do CCS - bloco J - 2º andar - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro (RJ) - CEP:21941-590. Telefones (21)2562.6601 e (21)97623859. E-mail: elianenut@yahoo.com.br ou elianerosado@nutricao.ufrj.br. Ou 21.93021717 (Marcia) ou (24) 87727782 (Vanessa). E-mail: mfofano@ig.com.br ou vanessachaia@uol.com.br. Se a Sr(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - sala 01D-46 - 1º andar, fone 2562-2480 - e-mail: ccp@hucff.ufrj.br.

É garantida a liberdade de querer não participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Os resultados serão analisados em conjunto com os resultados dos outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum voluntário. Todas as amostras coletadas serão utilizadas apenas para as análises relativas a esta pesquisa. Os resultados serão apresentados em revistas e congressos científicos.

Tanto os resultados de seus exames, quanto a avaliação do prontuário somente será realizada pelos pesquisadores deste estudo e pelos profissionais que estarão relacionados com seu atendimento e que estarão cuidando da Sra, e não será permitido que outras pessoas vejam seus resultados, garantindo proteção contra qualquer tipo de discriminação.

A Sra poderá, em qualquer momento do estudo, pedir informações. Também não terá despesas no decorrer do projeto, não pagará pelos exames e pelas outras avaliações. Também não terá compensações financeiras durante e ao final do estudo.

Caso ocorra algum dano pessoal resultante do estudo a Sra terá direito ao atendimento pelos pesquisadores ou encaminhamento na Instituição.

2º) Termo de Consentimento

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo apresentado acima, que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a Dra Eliane Lopes Rosado, e as Nutricionista Marcia Fófano do Lago e Vanessa Chaia, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta instituição. Também abro mão de indenizações ou ressarcimentos neste estudo.

3º) Local e data, assinatura do voluntário e por cada um dos sujeitos da pesquisa

(assinatura do paciente)

Nome:

Data: __/__/__

Profª Dra Eliane Lopes Rosado

(Pesquisador responsável)

Data: __/__/__

Nutricionista Marcia Fófano

(Pesquisador)

Data: __/__/__

Nutricionista Vanessa Chaia

(Pesquisador)

Data: __/__/__

Anexo III:



INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO (UFRJ)

PROJETO: EFEITO DO POLIMORFISMO NO GENE PPAR γ 2 E DOS LIPÍDIOS DA DIETA NA RESISTÊNCIA À INSULINA E NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE INDIVÍDUOS OBESOS DE GRAU 3.

COORDENAÇÃO: PROFA. DRA. ELIANE LOPES ROSADO

Questionário para a coleta de informações das voluntárias:

1. Identificação:

Nome : _____ Data: _____
Sexo: _____ Idade: _____ Data de nascimento _____
Endereço: _____
Telefone: _____
Escolaridade: _____
Profissão: _____
Estado civil: () Casada () Solteira () Divorciada () Viúva
Moradia: () Sozinha () Com a família Obs.: _____
() Casa própria () alugada
Renda Familiar (Salários mínimos): _____
Quanto cômodos possui sua casa? _____
Possui saneamento básico? () Água tratada () Esgoto tratado () Não
Vida social: () Sim () Não
Quando se sentiu gordo: _____
Início da obesidade: _____
Peso ao nascer: _____
Adolescência: () Peso normal () Sobrepeso () Obesidade
Atividade física na adolescência: () Sim () Não Qual? _____
Gravidez: N.º vezes: _____ Intercorrências: _____
Peso inicial _____ Peso total no período _____ Maior peso _____
Fumante: () Sim () Não
Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros por dia? _____
Etilista: () Sim () Não
Há quanto tempo? _____ Frequência: _____ Quantidade: _____

2. Avaliação Clínica:

Sinais e sintomas	Sim	Não
Queda de cabelo		
Unhas quebradiças		
Dermatite		
Edema		
Sonolência		
Dispneia		
Constipação intestinal		
Diarréia		
Flatulência		

3. Atividade Física:

a) Você pratica alguma atividade física?

() Sim () Não

Que tipo? _____

Em que frequência e duração? _____

10. Avaliação dietética:

10.1. Tabus e mitos alimentares

10.2. Anamnese Alimentar:

	Alimentação / Preparação	Medida Caseira	Quantidade (grama)
Desjejum			
Hora:			
Local:			
Colação			
Hora:			
Local:			
Almoço			
Hora:			
Local:			
Lanche			
Hora:			
Local:			
Jantar			
Hora:			
Local:			
Ceia:			
Hora:			
Local:			

10.3. Análise Química Semi-Quantitativa:

VCT = Kcal
 CHO :g ;% VCT
 LIP :g ;% VCT
 PROT :g ;% VCT ;g/Kg de peso
 Fibra :g (total) ;g / 100 Kcal

10.4. Questionário de frequência alimentar:

Alimentos	Não	Sim	Diária	Semanal	Mensal	Observações
LEITE E DERIVADOS INTEGRAL						
LEITE E DERIVADOS SEMI DESNATADO						
LEITE E DERIVADOS DESNATADO						
OVOS						
CARNE BOVINA						
FRANGO						
PEIXE						
PORCO						
LEGUMINOSAS						
VEGETAIS (A/B/C)						
FRUTAS						
CEREAIS						
PAO / BISCOITO						
DOCES / BOLOS/ PUDIM						
MARGARINA / MANTEIGA						
OLEO						
BANHA						
AZEITE						
BEBIDAS ALCOÓLICAS						
REFRIGERANTES						
ÁGUA						

Anexo IV:



INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO (UFRJ)
PROJETO: EFEITO DO POLIMORFISMO NO GENE PPAR γ 2 E DOS LIPÍDIOS DA DIETA
NA RESISTÊNCIA À INSULINA E NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE INDIVÍDUOS
OBESOS DE GRAU 3.

COORDENAÇÃO: PROFA. DRA. ELIANE LOPES ROSADO

Registro Alimentar (3 vias):

	Alimentação / Preparação	Medida Caseira	Quantidade (g)
Desjejum			
Hora:			
Local:			
Colação			
Hora:			
Local:			
Almoço			
Hora:			
Local:			
Lanche			
Hora:			
Local:			
Jantar			
Hora:			
Local:			
Ceia			
Hora:			
Local:			

ANEXO V
Cálculo da Dieta Teste

nº Paciente	VET	Valor calórico Dieta teste (17.5% VET)	Carboidratos 50% VET Mínimo	Carboidratos (g) Mínimo	Carboidratos 60% VET Máximo	Carboidratos (g) Máximo	Proteínas 15% VET Mínimo	Proteínas (g) Mínimo	Proteínas 20% VET Máximo	Proteínas (g) Máximo	Lipídios 25% VET Mínimo	Lipídios (g) Mínimo	Lipídios 35% VET Máximo	Lipídios (g) Máximo
1800		315.0	157.5	39.4	189.0	47.3	47.3	11.8	63.0	15.8	78.8	8.8	110.3	12.3
1900		332.5	166.3	41.6	199.5	49.9	49.9	12.5	66.5	16.6	83.1	9.2	116.4	12.9
2000		350.0	175.0	43.8	210.0	52.5	52.5	13.1	70.0	17.5	87.5	9.7	122.5	13.6
2100		367.5	183.8	45.9	220.5	55.1	55.1	13.8	73.5	18.4	91.9	10.2	128.6	14.3
2200		385.0	192.5	48.1	231.0	57.8	57.8	14.4	77.0	19.3	96.3	10.7	134.8	15.0
2300		402.5	201.3	50.3	241.5	60.4	60.4	15.1	80.5	20.1	100.6	11.2	140.9	15.7
2400		420.0	210.0	52.5	252.0	63.0	63.0	15.8	84.0	21.0	105.0	11.7	147.0	16.3
2500		437.5	218.8	54.7	262.5	65.6	65.6	16.4	87.5	21.9	109.4	12.2	153.1	17.0
2600		455.0	227.5	56.9	273.0	68.3	68.3	17.1	91.0	22.8	113.8	12.6	159.3	17.7
2700		472.5	236.3	59.1	283.5	70.9	70.9	17.7	94.5	23.6	118.1	13.1	165.4	18.4
2800		490.0	245.0	61.3	294.0	73.5	73.5	18.4	98.0	24.5	122.5	13.6	171.5	19.1
2900		507.5	253.8	63.4	304.5	76.1	76.1	19.0	101.5	25.4	126.9	14.1	177.6	19.7
3000		525.0	262.5	65.6	315.0	78.8	78.8	19.7	105.0	26.3	131.3	14.6	183.8	20.4
3100		542.5	271.3	67.8	325.5	81.4	81.4	20.3	108.5	27.1	135.6	15.1	189.9	21.1
3200		560.0	280.0	70.0	336.0	84.0	84.0	21.0	112.0	28.0	140.0	15.6	196.0	21.8
3300		577.5	288.8	72.2	346.5	86.6	86.6	21.7	115.5	28.9	144.4	16.0	202.1	22.5
3400		595.0	297.5	74.4	357.0	89.3	89.3	22.3	119.0	29.8	148.8	16.5	208.3	23.1
3500		612.5	306.3	76.6	367.5	91.9	91.9	23.0	122.5	30.6	153.1	17.0	214.4	23.8
3600		630.0	315.0	78.8	378.0	94.5	94.5	23.6	126.0	31.5	157.5	17.5	220.5	24.5
3700		647.5	323.8	80.9	388.5	97.1	97.1	24.3	129.5	32.4	161.9	18.0	226.6	25.2
3800		665.0	332.5	83.1	399.0	99.8	99.8	24.9	133.0	33.3	166.3	18.5	232.8	25.9
3900		682.5	341.3	85.3	409.5	102.4	102.4	25.6	136.5	34.1	170.6	19.0	238.9	26.5
4000		700.0	350.0	87.5	420.0	105.0	105.0	26.3	140.0	35.0	175.0	19.4	245.0	27.2

nº Paciente	VET	Valor calórico Dieta teste (17.5% VET)	AGMI 10%	AGMI (g)	AGS < 10%	AGS (g)	AGPI 15%	AGPI (g)
1800		315.0	31.5	3.5	31.5	3.5	47.3	5.3
1900		332.5	33.3	3.7	33.3	3.7	49.9	5.5
2000		350.0	35.0	3.9	35.0	3.9	52.5	5.8
2100		367.5	36.8	4.1	36.8	4.1	55.1	6.1
2200		385.0	38.5	4.3	38.5	4.3	57.8	6.4
2300		402.5	40.3	4.5	40.3	4.5	60.4	6.7
2400		420.0	42.0	4.7	42.0	4.7	63.0	7.0
2500		437.5	43.8	4.9	43.8	4.9	65.6	7.3
2600		455.0	45.5	5.1	45.5	5.1	68.3	7.6
2700		472.5	47.3	5.3	47.3	5.3	70.9	7.9
2800		490.0	49.0	5.4	49.0	5.4	73.5	8.2
2900		507.5	50.8	5.6	50.8	5.6	76.1	8.5
3000		525.0	52.5	5.8	52.5	5.8	78.8	8.8
3100		542.5	54.3	6.0	54.3	6.0	81.4	9.0
3200		560.0	56.0	6.2	56.0	6.2	84.0	9.3
3300		577.5	57.8	6.4	57.8	6.4	86.6	9.6
3400		595.0	59.5	6.6	59.5	6.6	89.3	9.9
3500		612.5	61.3	6.8	61.3	6.8	91.9	10.2
3600		630.0	63.0	7.0	63.0	7.0	94.5	10.5
3700		647.5	64.8	7.2	64.8	7.2	97.1	10.8
3800		665.0	66.5	7.4	66.5	7.4	99.8	11.1
3900		682.5	68.3	7.6	68.3	7.6	102.4	11.4
4000		700.0	70.0	7.8	70.0	7.8	105.0	11.7

ANEXO VI

Composição Química da Dieta Teste considerando o VET das voluntárias

Tabela Padrão (100g)

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	1	51.30	9.90	4.40	0.97	1.87	0.99	284.40	100g
Ricota (1024)	1	5.14	11.40	7.91	4.93	2.31	0.26	137.35	100g
Bolo	1	55.53	3.78	21.01	3.23	5.04	11.57	426.33	100g
Leite desnatado (132)	1	4.85	3.41	0.18	0.12	0.05	0.01	34.66	100mL
Óleo de soja	1	0.00	0.00	92.14	13.27	21.47	53.35	829.26	100mL
iogurte desnatado (2000)	1	7.04	5.25	1.55	1.00	0.43	0.04	63.11	100g

VET 2.000 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.12	6.16	1.19	0.53	0.12	0.22	0.12	34.13	100g
Ricota (1024)	0.30	1.54	3.42	2.37	1.48	0.69	0.08	41.21	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Total		45.16	13.32	13.77	3.45	3.54	6.00	357.82	

VET 2.100 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.15	7.70	1.49	0.66	0.15	0.28	0.15	42.66	100g
Ricota (1024)	0.30	1.54	3.42	2.37	1.48	0.69	0.08	41.21	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Total		46.70	13.62	13.90	3.48	3.59	6.03	366.35	

VET 2.200 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.20	10.26	1.98	0.88	0.19	0.37	0.20	56.88	100g
Ricota (1024)	0.30	1.54	3.42	2.37	1.48	0.69	0.08	41.21	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.01	0.00	0.00	0.92	0.13	0.21	0.53	8.29	100mL
Total		49.27	14.11	15.04	3.66	3.90	6.61	388.86	

VET 2.300 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.28	14.36	2.77	1.23	0.27	0.52	0.28	79.63	100g
Ricota (1024)	0.30	1.54	3.42	2.37	1.48	0.69	0.08	41.21	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.01	0.00	0.00	0.92	0.13	0.21	0.53	8.29	100mL
Total		53.37	14.90	15.39	3.74	4.05	6.7	411.61	

VET 2.400 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.28	14.36	2.77	1.23	0.27	0.52	0.28	79.63	100g
Ricota (1024)	0.40	2.06	4.56	3.16	1.97	0.92	0.10	54.94	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.01	0.00	0.00	0.92	0.13	0.21	0.53	8.29	100mL
Total		53.89	16.04	16.18	4.23	4.28	6.7	425.35	

VET 2.500 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.35	17.96	3.47	1.54	0.34	0.65	0.35	99.54	100g
Ricota (1024)	0.30	1.54	3.42	2.37	1.48	0.69	0.08	41.21	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.02	0.00	0.00	1.84	0.27	0.43	1.07	16.59	100mL
Total		56.96	15.60	16.62	3.94	4.40	7.30	439.82	

VET 2.600 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.32	16.42	3.17	1.41	0.31	0.60	0.32	91.01	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.02	0.00	0.00	1.84	0.27	0.43	1.07	16.59	100mL
Total		56.45	17.58	18.07	4.90	4.80	7.32	458.75	

VET 2.700 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.40	20.52	3.96	1.76	0.39	0.75	0.40	113.76	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.02	0.00	0.00	1.84	0.27	0.43	1.07	16.59	100mL
Total		60.56	18.37	18.42	4.97	4.95	7.40	481.51	

VET 2.800 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.45	23.09	4.46	1.98	0.44	0.84	0.45	127.98	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.03	0.00	0.00	2.76	0.40	0.64	1.60	24.88	100mL
Total		63.12	18.87	19.56	5.15	5.26	7.98	504.02	

VET 2.900 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.45	23.09	4.46	1.98	0.44	0.84	0.45	127.98	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.04	0.00	0.00	3.69	0.53	0.86	2.13	33.17	100mL
Total		63.12	18.87	20.49	5.29	5.48	8.51	512.31	

VET 3.000 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.50	25.65	4.95	2.20	0.49	0.94	0.50	142.20	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.50	27.77	1.89	10.51	1.62	2.52	5.79	213.17	100g
Leite desnatado (132)	2.00	9.70	6.82	0.36	0.24	0.10	0.02	69.32	100mL
Óleo de soja	0.04	0.00	0.00	3.69	0.53	0.86	2.13	33.17	100mL
Total		65.69	19.36	20.71	5.34	5.57	8.56	526.53	

VET 3.100 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.30	15.39	2.97	1.32	0.29	0.56	0.30	85.32	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	2.50	12.13	8.53	0.45	0.30	0.13	0.03	86.65	100mL
Óleo de soja	0.01	0.00	0.00	0.92	0.13	0.21	0.53	8.29	100mL
Total		68.96	19.84	21.35	5.45	5.58	9.08	547.37	

VET 3.200 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.35	17.96	3.47	1.54	0.34	0.65	0.35	99.54	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	2.50	12.13	8.53	0.45	0.30	0.13	0.03	86.65	100mL
Óleo de soja	0.01	0.00	0.00	0.92	0.13	0.21	0.53	8.29	100mL
Total		71.52	20.34	21.57	5.50	5.68	9.13	561.59	

VET 3.300 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.40	20.52	3.96	1.76	0.39	0.75	0.40	113.76	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	2.50	12.13	8.53	0.45	0.30	0.13	0.03	86.65	100mL
Óleo de soja	0.02	0.00	0.00	1.84	0.27	0.43	1.07	16.59	100mL
Total		74.09	20.83	22.71	5.68	5.99	9.72	584.10	

VET 3.400 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.45	23.09	4.46	1.98	0.44	0.84	0.45	127.98	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	2.50	12.13	8.53	0.45	0.30	0.13	0.03	86.65	100mL
Óleo de soja	0.02	0.00	0.00	1.84	0.27	0.43	1.07	16.59	100mL
Total		76.65	21.33	22.93	5.73	6.08	9.77	598.32	

VET 3.500 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.40	20.52	3.96	1.76	0.39	0.75	0.40	113.76	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	3.00	14.55	10.23	0.54	0.36	0.15	0.03	103.98	100mL
Óleo de soja	0.03	0.00	0.00	2.76	0.40	0.64	1.60	24.88	100mL
Total		76.51	22.54	23.73	5.87	6.23	10.26	609.72	

VET 3.600 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.50	25.65	4.95	2.20	0.49	0.94	0.50	142.20	100g
Ricota (1024)	0.50	2.57	5.70	3.96	2.47	1.16	0.13	68.68	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	3.00	14.55	10.23	0.54	0.36	0.15	0.03	103.98	100mL
Óleo de soja	0.03	0.00	0.00	2.76	0.40	0.64	1.60	24.88	100mL
Total		81.64	23.53	24.17	5.97	6.41	10.35	638.16	

VET 3.700 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.50	25.65	4.95	2.20	0.49	0.94	0.50	142.20	100g
Ricota (1024)	0.70	3.60	7.98	5.54	3.45	1.62	0.18	96.15	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	2.50	12.13	8.53	0.45	0.30	0.13	0.03	86.65	100mL
Óleo de soja	0.03	0.00	0.00	2.76	0.40	0.64	1.60	24.88	100mL
Total		80.24	24.10	25.66	6.90	6.85	10.40	648.30	

VET 3.800 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.50	25.65	4.95	2.20	0.49	0.94	0.50	142.20	100g
Ricota (1024)	0.70	3.60	7.98	5.54	3.45	1.62	0.18	96.15	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	3.00	14.55	10.23	0.54	0.36	0.15	0.03	103.98	100mL
Óleo de soja	0.04	0.00	0.00	3.69	0.53	0.86	2.13	33.17	100mL
Total		82.67	25.81	26.67	7.09	7.09	10.94	673.93	

VET 3.900 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.55	28.22	5.45	2.42	0.53	1.03	0.54	156.42	100g
Ricota (1024)	0.70	3.60	7.98	5.54	3.45	1.62	0.18	96.15	100g
Bolo	0.70	38.87	2.65	14.71	2.26	3.53	8.10	298.43	100g
Leite desnatado (132)	3.00	14.55	10.23	0.54	0.36	0.15	0.03	103.98	100mL
Óleo de soja	0.04	0.00	0.00	3.69	0.53	0.86	2.13	33.17	100mL
Total		85.23	26.30	26.89	7.14	7.18	10.99	688.15	

VET 4.000 KCAL

Alimentos/Código	Quantidade	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)	AGS	AGMI	AGPI	KCAL	Obs
Torradas (42031)	0.40	20.52	3.96	1.76	0.39	0.75	0.40	113.76	100g
Ricota (1024)	0.70	3.60	7.98	5.54	3.45	1.62	0.18	96.15	100g
Bolo	0.90	49.98	3.40	18.91	2.91	4.54	10.41	383.70	100g
Leite desnatado (132)	3.00	14.55	10.23	0.54	0.36	0.15	0.03	103.98	100mL
Óleo de soja	0.01	0.00	0.00	0.92	0.13	0.21	0.53	8.29	100mL
Total		88.65	25.57	27.67	7.24	7.27	11.55	705.87	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)