

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

DANIELLA ESTEVES DUQUE GUIMARÃES

**EFEITO DA INGESTÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* E POLIINSATURADOS
DA SÉRIE N-6 E N-3 NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO
ENDÓCRINA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO – ESTUDO EM RATOS**

Rio de Janeiro

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DANIELLA ESTEVES DUQUE GUIMARÃES

**EFEITO DA INGESTÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* E POLIINSATURADOS
DA SÉRIE N-6 E N-3 NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO
ENDÓCRINA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO - ESTUDO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

**Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Tavares do Carmo
Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha**

Rio de Janeiro

2006

Guimarães, Daniella Esteves Duque

EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* E POLIINSATURADOS DA SÉRIE N-6 E N-3 NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO ENDÓCRINA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO - ESTUDO EM RATOS./ Daniella Esteves Duque Guimarães, Rio de Janeiro: UFRJ/CCS, 2006. xvii, 125f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2006.

Orientadores: Maria das Graças Tavares do Carmo e Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha

1. ácidos graxos. 2. tecido adiposo. 3. adipocinas. 4. expressão gênica. 5. ratos.

DANIELLA ESTEVES DUQUE GUIMARÃES

Efeito da ingestão dos ácidos graxos *trans* e poliinsaturados da série n-6 e n-3 na expressão de genes associados à função endócrina do tecido adiposo branco - estudo em ratos.

Rio de Janeiro, de de 2006

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria das Graças Tavares do Carmo
Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ
Presidente

Dra. Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha
Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ
Co-orientador

Dra. Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Instituto de Biofísica /UFRJ

Dra. Susana Ortiz Costa
Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ

Dra. Eliane Fialho de Oliveira
Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ
Revisor

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação das Prof^{as} Dr^{as} Maria das Graças Tavares do Carmo e Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha, contando ainda com as seguintes colaborações:

1. Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidad San Pablo – CEU, Espanha;
2. Unidade de Lipídeos do Departamento de Bioquímica do Hospital Ramón y Cajal – Espanha.

Apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) e Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial a Pró Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa (PR-2 /UFRJ).

**“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”**

Leonardo da Vinci

**Aos meus pais, Francisco e Sylvana pelo amor,
confiança e incentivo em toda a minha vida.**

Agradecimentos

A minha querida orientadora Prof^a Maria das Graças, meu profundo agradecimento pela confiança, paciência e grande oportunidade que tanto contribuíram para meu aprendizado. Acima de tudo pelo estímulo, conhecimento, espírito científico e amizade ao longo desses vários anos. Muito obrigada por sempre querer o melhor para a minha formação e me ajudar no que for preciso! Minha gratidão e respeito.

Ao grande cientista, Prof^o Emilio Herrera, pela sua fundamental contribuição, sabedoria e por ser um profissional exemplar tanto do ponto de vista ético, científico e humanitário. Muito obrigada por toda a atenção e preocupação comigo durante o período sob a sua orientação, não saberia descrever todo o meu aprendizado e os inúmeros bons momentos!

A minha co-orientadora Prof^a Fátima, pela sua contribuição, competência, amizade e apoio, importantes no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof^o Javier Botas, pela simplicidade em passar o conhecimento, paciência, disponibilidade e valiosa ajuda e participação em importante parte desta dissertação.

A Prof^a Pilar, pela colaboração com o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof^a Eliane Fialho, pela disposição, auxílio e amizade.

Ao querido Javi, que desde o primeiro momento esteve ao meu lado, ajudando de todas e das melhores formas possíveis. Inesquecível!

A Prof^a Susana, minha amiga que só tenho a agradecer pelo apoio com palavras sábias em todo o decorrer desta fase.

A Prof^a Henar, que no primeiro dia em que nos conhecemos já nos tornamos grandes amigas! Muito obrigada por todos os momentos que passamos juntas.

A Mila, que durante todo o período que convivemos sempre esteve como uma mãe, ajudando no que fosse necessário para que eu estivesse bem.

A todas as amigas do Laboratório de Bioquímica Nutricional que conviveram comigo durante estes últimos 5 anos! Obrigada por todo o apoio e amizade que permaneceram mesmo não estando mais juntas! Em especial a Daniella Mizurini pela grande amizade e por estar ao meu lado nos bons e maus momentos. Muito obrigada por toda a paciência e por nunca desistir de me mostrar o caminho mais sensato.

Aos maravilhosos amigos Maria e Julio, por todos os divertidos momentos que passamos dentro e fora do laboratório. Por toda a disponibilidade em ajudar, atenção e paciência em me compreender. Além dos amigos agregados sempre bem vindos: Elia, Fernando e Curro.

As queridas amigas: Susi e Ceci, pelo carinho e amizade que sempre demonstraram desde que me conheceram e Emer e Hester, por terem compartilhado o dia-a-dia comigo durante parte desta etapa.

Aos amigos Maria Eugênia e Alberto, que pela identificação latina me acolheram desde o primeiro momento e me ajudaram sempre.

Ao amigo Marcelo, pelo conhecimento, valiosas sugestões e disponibilidade em ajudar.

A todos os amigos que sempre estiveram ao meu lado dando todo o apoio e força que eu precisei. Em especial a minha grande amiga Bruna e queridas primas Alexandra e Bruna.

Aos funcionários do Instituto de Nutrição Josué de Castro e Universidad San Pablo por sempre contribuírem para a solução de pequenos contratemplos.

Aos animais, não somente um objeto de estudo. Agradecimento pela passividade.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sumário

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Doenças crônicas não transmissíveis e adiposidade visceral.....	5
2.2 Tecido adiposo branco e adipocinas.....	7
2.2.1 Leptina.....	11
2.2.2 Adiponectina.....	13
2.2.3 Resistina.....	15
2.2.4 Fator de necrose tumoral – α	16
2.3 Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ	17
2.4 Ácidos graxos e expressão de genes pelo tecido adiposo branco.....	21
2.4.1 Ácidos graxos poliinsaturados da série n-6 e n-3.....	22
2.4.2 Ácidos graxos <i>trans</i>	27
3 OBJETIVOS.....	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Animais e condições experimentais.....	32
4.2 Grupos experimentais.....	33
4.3 Formulação das rações.....	33
4.4 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal.....	35
4.5 Coleta de sangue e amostras.....	35
4.6 Perfil bioquímico sanguíneo.....	35
4.6.1 Concentração de triglicerídeo.....	35
4.6.2 Concentração de colesterol total.....	36
4.6.3 Concentração de HDL-colesterol.....	37
4.6.4 Concentração de ácido graxo não esterificado.....	37
4.6.5 Concentração de glicerol.....	38

4.6.6 Concentração de glicose.....	39
4.6.7 Concentração de insulina.....	39
4.7 Quantificação dos ácidos graxos nos lipídios totais do plasma,.....	40
tecido adiposo branco retroperitoneal e dietas experimentais	
4.8 Quantificação de RNAm para resistina, TNF α , adiponectina,.....	41
leptina e PPAR γ no tecido adiposo branco retroperitoneal	
4.8.1 Extração de RNA total.....	41
4.8.2 Eletroforese em gel de agarose.....	42
4.8.3 Transcrição reversa.....	42
4.8.4 PCR em tempo real.....	43
4.9 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Consumo alimentar e massa corporal.....	46
5.2 Composição percentual de ácidos graxos das dietas experimentais.....	49
5.3 Composição percentual de ácidos graxos plasmáticos.....	51
5.4 Composição percentual de ácidos graxos do tecido adiposo branco.....	53
retroperitoneal	
5.5 Perfil bioquímico sanguíneo.....	55
5.6 Expressão de RNAm para resistina, TNF α , adiponectina, leptina e PPAR γ	57
no tecido adiposo branco retroperitoneal	
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	82
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	84
9 ANEXO.....	99

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição das rações utilizadas nos grupos experimentais (g/100g) (AIN-93 com modificações).....	34
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na PCR em tempo real para determinar o nível de expressão dos diferentes genes.....	43
Tabela 3 – Composição percentual média de ácidos graxos das dietas experimentais	50
Tabela 4 – Valores percentuais de ácidos graxos plasmáticos de filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	52
Tabela 5 – Valores percentuais de ácidos graxos do tecido adiposo branco retroperitoneal de filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas no 120º dia de vida....	54
Tabela 6 – Concentrações de parâmetros bioquímicos plasmáticos dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	56
Tabela 7 – Correlação linear (Pearson) entre a expressão dos genes PPAR γ , resistina, TNF α , adiponectina e leptina pelo tecido adiposo branco dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	72

Lista de figuras

Figura 1 Ativação de PPAR γ e seus efeitos na remodelação do tecido adiposo.....	20
Figura 2 Vias de metabolização dos ácidos graxos poliinsaturados.....	26
Figura 3 Isomeria cis-trans dos ácidos graxos.....	28
Figura 4 Gel ilustrativo da integridade do RNA total e do produto da PCR em tempo real..	45
Figura 5 Ingestão alimentar semanal (g de ração/ 100g massa corporal) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas, desde o desmame (4ª semana de vida) até o 120º dia de vida (17ª semana de vida).....	47
Figura 6 Evolução ponderal dos filhotes machos desde o nascimento até a 17ª semana de vida (120º dia de vida) pós-natal.....	48
Figura 7 Expressão de Resistina no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	59
Figura 8 Expressão de TNF α no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	60
Figura 9 Expressão de Adiponectina no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	61
Figura 10 Expressão de Leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	62
Figura 11 Expressão de PPAR γ no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.....	63

Lista de abreviaturas e símbolos

AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGs	Ácidos graxos
AGE	Ácido graxo essencial
AGL	Ácido graxo livre
AGM	Ácido graxo monoinsaturado
AGNE	Ácido graxo não esterificado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGPICL	Ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa
AGS	Ácido graxo saturado
4-AMP	4-aminoanfipirina
C/EBP	Proteína ligante ao amplificador CCAAT
CETP	Proteína transferidora de éster de colesterol
CT	Colesterol total
Ct	Ciclo limiar
DCNT	Doença crônica não transmissível
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas
EPA	Ácido eicosapentaenóico
Glut 4	Transportador de glicose 4
GP	Grupo peixe
GS	Grupo soja
GH	Gordura hidrogenada
GVPH	Gordura vegetal parcialmente hidrogenada
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HSL	Lipase hormônio sensível
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina-6
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipase lipoproteica

n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
n-9	Ômega 9
NFκB	Fator nuclear kapa beta
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-I	Inibidor do ativador de plasminogênio-I
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma
PPRE	Elemento responsivo ao receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RXR	Receptor do 9-cis ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
Rpm	Rotação por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SREBP-1c	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TABR	Tecido adiposo branco retroperitoneal
TAV	Tecido adiposo visceral
TG	Triglicerídeo
TNFα	Fator de necrose tumoral – alfa
TZD	Tiazolidinediona
VLDL-c	Lipoproteína de muito baixa densidade

Resumo

Introdução: Ácidos graxos dietéticos são associados ao desenvolvimento de doenças crônicas, além de serem os principais componentes do tecido adiposo, o qual é um importante órgão regulador do metabolismo. **Objetivo:** No presente estudo foram avaliados os efeitos das dietas ricas em ácidos graxos *trans* e poliinsaturados da série n-6 e n-3 na expressão gênica (RNAm) de resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), adiponectina, leptina, fator de transcrição PPAR γ pelo tecido adiposo branco e parâmetros bioquímicos plasmáticos. **Métodos:** Ratas Wistar foram divididas em 3 grupos onde cada grupo recebeu dieta isocalórica normolipídica contendo óleo de soja (rica em ácido graxo poliinsaturado n6 -GS), óleo de peixe (rica em ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa n3 -GP) ou gordura vegetal parcialmente hidrogenada (rica em ácidos graxos *trans* -GVPH). As diferentes dietas foram oferecidas desde a gestação até o 120º dia de vida pós natal, para os 3 diferentes grupos estudados (n=6/grupo). Nos filhotes machos, aos 120º dias de idade, avaliamos: ingestão alimentar, massa corporal, concentração plasmática de triglicérideo (TG), colesterol total (CT), HDL-colesterol, ácido graxo não esterificado (AGNE), glicerol, glicose, insulina e as relações CT/HDL-colesterol e insulina/glicose, composição percentual de ácidos graxos plasmático e no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABR). Para a análise da expressão dos genes resistina, TNF α , adiponectina, leptina e PPAR γ no TABR foi utilizado a técnica de RT-PCR em tempo real. **Resultados:** Aos 120 dias observamos: a) menor ingestão alimentar na fase pós desmame e maior ganho de massa corporal nos animais do GVPH; b) menor percentual plasmático e incorporação pelo TABR no total de ácidos graxos poliinsaturados e presença de ácidos graxos *trans* no grupo GVPH, maior percentual no plasma e no TABR de ácidos graxos poliinsaturados da série n-6 no GS e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 no GP; c) menor concentração plasmática de TG, CT, HDL-colesterol, AGNE, glicerol e glicose no GP e maior razão CT/HDL-colesterol e insulina/glicose e maior concentração plasmática de insulina no grupo GVPH; d) maior expressão dos genes resistina e TNF α e menor de adiponectina e PPAR γ pelo TABR do GVPH, além de maior expressão de PPAR γ e menor de leptina no GP; e) correlação positiva entre PPAR γ e leptina ($r= 0.93$, $P<0.05$) pelo TABR do GS e correlação negativa entre PPAR γ e TNF α ($r= -0.89$, $P<0.05$) positiva em relação à adiponectina ($r= 0.86$, $P<0.05$) e negativa entre resistina e adiponectina ($r= -0.83$, $P<0.05$) no TABR do GVPH. **Conclusões:** A ingestão de gordura hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, bem como a de ácidos graxos poliinsaturados da série n-6 e n-3 promoveram modificações na expressão de adipocinas e de PPAR γ pelo tecido adiposo branco retroperitoneal dos animais estudados na maturidade. Assim, esses dados sugerem que o tipo de ácido graxo dietético, oferecido desde o período perinatal, pode afetar a função endócrina do tecido adiposo com repercussões no metabolismo energético em ratos.

Abstract

Introduction: Dietary fatty acids have been associated with the development of chronic diseases and the fatty acids are the main components of adipose tissue which is an important regulator organ of the metabolism. **Objective:** In the present study was evaluated the effects of dietary *trans* and n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of resistin, TNF α , adiponectin, leptin and PPAR γ (mRNA) in retroperitoneal adipose tissue (RAT). **Methods:** Female rats Wistar were fed isoenergetic and normolipidic diets containing soy oil (rich in n-6 polyunsaturated fatty acid -SO), fish oil (rich in n-3 long chain polyunsaturated fatty acid - FO) or hydrogenated fat (rich in *trans* fatty acid -HF). The different diets (3 groups with 6 rats/group) were offered to young males rats since gestation until the 120th day of life. In the male rats, at the 120th days of age, we evaluated food intake, body weight, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol, nonesterified fatty acid (NEFA), glycerol, glucose, insulin levels and the TC/HDL-cholesterol and insulin/glucose ratio, plasma and RAT fatty acids composition. The mRNA expression of resistin, TNF α , adiponectin, leptin and PPAR γ was analyzed in RAT using real-time RT-PCR. **Results:** At 120 days we observed: a) lower intake in weaned rats and more body weight gain in HF group; b) lower levels of plasmatic and RAT incorporation of polyunsaturated fatty acids total in HF group and *trans* fatty acids were detected only in this group, reflecting the dietary fatty acid composition. Plasma and RAT lipids of rats from fish oil group contained more long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and soy oil group contained more n-6 polyunsaturated fatty acids; c) the fish group had lower TG, TC, HDL-cholesterol, NEFA, glycerol and glucose levels and the HF group showed higher CT/HDL-c and insulin/glucose ratio and insulin levels; d) there was a higher resistin and TNF α mRNA expression and lower adiponectin and PPAR γ mRNA expression in RAT of HF group, furthermore a higher PPAR γ mRNA expression and lower leptin mRNA expression in RAT of SO group; e) PPAR γ mRNA expression was positively correlated with leptin mRNA expression ($r= 0.93$, $P<0.05$) in RAT from the SO group while it was correlated negatively with TNF α ($r= -0.89$, $P<0.05$) and positively with adiponectin mRNA expression ($r= 0.86$, $P<0.05$) in RAT from the HF group. This group also showed negatively correlation between resistin and adiponectin mRNA expression ($r= -0.83$, $P<0.05$) in RAT. **Conclusions:** The hydrogenated fat intake, rich in *trans* fatty acids as well as n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids, at the adult age, showed modifications in expression of adipokines and PPAR γ in retroperitoneal adipose tissue. Therefore, this data suggests that the kind of dietary fat offered in early life should affect the endocrine function of adipose tissue with repercussions on energy metabolism in rats.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) conceitua a obesidade como uma condição na qual o acúmulo de gordura no tecido adiposo ocorre de forma anormal ou excessiva, numa extensão em que a saúde pode ser prejudicada. Na atualidade, esta condição constitui problema de saúde pública mundial, que acomete todos os estratos da sociedade moderna, indiscriminadamente, sendo a principal co-morbidade associada às doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). O crescente aumento do sobrepeso e da obesidade, não se restringe aos países desenvolvidos e, principalmente nas últimas décadas, está em franca expansão nos países em desenvolvimento como o Brasil. Este quadro mundial, de proporções epidêmicas, é incompatível com a política da OMS, que estabelece a meta da boa saúde para todos (OMS, 2000; Pena e Bacallao, 2000).

Estudos epidemiológicos têm associado à obesidade desordens metabólicas, incluindo intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão, todas relacionadas como fatores de risco para doenças cardiovasculares (Bray *et al.*, 2002). A distribuição regional do acúmulo de tecido adiposo aparece como um importante indicador dessas alterações metabólicas e cardiovasculares (Wajchenberg, 2000).

Há evidências de que o excesso de tecido adiposo visceral está mais associado às complicações metabólicas e hemodinâmicas do que o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo (Després, 2006). O tecido adiposo visceral apresenta elevada atividade lipolítica, liberando ácido graxo (AG) diretamente na veia porta, expondo o fígado a grande concentração deste lipídeo (Nielsen *et al.*, 2004). Devido ao maior volume da massa adiposa visceral em obesos, provavelmente ocorre um aumento dos ácidos graxos livres circulantes e suas complicações (Wajchenberg, 2000).

Às clássicas e reconhecidas funções do tecido adiposo no organismo humano, vêm sendo acrescidas, nos últimos doze anos, propriedades distintas, incluindo o papel de órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocinas. Este conceito emergente define para o tecido adiposo importante função endócrina, mantendo intensa comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos (Hauner, 2004).

As adipocinas influenciam uma variedade de processos fisiológicos, dentre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular e regulação da pressão e coagulação sanguínea (Ahima e Flier, 2000a). Adicionalmente, os adipócitos possuem atividade inflamatória que, no caso de hipertrofia e/ou hiperplasia, estão associados a um processo crônico caracterizado por alterações metabólicas e endócrinas que levam a infiltração de macrófagos e secreção de inúmeros marcadores inflamatórios (Trayhurn e Wood, 2004). A secreção de adipocinas inflamatórias, a partir do tecido adiposo de indivíduos obesos, está envolvida com a inibição da sinalização insulínica e afeta o metabolismo sistêmico (Eckel *et al.*, 2005).

O consumo de lipídeos, pela população mundial, vem aumentando significativamente nas últimas décadas. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) refere que, em várias regiões do Brasil, o consumo de lipídeo ultrapassa a quantidade recomendada pela OMS (IBGE, 2004; WHO, 2003).

O lipídeo é considerado como um constituinte da dieta capaz de modular os processos de diferenciação, crescimento e metabolismo celular. Não somente a sua quantidade, mas também a sua qualidade, têm importante influência nas funções celulares, contribuindo para o desenvolvimento de DCNTs como o diabetes ou a aterosclerose. A hipótese de que o seu consumo excessivo e/ou variações qualitativas na dieta, poderiam alterar a função endócrina do tecido adiposo, modulando a secreção e expressão de adipocinas tem merecido recente e

intensa investigação científica (Bray *et al.*, 2002; Flachs *et al.*, 2006). A regulação da função celular por lipídeos pode ocorrer pela modulação da composição de ácidos graxos da membrana (Fickova *et al.*, 1998) ou através de uma modificação direta na expressão de genes, agindo como fatores de transcrição (Roche, 2004). Particularmente, destaca-se entre outros, o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ) (Evans *et al.*, 2004).

Com o objetivo de prevenir e tratar certas doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas, diversas estratégias nutricionais vêm sendo propostas. Os óleos de peixe são as principais fontes de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa n3 (AGPICL), como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), aos quais são atribuídos efeitos benéficos no controle da inflamação (Simopoulos, 2002a). De fato, estudos indicam uma importante ação antiinflamatória associada à ingestão dos AGPICL da série n-3, inclusive na modulação endócrina e metabólica do tecido adiposo (Neschen, 2006; Todoric *et al.*, 2006).

A literatura sugere ainda que a ingestão de diferentes fontes de AGPIs produz distintos efeitos no metabolismo lipídico e no tecido adiposo, referindo que os AGPIs da série n-6 favorecem o acúmulo de gordura pelo tecido adiposo comparado aos AGPIs da série n-3 (Mizurini, 2006; Fickova *et al.*, 1998). Simopoulos (2002b), em um trabalho de revisão sobre o tema, indica que quantidades excessivas de AGPIs da série n-6 e uma elevada razão AGPI n6/AGPI n3, situações típicas da dieta ocidental atual, contribuem para muitas alterações metabólicas presentes nas DCNTs.

No contexto das alterações metabólicas envolvendo o tecido adiposo e as diferentes fontes lipídicas, ainda são escassos os estudos acerca da ingestão de gordura hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*. Estes AG são insaturados, possuindo pelo menos uma ligação dupla com configuração *trans* (Young, 1986). Recentemente, o ácido elaídico (C18:1*t*9), isômero *trans* do ácido oléico, foi incluído entre os fatores dietéticos de risco para doenças

cardiovasculares (Dlouchy *et al.*, 2003). Bray e colaboradores revisando a literatura acerca da influência de diferentes AGs sobre a obesidade, resistência à insulina e inflamação, constataram que o ácido elaídico pode aumentar a razão insulina/glicose (Bray *et al.*, 2002). Adicionalmente, a literatura refere que o consumo de AG *trans* associa-se positivamente com marcadores inflamatórios (Mozaffarian *et al.*, 2004a), resistência insulínica (Saravanan *et al.*, 2005), além de promover alterações no metabolismo de lipoproteínas (Hu *et al.*, 1997) e expressão de genes (Saravanan *et al.*, 2005).

Apesar do conjunto de informações e associações já descrito, torna-se necessária a investigação dos mecanismos celulares e moleculares, através dos quais os diferentes ácidos graxos da dieta podem modular a função do tecido adiposo. É possível supor que conhecimentos desta natureza contribuam para a elucidação da fisiopatologia de algumas desordens metabólicas associadas às DCNTs.

2.1 Doenças crônicas não transmissíveis e adiposidade visceral

A importância das doenças crônicas não transmissíveis na caracterização do perfil de saúde atual das populações é extremamente relevante, tendo em vista que representam 45,9% de todas as doenças notificadas mundialmente (WHO, 2002). Estimativas da OMS apontam que as DCNTs são responsáveis por 58,5% de todas as mortes. No Brasil, estima-se que apenas as doenças cardiovasculares e as neoplasias respondam por quase metade do total das mortes por causa conhecida. Estima-se que em 2020, dois terços das enfermidades serão atribuídos às DCNTs (Chopra *et al.*, 2002).

Estudos epidemiológicos transversais e prospectivos bem como a experimentação envolvendo animais, têm comprovado, à exaustão, a forte e freqüente associação existente entre DCNTs, dentre estas as doenças cardiovasculares, o diabetes, a obesidade e certos tipos de câncer e um conjunto de fatores de risco, entre os quais destacam-se: o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, a adiposidade abdominal, a hipertensão arterial, a hipercolesterolemia, a alimentação inadequada e a inatividade física (WHO, 2003).

Segundo recente relatório da OMS acerca das relações entre a dieta, a nutrição e a prevenção de DCNTs, a associação entre o ganho de massa corporal, a obesidade abdominal, o sedentarismo e o desenvolvimento de diabetes melitus tipo II é convincente e o consumo alimentar habitual é considerado um dos principais fatores passíveis de modificação relacionados ao desenvolvimento de DCNTs (OMS, 2004).

O consumo de dietas hipercalóricas e ricas em gordura, além do sedentarismo, são as principais modificações de estilo de vida, conseqüentes ao processo de industrialização e constituem os principais fatores relacionados ao aumento da prevalência da obesidade

(Zimmet, 2003; Grubb, 2002), cujo reconhecimento acerca do seu crescimento acelerado está amplamente descrito na literatura. (Perdue *et al.*, 2003; Chopra *et al.*, 2002; Grubb, 2002; Wellman e Friedberg, 2002; WHO, 2002).

Em 1956, Vague já chamava a atenção para a existência de padrões distintos de distribuição da adiposidade corporal. Ao acúmulo de gordura visceral com distribuição central ou abdominal predominante, que caracteriza o perfil andróide associavam-se distúrbios metabólicos tais como hiperuricemia, dislipidemia e hiperglicemia, diferenciando-se metabolicamente da adiposidade periférica ou glúteo-femural que define o padrão ginecóide (Vague, 1956). Como descrito por Marin e colaboradores (1992), a adiposidade abdominal é composta por tecido adiposo subcutâneo e intraabdominal, esta última sendo formada pela gordura visceral ou intraperitoneal, principalmente composta pelos adipócitos da região omental, mesentérica e retroperitoneal (Marin *et al.*, 1992).

Estudos apontam a estreita relação existente entre gordura visceral, resistência à insulina e risco cardiovascular (Chan *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2002; Bjorntorp, 1992). Atualmente, a associação da adiposidade abdominal com outros distúrbios metabólicos também está bem estabelecida. Pacientes com maior grau de resistência à insulina apresentam maior deposição intra-abdominal de gordura (Mokdad *et al.*, 2003). Descreve-se ainda a existência de correlação positiva entre a gordura visceral, a insulinemia e a glicemia, duas horas após sobrecarga oral de glicose, e as concentrações séricas de triglicerídeos e os valores de pressão arterial (Kopelman, 2000). Há referências adicionais sugerindo que a obesidade visceral também possa contribuir para o desenvolvimento de doença arterial coronariana em indivíduos não-obesos (Ruderman *et al.*, 1998).

2.2 Tecido Adiposo Branco e Adipocinas

O tecido adiposo branco representa elevada proporção da massa corporal de indivíduos adultos, cuja importante função metabólica vem sendo elucidada ao longo dos últimos 50 anos (Greenberg e Obin, 2006; Hirsch *et al.*, 1960).

O tecido adiposo sofre variação em função tanto do volume quanto do número de adipócitos. Um aumento na massa do tecido adiposo pode ocorrer por crescimento hipertrófico – aumento do tamanho do adipócito, decorrente, primariamente, do acúmulo de lipídios no interior da célula. De outro modo, o aumento por crescimento hiperplásico – aumento no número de adipócitos, ocorre, primariamente, por atividade mitótica das células precursoras (Hauner, 2004).

A hiperplasia também pode ser referida como o processo de adipogênese resultante do recrutamento de novos adipócitos, originados de células precursoras do tecido adiposo e envolve a proliferação e diferenciação de pré adipócitos (Hausman *et al.*, 2001). O principal processo relacionado à adipogênese é a proliferação das células tronco (*stem cells*) em pré adipócitos e a diferenciação dessas células em adipócitos. Nesta etapa de diferenciação ocorre um recrutamento inicial de adipócitos imaturos e após há um acúmulo de lipídios nessas células, formando assim um adipócito maduro (Hausman *et al.*, 2001).

O crescimento hiperplásico também pode ocorrer na idade adulta, tanto em ratos quanto em humanos. Quando os adipócitos acumulam lipídios e atingem um “tamanho crítico” (hipertrofia), as células precursoras são estimuladas a se diferenciarem, resultando no aumento do número de adipócitos. O alcance do “tamanho crítico”, provavelmente, não ocorre com o aumento moderado da ingestão energética, exceto quando a longo prazo. Além disso, existem, provavelmente, diferenças individuais neste “tamanho crítico”, que irão resultar na formação de novos adipócitos. Uma vez formados, os adipócitos perduram por

toda a vida e apenas uma redução no seu tamanho é possível (Aihaud e Guesnet, 2004; Hausman *et al.*, 2001).

Os eventos moleculares envolvidos neste processo de alteração no número de adipócitos ocorrem mediante um complexo arranjo. A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo precisamente controlado. Fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (*CAAT/enhancer binding protein* – C/EBPs) desempenham um papel-chave na complexa cascata de transcrição e pós tradução que ocorre durante a adipogênese (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006).

É clássico o reconhecimento de que o metabolismo do tecido adiposo é regulado por inervação simpática e por ação de vários hormônios, como a insulina, o cortisol, as catecolaminas, entre outros. O conhecimento científico produzido, especialmente nas últimas décadas, tem permitido ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação e função deste tecido, caracterizando-o como órgão multifuncional. Neste sentido, a importância metabólica do tecido adiposo vem se destacando pelo reconhecimento da sua capacidade de produzir e secretar uma grande variedade de substâncias que atuam tanto local como sistemicamente, participando da regulação de diferentes processos, tais como: a função endotelial, a aterogênese, a sensibilidade à insulina e a regulação do balanço energético, retroalimentando o seu próprio metabolismo. Atualmente, estas substâncias biologicamente ativas, secretadas pelo tecido adiposo, denominam-se adipocinas. Leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), inibidor do ativador de plasminogênio-I (PAI-I), incluem-se, entre outras, na lista destas moléculas bioativas (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006; Grundy, 2006).

Os mecanismos envolvidos com a atividade secretora dos adipócitos permanecem sob investigação, existindo dúvidas acerca dos processos humoral e/ou neural relacionados (Dusserre *et al.*, 2000). Alterações na massa de tecido adiposo estão associadas com mudanças nas funções metabólicas e endócrinas dos adipócitos. Neste sentido, concentrações circulantes de adipocinas apresentam-se elevadas na obesidade e em estados de resistência insulínica, tanto em humanos quanto nos animais (Rexrode *et al.*, 2003). A produção de leptina, um importante regulador da ingestão alimentar e estoque energético, está mais correlacionada com o aumento do número e volume do adipócito (Zhang *et al.*, 2002). De outro modo, a produção de adiponectina, hormônio que reduz a gliconeogênese hepática e eleva a oxidação lipídica muscular, encontra-se negativamente correlacionada com a adiposidade (Matsuzawa, 2005). Entretanto, a maioria das adipocinas apresenta redução de seu conteúdo plasmático quando há perda de massa corporal (Arner, 2003).

A capacidade metabólica do tecido adiposo também varia em função da sua localização, subcutânea ou visceral, podendo contribuir de forma mais ou menos intensa para a secreção de adipocinas específicas (Dusserre *et al.*, 2000). Neste sentido, tem sido descrito que a localização do adipócito é capaz de conferir características metabólicas sistêmicas distintas. Refere-se que o acúmulo de gordura visceral demonstra, em geral, estimular mais a produção de adipocinas do que outros depósitos de tecido adiposo, descrevendo-se ainda que a adiposidade visceral produz maior impacto sobre a deterioração da sensibilidade à insulina (Chan *et al.*, 2004). O tipo de adipócito que se encontra neste sítio tem intensa atividade lipolítica, liberando grande quantidade de ácidos graxos livres (AGLs) na circulação portal e sistêmica. O fluxo aumentado de AGLs tem sido relacionado à diminuição da sensibilidade insulínica nos tecidos hepático e muscular (Shulman, 2000).

Além de fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos maduros, macrófagos também constituem tipo celular presente no tecido adiposo e participam da sua função endócrina

(Dusserre *et al.*, 2000). Weisberg e colaboradores (2003) mostraram que a acumulação de macrófagos no tecido adiposo é proporcional à adiposidade, especialmente ao tamanho das células adiposas. Esta situação está relacionada com a produção de moléculas pró-inflamatórias pelos adipócitos. Adipócitos de menor tamanho promovem uma homeostase metabólica, enquanto que os maiores, freqüentemente observados em caso de obesidade, recrutam macrófagos, promovem inflamação e a liberação de várias adipocinas que predispõem à resistência a insulina (Weisberg *et al.*, 2003). Assim, o tecido adiposo é reconhecido como potente fonte de mediadores pró-inflamatórios, caracterizando inclusive a obesidade como um estado de inflamação crônica do tecido adiposo. Atribui-se à ação destas substâncias, danos vasculares potenciais, resistência à insulina e aterogênese (You *et al.*, 2004).

O interesse acerca da melhor e maior compreensão dos mecanismos biomoleculares envolvidos na gênese e ação metabólica do tecido adiposo tem se mostrado crescente nas décadas recentes. A literatura ainda oferece informação incompleta a respeito dos mecanismos capazes de explicar a associação entre a obesidade e outras doenças metabólicas e vasculares a ela relacionadas, entre estas: o diabetes, as dislipidemias, a aterosclerose e a hipertensão. Credita-se à elucidação das funções fisiológicas das adipocinas, possibilidade de ampliar a compreensão dos referidos mecanismos, podendo representar avanço importante na prevenção e terapêutica dessas doenças, cuja prevalência tem se mostrado elevar em diferentes países em desenvolvimento (Bray *et al.*, 2004) e, particularmente, no Brasil (Saldiva *et al.*, 2004; Florencio *et al.*, 2004).

2.2.1 Leptina

A leptina é uma proteína constituída por 167 aminoácidos, produto do gene *Ob*, que foi inicialmente clonado e seqüenciado em camundongos e sua expressão ocorre

principalmente no tecido adiposo branco de diversas espécies de vertebrados, incluindo o rato e o homem. Sua secreção pelos adipócitos é proporcional à adiposidade corporal (Clement, 1999).

Inúmeras evidências, especialmente respaldadas nos experimentos envolvendo a utilização de animais, indicam que a leptina age no sistema nervoso central (SNC) inibindo a ingestão alimentar e ativando a termogênese, justificando o seu envolvimento no controle da adiposidade corporal e regulação do balanço energético. Esta adipocina age em receptor hipotalâmico iniciando uma cascata de eventos envolvidos nos mecanismos de modulação da inibição da ingestão de alimentos e estímulo do gasto de energia. Por estas características, é apontada como um fator periférico que leva ao SNC a informação sobre o estoque lipídico orgânico e, mais do que isto, desencadeia as respostas necessárias para a manutenção da estabilidade deste estoque, ocorrendo que sua expressão e função normais são essenciais para evitar obesidade (Schawartz *et al.*, 2000). Sob condições normais, o aumento da massa adiposa determina elevação nos teores circulantes de leptina, que alcança receptores no hipotálamo, promovendo uma redução na ingestão de alimentos (Zhang *et al.*, 1994). Reconhece-se, entretanto, que na grande maioria das obesidades humanas e em modelos experimentais com roedores, as concentrações de leptina estão aumentadas, indicando a existência de uma resistência à adipocina (Maffei *et al.*, 1995).

Em 1997, Montague e colaboradores, ao estudarem duas crianças portadoras de obesidade mórbida que apresentavam concentrações séricas reduzidas de leptina, encontraram uma mutação envolvendo uma deleção no códon 133 do locus *Ob*. A obesidade severa presente nestes dois indivíduos, congenitamente deficientes em leptina, forneceu a primeira evidência genética de que esta adipocina seria um importante regulador do balanço energético na espécie humana (Montague *et al.*, 1997). Tentativas buscando a redução da massa corporal humana, através da administração diária de leptina mostraram-se ineficazes. Sendo assim, a

procura de mutações do gene *Ob* em humanos obesos, portadores de obesidade "comum" (não mórbida) não tem levado a resultados positivos (Maffei *et al.*, 1996). Mais recentemente, Farooqi e colaboradores (2002) mostraram que crianças obesas, portadoras de deficiência congênita de leptina, quando tratadas com esta adipocina, reverteram o quadro de obesidade (Farooqi *et al.*, 2002). Assim, humanos ou animais com mutações que resultam em uma absoluta deficiência na habilidade de produzir leptina ou com defeitos genéticos no seu receptor são marcadamente hiperfágicos e obesos mórbidos (Ahima e Flier, 2000b).

Entre as respostas observadas na deficiência e/ou resistência à leptina cita-se, além da hiperfagia e da redução da termogênese, a resistência à insulina, na presença de hiperinsulinemia (Abe *et al.*, 1989). Neste sentido, em roedores obesos, tanto a deficiência quanto a resistência à leptina, está acompanhada de severa resistência à insulina. Esta condição é rapidamente melhorada pela administração de leptina em ratos deficientes, até mesmo antes da redução da massa corporal. Há indícios de que a leptina exerça ação direta e inibitória sobre a secreção hepática de glicose (Seufert *et al.*, 1999). Outras evidências sugerem que a leptina promove a oxidação de triglicerídeos do tecido adiposo, reduzindo a acumulação de gordura, inibe a lipogênese e estimula a lipólise, beneficiando assim a sensibilidade à insulina (Yildiz e Haznedaroglu, 2006; Ahren e Havel, 1999). A literatura ainda se mostra controversa em relação a este tema, sendo necessários mais estudos a fim de melhor elucidar a função da leptina na sensibilidade insulínica.

Há ainda um crescente acúmulo de evidências no sentido de que um aumento excessivo na expressão de leptina, caracterizado como um mecanismo de resistência a ação dessa adipocina provoca um efeito pró-inflamatório, atuando com um hormônio pró trombótico, favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (La Cava e Matarese, 2004; Cooke e Oka, 2002; Konstantinides *et al.*, 2001; Sierra-Honigmann *et al.*, 1998).

2.2.2 Adiponectina

Em meados de 1990, uma proteína expressa exclusivamente pelo tecido adiposo, demonstrando importantes efeitos sobre o metabolismo, foi identificada e denominada adiponectina. Em contraste à maioria das proteínas secretadas pelos adipócitos, sua expressão diminui na medida em que o tecido adiposo aumenta (Ouchi *et al.*, 1999) e sua concentração no soro encontra-se reduzida em indivíduos e roedores obesos ou resistentes à insulina. Foi sugerido que indivíduos com concentrações circulantes elevadas de adiponectina estão menos sujeitos ao desenvolvimento de diabetes tipo II, quando comparados àqueles com concentrações reduzidas desta adipocina (Spranger *et al.*, 2003).

Efeitos anti-aterogênicos também têm sido atribuídos a esta adipocina. Adiponectina demonstra capacidade de inibir a adesão de monócitos ao endotélio vascular, a transformação de macrófagos em células espumosas (*foam cells*) e a expressão de moléculas de adesão, suprimindo inclusive a expressão do TNF- α induzida por estas moléculas de adesão. Concentração plasmática reduzida de adiponectina também se associa significativamente com risco de doenças cardiovasculares em humanos. Neste sentido, a adiponectina circulante parece proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose. Em indivíduos que apresentaram uma redução nos teores circulantes da adipocina, foram observadas várias disfunções metabólicas associadas. Grande parte destes manifesta diabetes, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Funahashi *et al.*, 2004).

Concentrações séricas diminuídas de adiponectina plasmática também mostraram associação com o aumento do risco de alguns tipos de câncer como o de intestino e de mama (Wei *et al.*, 2005; Mantzoros *et al.*, 2004).

Mais recentemente, Qi e colaboradores (2004) demonstraram que adiponectina também pode atuar no SNC, regulando a homeostase energética e reduzindo a massa corporal (Qi *et al.*, 2004).

Yamamoto e colaboradores (2002), estudando japoneses com adequação de massa corporal, demonstraram que a concentração plasmática de adiponectina correlacionou-se negativamente com diversos parâmetros estudados, dentre eles: o índice de massa corporal (razão entre o peso do indivíduo, expresso em quilogramas e a sua estatura, expressa em metros, elevada ao quadrado), a pressão arterial, a glicemia de jejum, a resistência à ação da insulina e as concentrações plasmáticas de insulina, colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeo e ácido úrico. Correlação positiva somente foi demonstrada para o HDL-colesterol (Yamamoto *et al.*, 2002).

Modelos experimentais com roedores têm sido bastante úteis para o estudo controlado das ações da adiponectina bem como dos mecanismos capazes de induzir a sua expressão. Estudos desta natureza já mostraram que manipulações nutricionais e terapêuticas envolvidas na melhoria da sensibilidade à insulina, tais como a restrição energética, levando à redução da massa corporal e o tratamento com tiazolidinediona (TZD), aumentam a expressão gênica de adiponectina bem como o seu conteúdo circulante. Contrariamente, TNF- α e interleucina-6 (IL-6) mostraram-se constituir potentes inibidores da expressão e secreção de adiponectina (Maeda *et al.*, 2001). A utilização de modelos experimentais com ratos obesos ou diabéticos mostrou ainda que a administração de adiponectina recombinante reduz a glicemia e melhora a resistência à insulina (Berg *et al.*, 2002). Foi sugerido que o efeito da adiponectina na melhoria da sensibilidade à insulina é mediado, pelo menos em parte, por um aumento da oxidação de gordura por ativação da enzima adenina monofosfato quinase, em músculos esqueléticos, semelhante à ação sinalizada pela própria insulina. Além disso, a adiponectina

também ativa essa enzima no fígado, resultando na redução da produção de glicose hepática (Yamauchi *et al.*, 2002).

2.2.3 Resistina

A resistina constitui adipocina recentemente identificada, pertencente a uma família de proteínas rica em cisteína, encontrada em processos de inflamação. A resistina é expressa principalmente pelo tecido adiposo visceral em roedores (Steppan e Lazar, 2004) e alguns autores sugerem que sua secreção está fortemente relacionada à resistência à insulina. De fato tem sido verificado o aumento nas concentrações de resistina em animais obesos e diabéticos (Steppan *et al.*, 2001). Há ainda evidências de que a obesidade induzida por dietas hiperlipídicas bem como mutações do gene da leptina estão associadas com elevadas concentrações circulantes de resistina (Savage e Sewter, 2001).

Resistina administrada intraperitonealmente eleva a glicemia plasmática e induz a uma significativa resistência insulínica hepática (Rajala *et al.*, 2003). A utilização de protocolo experimental envolvendo a administração de resistina recombinante em ratos mostrou aumento da resistência à insulina sistêmica e diminuição do transporte de glicose estimulado pela insulina. De outro modo, a administração do anticorpo anti resistina produziu efeito contrário (Steppan *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram obtidos em ratos obesos, quando a administração de anticorpos anti resistina, promoveu redução da glicemia e melhorou a sensibilidade à insulina (Janke *et al.*, 2002).

A literatura científica reúne um grande número de evidências que sugere a existência de associação positiva entre resistina, obesidade e diabetes. Entretanto, ainda não há consenso à este respeito. Ukkola (2002) e Steppan e Lazar (2004), em seus trabalhos de revisão, citam alguns resultados em que a resistência insulínica e o acúmulo de massa adiposa podem não estar associados ao aumento da expressão de resistina em humanos. De qualquer modo, o

envolvimento da resistina no processo inflamatório crônico associado à obesidade constitui hipótese alternativa capaz de justificar a presença desta proteína no tecido adiposo de indivíduos obesos (Gomez-Ambrosi e Fruhbeck, 2001).

2.2.4 Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

O tecido adiposo produz várias citocinas pró-inflamatórias incluindo-se entre estas, o fator de necrose tumoral- α que constitui um produto dos macrófagos relacionado a distúrbios metabólicos e processos crônicos de inflamação (Coppack, 2001). As primeiras informações acerca das ações biológicas associadas ao TNF- α definiam um envolvimento na resistência à insulina, redução da massa corporal e anorexia. O aumento da lipólise decorreria do estímulo proporcionado pelo TNF- α na expressão da enzima lipase hormônio sensível (HSL), além de levar à diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (LPL) (Fried e Zechner, 1989; Patton *et al.*, 1986).

Entretanto, investigações mais recentes têm revelado que a expressão de TNF- α está aumentada na obesidade e diminui com a redução da massa corporal, melhorando a sensibilidade à insulina (Hotamisligil, 2000; Fruhbeck *et al.*, 2001). Há ainda referências de que triglicerídeos e ácidos graxos livres exerçam forte influência na indução da expressão de TNF- α (Nguyen *et al.*, 2005).

Roedores tratados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo da expressão de TNF- α e alteração da via de sinalização insulínica *in vivo* (Morin *et al.*, 1997). Anticorpos anti TNF- α melhoram a sensibilidade à insulina em roedores obesos, enquanto que animais deficientes de TNF- α , mesmo quando submetidos à dieta hiperlipídica, apresentam-se “protegidos” em relação ao desenvolvimento de obesidade com resistência à insulina (Guerre-Milo, 2004). Há ainda indícios de que o aumento da expressão gênica de TNF- α no tecido adiposo bem como a sua elevada concentração plasmática poderiam induzir a obesidade, em

parte, por alterar a liberação na circulação de outras adipocinas, como a adiponectina (Ruan *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2001).

2.3 – Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma γ (PPAR γ)

O receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*peroxisome proliferator activator receptor* - PPAR) é uma subclasse da família de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes. Três isoformas de PPAR foram identificadas PPAR α , β (ou δ) e γ , as quais são codificadas por genes específicos, com padrão distinto de expressão em anfíbios, roedores e humanos (Kota *et al.*, 2005). Dessa forma, os membros da família dos PPARs desempenham importantes funções no metabolismo, embora com atuações específicas para diferentes tipos celulares.

O receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (*peroxisome proliferator activator receptor gamma* - PPAR γ) é fundamental para a manutenção da homeostase energética e adipogênese (Gurnell, 2005). Atribui-se ao PPAR γ ação sobre a regulação da diferenciação adiposa bem como sobre a modulação da expressão de genes associados à síntese e armazenamento de lipídeos em adipócitos (Walczak e Tontonoz, 2002).

O PPAR γ pode ser encontrado sob três isoformas (PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3), cuja distribuição e atividades vêm sendo intensamente investigadas. PPAR γ 2 é expresso exclusivamente em adipócitos, enquanto que PPAR γ 1, também expresso no tecido adiposo, é encontrado em músculos, macrófagos, entre outros tecidos. O subtipo PPAR γ 3, descrito mais recentemente, foi identificado no cólon, tecido adiposo e células monocitárias (Khan e Heuvel, 2003).

A função do PPAR γ como fator de transcrição é ligante dependente. Assim, PPAR γ , quando ativado por ligantes, modula a expressão de genes através da sua ligação ao elemento

responsivo ao PPAR (PPRE – *peroxisome proliferator response element*) que está localizado na região regulatória dos genes que estão sob controle transcripcional. Para ligar-se ao PPRE com grande afinidade, promovendo uma ativação efetiva da transcrição, o PPAR requer um fator protéico adicional, denominado receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Assim PPARs se heterodimerizam com os RXR, formando um complexo capaz de, então, ligar-se ao PPRE (Kota *et al.*, 2005).

O PPAR γ pode ser ativado por inúmeros ligantes. Esses, por sua vez, podem ser naturais (endógenos), como são os ácidos graxos e derivados ou sintéticos, como as drogas antiinflamatórias, hipolipidêmicas e antidiabéticas (Schoonjans *et al.*, 1997) (figura 1). A ativação por ácidos graxos foi primeiramente descrita por Gottlicher e colaboradores (1992). Esta descoberta foi o primeiro indício de que os ácidos graxos podem ser moléculas sinalizadoras que controlam a atividade de receptores nucleares e, conseqüentemente, a expressão de genes. Alguns estudos sugerem que a expressão de PPAR encontra-se sob controle hormonal, de ácidos graxos e de citocinas (Kota *et al.*, 2005). Estudos acerca da regulação da expressão de genes que codificam o PPAR γ bem como da modulação de sua atividade estimuladora do processo de transcrição vem sendo intensamente investigados na atualidade.

Assim, há descrição acerca da ação molecular do PPAR γ ativado. Neste sentido, refere-se que a sua ativação contribui para a diferenciação de adipócitos que culmina com a maturação de pré adipócitos em adipócitos maduros e favorece a acumulação de triglicerídeos. Considerada esta ação do PPAR γ , a literatura tem mostrado que o aumento da massa corporal, resultante do processo iniciado pela ativação do PPAR γ , está associado a um aumento do tecido adiposo subcutâneo concomitante à redução do conteúdo de gordura visceral (Miyazaki *et al.*, 2002). Esta redistribuição da massa adiposa tem sido atribuída a um mecanismo denominado “remodelação do tecido adiposo branco”, que consiste na

diferenciação de pré-adipócitos em pequenas células de gordura bem como na apoptose de adipócitos hipertróficos diferenciados, tanto nos depósitos de gordura visceral quanto naqueles subcutâneos (figura 1) (Auwerx, 1999). Os novos adipócitos formados possuem todas as enzimas para a lipogênese e apresentam melhor sensibilidade à insulina em relação ao transporte de glicose e inibição da lipólise. Cita-se também a ocorrência de aumento da sensibilidade insulínica no tecido hepático e muscular (Miyazaki *et al.*, 2002). Sugere-se que este efeito secundário atribui-se ao menor conteúdo plasmático de ácidos graxos livres, provenientes de adipócitos de menor tamanho (Auwerx, 1999).

Adicionalmente, já foi descrito para o PPAR γ participação na fisiopatologia de diferentes DCNTs, dentre elas, a obesidade, diabetes, aterosclerose e câncer, principalmente por sua importante participação no controle do metabolismo energético e regulação do processo inflamatório (Walczak e Tontonoz, 2002).

O diabetes do tipo II e doenças cardiovasculares parecem estar relacionadas com a alteração da produção de algumas adipocinas, tais como leptina, resistina, adiponectina e TNF- α (Trayhurn e Beattie, 2001). O PPAR γ parece atuar também como modulador da expressão dessas adipocinas (Evans *et al.*, 2004).

O reconhecimento da participação do PPAR γ no controle do processo inflamatório é recente. A ativação do PPAR γ parece ter efeitos antiinflamatórios. Sugere-se que este efeito seja devido ao fato de que a atividade estimuladora do processo de transcrição do PPAR γ antagoniza a de outros fatores de transcrição, como, por exemplo, a do fator nuclear κ beta (NF κ B), responsável pelo controle da expressão de genes pró inflamatórios (Daynes e Jones, 2002).

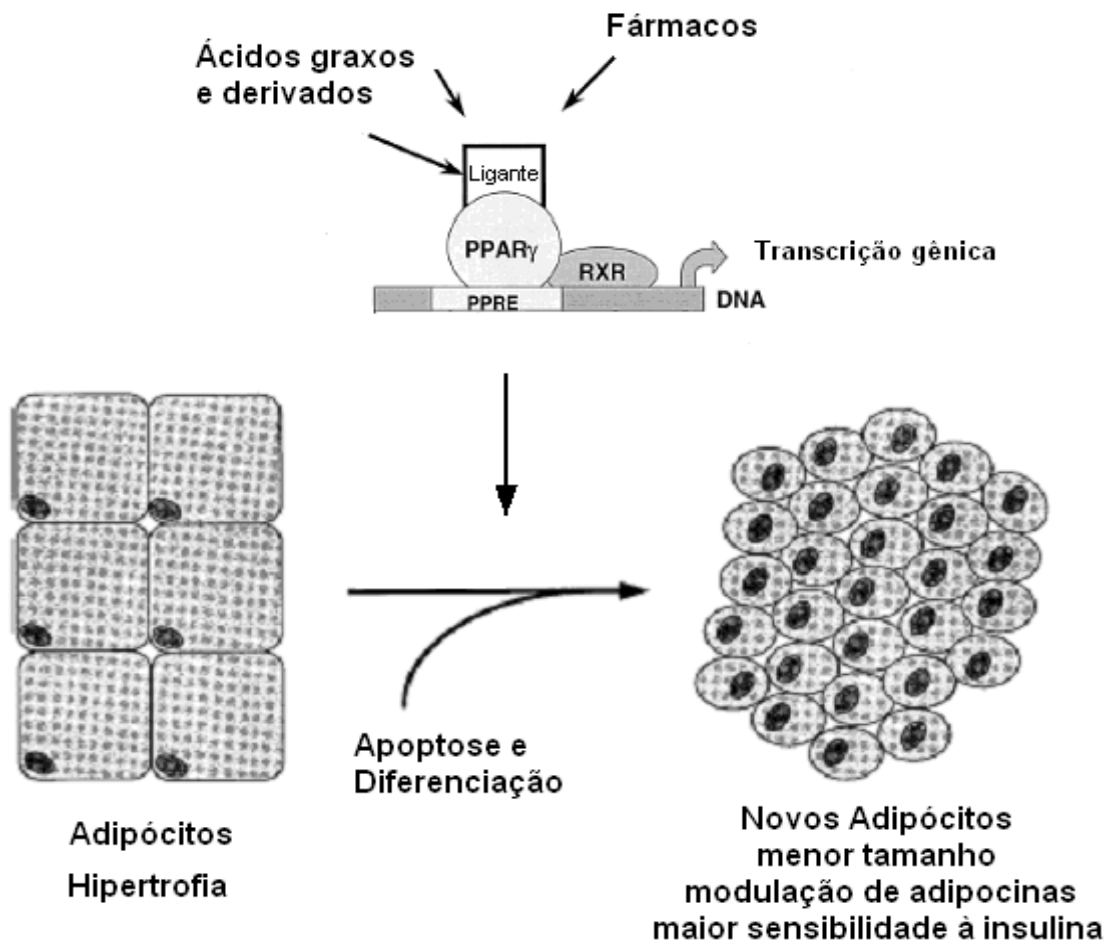


Figura 1. Ativação de PPAR γ e seus efeitos na remodelação do tecido adiposo (Adaptado de Auwerx, 1999).

2.4 – Ácidos Graxos e Expressão de Genes pelo Tecido Adiposo Branco

Ácidos graxos constituem macronutrientes cuja ingestão dietética provê o organismo de energia e de elementos utilizados para a síntese de lipídeos complexos. Diferentes funções orgânicas lhes são atribuídas, destacando-se dentre estas, o seu efeito sobre a expressão gênica, cuja elucidação vem sendo tema de pesquisas mais recentes. Significativas alterações

metabólicas e nos processos de diferenciação e crescimento celular podem resultar desta ação dos AG (Clarke, 2004).

Os efeitos dos AGs sobre a expressão gênica podem ser mediados por receptores, que reconhecem e se ligam a moléculas específicas. Quando uma molécula sinalizadora extracelular é lipofílica, como são os AGs, ela pode atravessar a membrana, por difusão simples ou facilitada e se ligar a receptores intracelulares. Ao contrário dos receptores de membrana, que ativam cascatas de segundos mensageiros, os receptores intracelulares (citoplasmáticos ou nucleares) são fatores de transcrição que exercem sua função reguladora diretamente no promotor (região reguladora) de genes-alvo (Madsen *et al.*, 2005).

Ácidos graxos podem influenciar a expressão de adipocinas, diretamente, por sua interação com fatores de transcrição, como PPAR γ ou, indiretamente, por mecanismos ainda desconhecidos, possivelmente relacionados à oxidação, síntese ou estoque de AG (Drevon, 2005). Neste sentido, o fato de que AGs constituem componentes fundamentais do tecido adiposo branco, permite supor que o seu conteúdo bem como as suas diferentes estruturas moleculares (qualidade), podem influenciar de forma distinta a expressão de adipocinas. Esta hipótese é compatível com o que a literatura disponibiliza acerca do fato de que as propriedades físico-químicas das membranas são grandemente determinadas pela natureza dos AGs incorporados à sua bicamada lipídica, as quais, por sua vez, podem atuar como segundo mensageiros na membrana e no núcleo, influenciando funções celulares, incluindo a responsividade hormonal (Vessby, 2000).

Adicionalmente, tem sido referido que a ingestão de diferentes AGs pode modular o sistema imune e o metabolismo. São propostos distintos mecanismos para a ação moduladora dos AGs, dentre eles: promoção de alteração na fluidez da membrana, formação de peróxidos lipídicos, produção de eicosanóides, ativação ou inibição de enzimas, por interação entre

moléculas e, regulação na expressão gênica de proteínas relacionadas ou não com o seu próprio metabolismo (Calder, 2002; Pablo e Cienfuegos, 2000; Jump e Clarke, 1999).

A compreensão dos efeitos biológicos dos diferentes AGs, especialmente sobre a expressão gênica do tecido adiposo, representa tema de abordagem complexa. À este respeito, a literatura permanece controversa.

2.4.1 Ácidos graxos poliinsaturados da série n-6 e n-3

Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser classificados, de acordo com a localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metil terminal, nas séries n-6 e n-3 (Siddiqui *et al.*, 2004). Estes AGs constituem as duas famílias de compostos derivados dos ácidos graxos essenciais (AGEs), ácido linoléico (C18:2 n6) e ácido α -linolênico (C18:3 n3), cuja essencialidade justifica-se pelo fato de que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, a partir de outras moléculas de AG (Waitzberg, 1998; Jiménez *et al.*, 1997). Dessaturases específicas, não disponíveis nas células humanas, são necessárias para a incorporação de duplas ligações na cadeia de carbono do AG, além do carbono 9 (Das, 2003; Mahan e Scott-Stump, 1998; Jiménez *et al.*, 1997; Stryer, 1996).

Obtidos, portanto, exclusivamente através da ingestão de alimentos, os AGEs, linoléico (C18:2 n6) e α -linolênico (C18:3 n3) podem ser dessaturados e alongados na maioria dos tecidos orgânicos, formando AGs mais insaturados e de cadeia mais longa, que são conhecidos como ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (Uauy e Castillo, 2003) (Figura 2). Os sistemas enzimáticos responsáveis pela alongação e dessaturação localizam-se no retículo endoplasmático das células animais (Lochsen *et al.*, 1997). As reações de alongamento são catalisadas por enzimas situadas na fase citossólica da membrana do retículo endoplasmático. As reações de dessaturação (oxidação com formação de duplas ligações) são catalisadas pelas enzimas $\Delta 6$ (delta-6), $\Delta 5$ (delta-5) e $\Delta 4$ (delta-4) dessaturases (Honstra, 1982).

O ácido linoléico forma o ácido γ -linolênico (C18:3 n6), que é convertido em ácido γ -di-homolinolênico (20:3 n6), o qual dá origem ao ácido araquidônico (AA, 20:4 n6) (figura 2). O ácido araquidônico (AA; 20:4 n6), representa o AGPICL de maior importância metabólica derivado do ácido linoléico. Já os ácidos eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n3) e docosahexanóico (DHA; 22:6 n3) constituem os AGPICL derivados do ácido linolênico de importância fisiológica expressiva (Honstra, 2000; Waitzberg, 2000).

Os AGEs, linoléico e α -linolênico e seus metabólitos possuem ações biológicas específicas. Os ácidos γ -di-homolinolênico, AA e EPA são precursores das séries um, dois e três, respectivamente, dos eicosanóides (Das, 2003). Entre estes compostos, incluem-se as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (Pompéia, 2002; Jiménez *et al.*, 1997). Estes mediadores bioquímicos são determinantes das propriedades biológicas das membranas lipoprotéicas e responsáveis por diversos estímulos celulares envolvidos na inflamação, infecção, doença tecidual, modulação do sistema imune, controle de transporte de íons através das membranas, modulação da transmissão sináptica, dentre outros (Das, 2003; Stryer, 1996; Waitzberg, 2000).

Deste modo, a natureza do AG precursor (posição da primeira ligação dupla), constitui um fator de variação capaz de produzir eicosanóides (metabólitos análogos) com propriedades biológicas distintas. A síntese destes diferentes eicosanóides mostra-se capaz de ser orientada em função da disponibilidade de seus AGPI precursores. Os AGs da série n-6 podem levar ao aumento das concentrações de mediadores pró-inflamatórios. Já os AGs da série n-3 são precursores de mediadores com características antiinflamatórias e biologicamente menos potentes (Konig *et al.*, 1997). Investigações conduzidas com indivíduos e animais de experimentação têm mostrado que os AGPIs da série n3 suprimem a resposta imune mediada por células e que um desequilíbrio na razão n6/n3 pode levar a alteração na produção de citocinas e eicosanóides pró-inflamatórios. Estas e outras evidências de natureza semelhante,

concorrem para o reconhecimento de que o aumento no consumo de AGPIs da série n-6 frente ao da série n-3, característica marcante da dieta ocidental, pode estar contribuindo para o aumento da incidência de doenças cardiovasculares e de processos inflamatórios crônicos, observado nos últimos anos, nos países do Ocidente (Calder, 2002).

Consideradas então as fontes alimentares de AGPI, a literatura refere que os AGPIs da série n-6 são encontrados em muitos óleos vegetais comumente consumidos pela população, tais como o óleo de milho, o de soja e o de girassol. Refere-se também que os AGPIs da série n-3, como o ácido α -linolênico, encontram-se em menor percentual nos óleos vegetais, sendo fontes destes, AGs de nozes e de linhaça. Os outros representantes da família de AGPICL n-3, EPA e DHA, são encontrados essencialmente em peixes e animais marinhos (Zamaria, 2004).

Conceito adicional necessário para a compreensão dos eventos que relacionam a ingestão de diferentes AG e a modulação de processos inflamatórios, dentre outros, diz respeito ao reconhecimento de que o excesso ou deficiência de uma família específica de AGE pode interferir com o metabolismo do AGE da outra família. Existe uma competição entre os membros das diferentes famílias por uma ou mais enzimas. O ponto crítico ocorre na etapa de dessaturação, particularmente na ação da delta-6-dessaturase, que controla uma etapa limitante e parece ser dose-dependente (Waitzberg, 2000).

Há outras evidências sugestivas de que os AGPICL da série n-3 (EPA e DHA) agem, diretamente, como substitutos do AA inibindo o metabolismo dos AGs da série n-6 e, ainda, indiretamente, alterando a expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios, através da inibição de fatores de transcrição como o NFkB, funcionando assim como potentes agentes antiinflamatórios (Zhao *et al.*, 2004).

Diferentes mecanismos também têm sido propostos envolvendo AGPICL e processos relacionados à resistência insulínica e doenças cardiovasculares. Neste sentido, Wilson e colaboradores (2001) demonstraram que os AGPICL n-3, principalmente o EPA, funcionam

como ligantes de PPAR γ 2 no tecido adiposo branco, resultando em uma coordenada ativação de vários genes envolvidos na lipogênese, transporte de AG e oxidação lipídica (Wilson *et al.*, 2001). Através deste mecanismo, esses AGs, estariam implicados no processo de remodelação do tecido adiposo, que envolve principalmente a redução do tecido adiposo visceral e a formação de adipócitos menores e mais sensíveis à insulina, conforme já descrito anteriormente (Peyron-Caso *et al.*, 2003). Além disso, EPA e DHA atuam como hipolipemiantes e regulam a expressão do transportador de glicose 4 (Glut4), facilitando o transporte de glicose, exercendo efeitos protetores no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência insulínica e obesidade (Lombardo e Chicco, 2006).

Informações acerca dos efeitos dos AGPICL sobre a expressão de adipocinas são recentes e escassas. Há referência de que os AGPICL da série n-3 inibem a produção de TNF- α e suprimem a expressão de leptina, provocando um efeito inibitório na expressão de resistina. Estes efeitos poderiam justificar os benefícios atribuídos à ingestão destes AGs na sensibilidade insulínica e na proteção de doenças cardiovasculares (Drevon, 2005; Das, 2002). Recentemente, foi descrito que animais que receberam dieta rica em AGPICL n-3 comparados aos que receberam dieta rica em AGPICL n-6, apresentaram aumento na concentração plasmática e na expressão gênica de adiponectina, além de uma redução nos teores sanguíneos de triglicerídeos, AGL e insulina, sugerindo melhor sensibilidade insulínica (Flachs *et al.*, 2006).

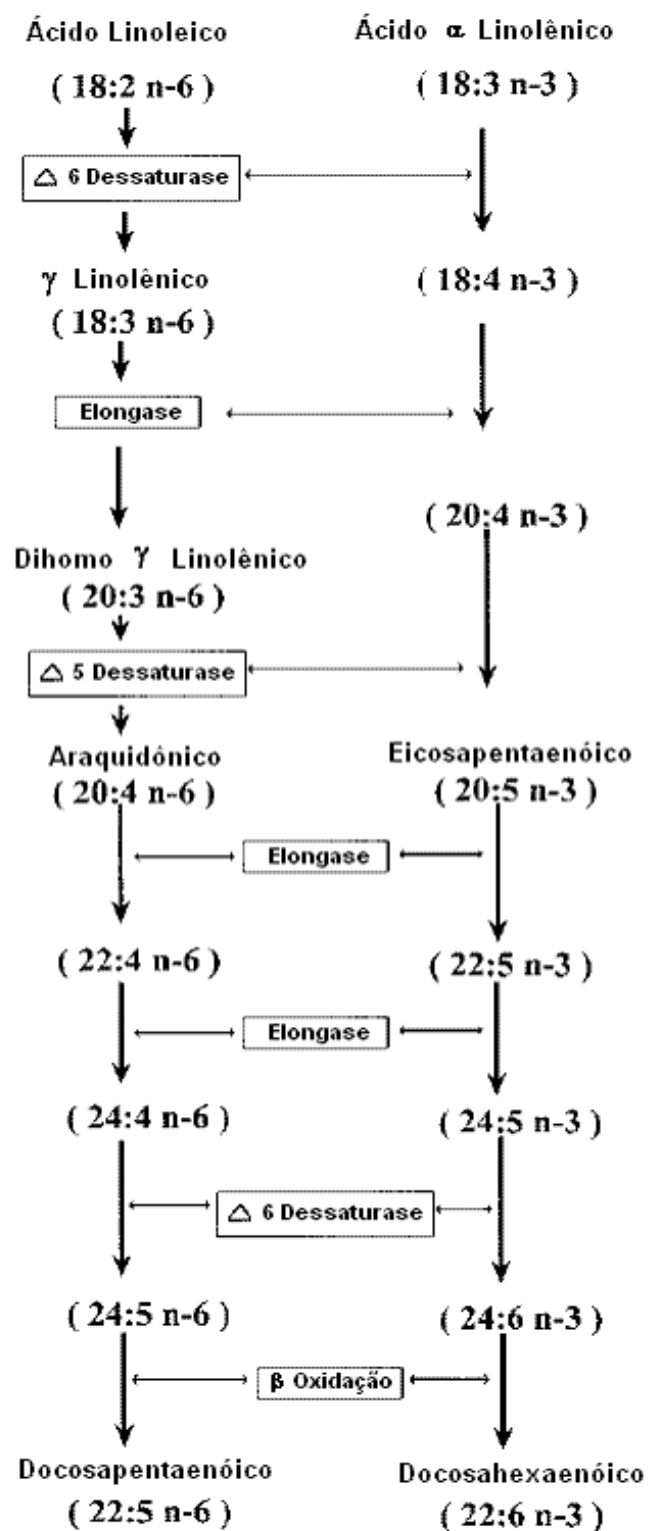


Figura 2. Vias de metabolização dos ácidos graxos poliinsaturados da série n-6 e n-3

(Uauy e Castillo, 2003).

2.4.2 Ácido graxo *trans*

Um dos procedimentos tecnológicos mais utilizados no processamento dos óleos e azeites é a hidrogenação catalítica, que permite obter formas sólidas e semi-sólidas dos óleos vegetais, facilitando o seu manejo e, principalmente, a sua estabilidade. O produto resultante é menos suscetível à oxidação e, em alimentos, substitui melhor a gordura animal que tende a ser mais sólida à temperatura ambiente (Lichtenstein, 1995).

A hidrogenação dos óleos é um processo amplamente utilizado para obtenção de margarinas e gorduras para consumo doméstico e industrial (Pedersen, 1994). Durante este processo, os ácidos graxos insaturados, presentes nos triglicerídeos que compõem os óleos, são hidrogenados em diferentes graus, dependendo da intensidade do processo (Smidovnick *et al.*, 1993). Quando a hidrogenação é somente parcial, são obtidos produtos de menor ponto de fusão, semi-sólidos, com algum grau de insaturação. Entretanto, também contêm um percentual de AG com isomeria posicional e geométrica diferente do produto original (Young, 1986).

Os AGs na natureza apresentam, em sua maioria, somente a isomeria tipo *cis*. Durante a hidrogenação, as duplas ligações dos AG que formam os triglicerídeos, mudam sua posição espacial adquirindo uma isomeria geométrica *trans*, na qual os dois átomos de hidrogênio da dupla ligação encontram-se em lados opostos da molécula de AG (figura 3) (Ledoux *et al.*, 2000). Este processo faz com que o AG adquira maior estabilidade estrutural.

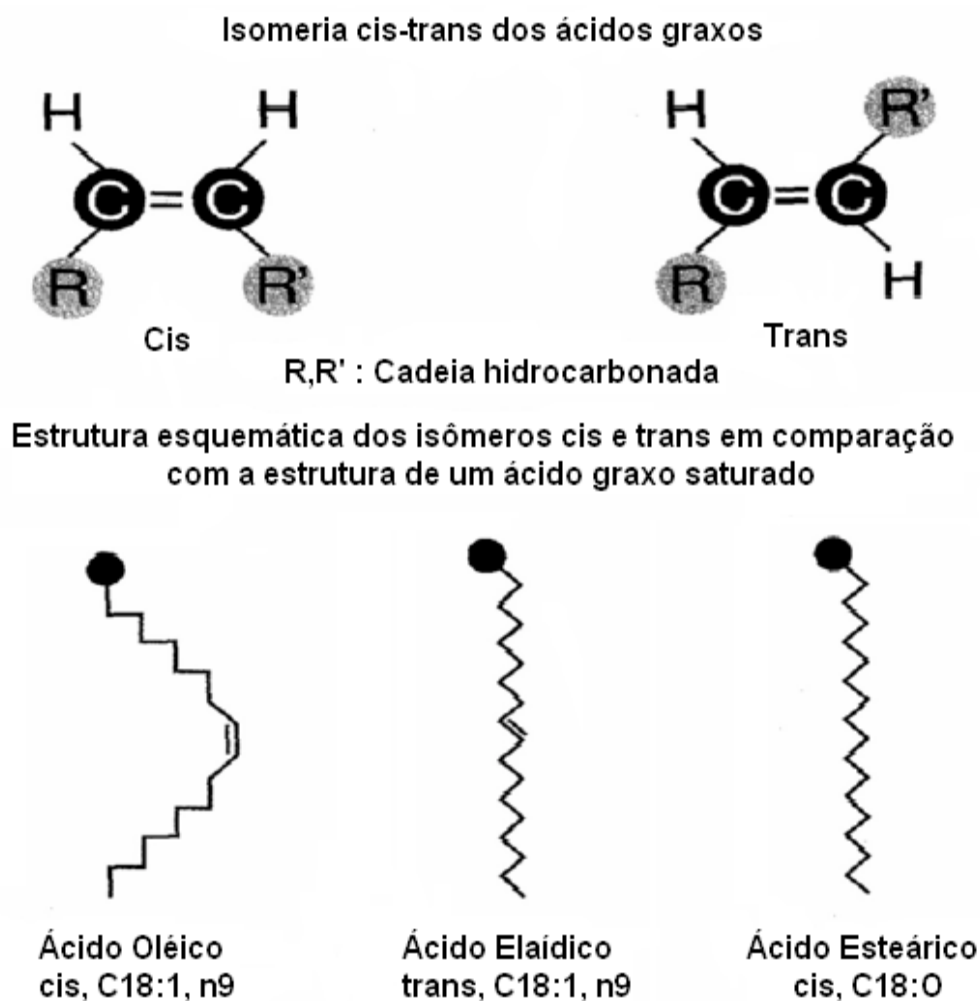


Figura 3. Isomeria *cis-trans* de ácidos graxos (Ledoux *et al.*, 2000).

Apesar dos AGs com isomeria *cis* serem os mais comuns na natureza, em nossa alimentação habitual consumimos certa quantidade de AG *trans* proveniente dos produtos lácteos e seus derivados (Wonsil *et al.*, 1994) bem como das carnes dos animais ruminantes (Beare-Rogers, 1988). Entretanto, nas últimas décadas, em vários países, a maior fonte de AG *trans* na alimentação humana estão sendo as gorduras vegetais hidrogenadas (San Juan *et al.*, 1996). AGs *trans* também são encontrados em gorduras para frituras, doces e produtos alimentícios industrializados, sendo os produtos do tipo *fast food* uma das principais fontes de ingestão (Lichtenstein, 1995). Nesse sentido, alguns estudos têm procurado relatar à estimativa do consumo diário destes AGs. Recentemente, Bertolino e colaboradores (2006)

demonstraram que o consumo de ácidos graxos *trans* estimado em uma comunidade brasileira, foi muito acima (3-5%) do recomendado pela OMS a qual preconiza que o consumo desse tipo de gordura deve ser menor que 1% das calorias totais da dieta (Bertolino et al., 2006; WHO, 2003).

A literatura disponibiliza, na atualidade, um grande número de dados tratando das conseqüências metabólicas e funcionais relacionadas ao consumo de gordura hidrogenada, fonte de AG *trans*, por indivíduos e animais de laboratório. Neste sentido, há referência de que a elevada ingestão destes AGs produz efeitos sobre o metabolismo de lipoproteínas, a função endotelial e a produção de mediadores pró-inflamatórios, envolvendo-se, por isso, com o risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (De Roos *et al.*, 2001). Informações adicionais ampliam estes achados, mostrando que o consumo aumentado de AG *trans* está associado com o aumento nas concentrações sistêmicas de TNF- α , IL-6 e proteína C reativa, considerados marcadores sistêmicos inflamatórios, sugerindo ação pró-inflamatória para estes AGs (Lopez-Garcia *et al.*, 2005; Mozaffarian *et al.*, 2004b). Foi sugerido ainda que o efeito pró-inflamatório atribuído aos AGs *trans* pode ser parcialmente mediado pelo tecido adiposo (Mozaffarian *et al.*, 2006).

Outros achados, tanto em humanos quanto em animais, têm relacionado o consumo de gordura hidrogenada, com uma diminuição na sensibilidade a insulina (Risérus, 2006). Ibrahim e colaboradores (2005) demonstraram que após a ingestão de uma dieta, contendo 3% de ácidos graxos *trans* foi encontrado uma menor fluidez de membrana em adipócitos, reduzindo o transporte de glicose estimulado por insulina, bem como um aumento nas concentrações de insulina e triglicerídeos (Ibrahim *et al.*, 2005).

Em trabalho recente, desenvolvido em nosso laboratório, mostramos que modificações na composição de AG da dieta materna, durante o período perinatal, produzida através da ingestão de dietas enriquecidas com gordura hidrogenada, promoveram alterações

metabólicas no tecido adiposo branco da prole, na idade jovem, conduzindo ao maior acúmulo de gordura nesse tecido bem como elevada adipogênese (Silva *et al.*, 2006).

Protocolos experimentais envolvendo animais também já mostraram que a ingestão de AG *trans* altera a expressão gênica do PPAR γ e resistina (Saravanan *et al.*, 2005), além de influenciar o metabolismo dos AGs nos adipócitos (Matthan *et al.*, 2001). Entretanto, os passos moleculares que relacionam a ação de AG *trans* sobre a expressão do gene PPAR não estão claramente estabelecidos.

O conjunto de informações aqui reunido revela a existência de uma complexa rede de múltiplas interações moleculares envolvendo, especialmente, o tecido adiposo e seus constituintes primordiais (AG) bem como os seus produtos bioativos (adipocinas), cujos efeitos se manifestam sobre diferentes sistemas orgânicos. A investigação dos diferentes mecanismos biomoleculares capazes de elucidar os inúmeros hiatos ainda existentes acerca destas interações permanece sendo justificável. Neste sentido, o presente estudo pretende investigar os efeitos dos AG *trans*, enquanto marcadores pró-inflamatórios bem como o de AGPI da série n-3 e n-6, sobre a expressão do receptor nuclear PPAR γ e de adipocinas pelo tecido adiposo branco de ratos adultos tratados, desde a sua concepção, com dietas ricas nestes ácidos graxos. Alguns parâmetros bioquímicos sistêmicos também serão analisados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar o efeito da ingestão dos ácidos graxos dietéticos poliinsaturado de cadeia longa da série n-3 (óleo de peixe), da série n-6 (óleo de soja) e ácidos graxos *trans* (gordura vegetal parcialmente hidrogenada), oferecidos desde a vida intra-uterina, sobre parâmetros metabólicos plasmáticos, bem como sobre a expressão de adipocinas e do receptor nuclear PPAR γ no tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos adultos.

3.2 Específicos

Em ratos machos adultos, que consumiram dietas normolipídicas e isocalóricas, contendo ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 ou da série n-6 ou ácidos graxos *trans*, avaliar:

- a evolução da massa corporal;
- o consumo alimentar;
- o percentual relativo de ácidos graxos no plasma e no tecido adiposo branco retroperitoneal;
- a concentração plasmática de glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados, glicerol, triglicerídeo, colesterol total, HDL-colesterol;
- a expressão de mRNA de resistina, TNF α , adiponectina, leptina, PPAR γ 2 no tecido adiposo branco retroperitoneal.

4.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados ratos virgens fêmeas e machos da linhagem *Wistar* provenientes do biotério do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), mantidos sob condições controladas de luz (ciclo claro/ escuro de 12 por 12 horas) e de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) bem como com livre acesso à ração e água. Aos três meses de idade os animais foram submetidos ao acasalamento, com duração média de 10 dias, na proporção de três fêmeas para um macho. O primeiro dia de gestação foi determinado através de exame de lâmina para verificação da presença de espermatozóides na luz vaginal. Para tanto, uma pequena quantidade de solução salina 0,9% foi introduzida na vagina e em seguida aspirada. Constatada a provável concepção (dia 1 da gestação), as fêmeas foram aleatoriamente separadas em três grupos experimentais, consumindo dieta manipulada, isocalórica e normolipídica com diferente base lipídica, oferecida durante toda a gestação e a lactação e mantidas em gaiolas individuais, designados por:

Grupo Óleo de Soja (GS) – formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína, contendo 7% de óleo vegetal a base de soja (rico em AGPI n-6).

Grupo Óleo de Peixe (GP) - formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína, contendo 6% de óleo de peixe (rico em AGPICL n-3) e 1% de óleo vegetal a base de milho.

Grupo Gordura Vegetal Parcialmente Hidrogenada (GVPH) – formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína, contendo 6% de gordura parcialmente hidrogenada (fonte de ácidos graxos *trans*) e 1% de óleo vegetal a base de soja.

No dia do nascimento, considerado dia zero da lactação, a ninhada foi ajustada para seis filhotes machos por cada mãe, a fim de estabelecer condição ideal para o melhor desempenho lactotrófico. No 21º dia de vida, os animais de cada grupo foram separados da mãe, agrupados em gaiolas coletivas e passaram a receber dieta manipulada contendo a mesma fonte lipídica da dieta materna até a data dos experimentos, realizados aos 120 dias de vida.

4.2 Grupos Experimentais

Todas as análises foram realizadas nos filhotes machos dos animais pertencentes aos grupos GS, GP e GVPH.

4.3 Formulação das rações

A preparação das rações foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional do INJC da UFRJ. A formulação, incluindo os percentuais de lipídios, que variaram de acordo com a proposta de composição dietética para cada grupo experimental, está descrita na tabela 1. Todos os ingredientes das rações foram homogeneizados em batedeira industrial e adicionados de água em quantidade suficiente para a aquisição de uma textura adequada para a formação de *pellets*. Estes foram então, mantidos em estufa com circulação de ar, à temperatura de 65°C por 24 horas. As rações prontas foram acondicionadas em recipientes plásticos sob refrigeração e oferecidas em porções diárias aos animais.

Todas as dietas foram confeccionadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves, 1993), com modificações. O óleo de soja, adicionado à dieta do grupo GVPH, permitiu adequar às necessidades dos ácidos graxos essenciais linoléico e α -linolênico às recomendações da AIN-93, enquanto que a adição de óleo de milho à dieta do grupo GP permitiu adequar às necessidades do ácido graxo essencial linoléico.

Tabela 1 – Composição das rações oferecidas aos grupos experimentais (g/100g) (AIN-93, com modificações).

Ingredientes (g ou ml/100g)	GS	GP	GVPH
Caseína	15,00 (21,00)	15,00 (21,00)	15,00 (21,00)
Amido	68,07 (59,95)	68,07 (59,95)	68,07 (59,95)
Óleo de Soja	7,00 (9,00)	-	1,00
Gordura Hidrogenada	-	-	6,00 (8,00)
Óleo de Peixe	-	6,00 (8,00)	-
Óleo de Milho	-	1,00	-
BHT	0,0014	0,0014	0,0014
Mistura Vitaminas ^a	1,00	1,00	1,00
Mistura Minerais ^b	3,50	3,50	3,50
Celulose	5,00	5,00	5,00
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,18 (0,30)	0,18 (0,30)	0,18 (0,30)

() Período de gestação e lactação

^a Mistura de Vitaminas (g/Kg dieta) incluem: Tiamina HCl, 0,60; Riboflavina 0,60; Piridoxina HCl 0,70; Niacina 3,0; Pantotenato de Cálcio 1,60; Ácido Fólico 0,20; Biotina 0,02; Vitamina B₁₂ 2,50; Vitamin A-palmitato (500,0 UI/g) 0,80; Vitamina E-Acetato (500 IU/g) 2,5; Vitamina D3 (400,000 IU/g) 0,25; Vitamina K1 0,75. (AIN-93M vitamin mix DYETS #310025, Dyets Inc., Bethlehem,PA,USA).

^b Mistura de Minerais (g/Kg dieta) incluem: Carbonato de Cálcio 357,0; Fosfato de potássio monobásico 250,0; Citrato de potássio H₂O 28,0; Cloreto de sódio 74,0; Sulfato de potássio 46,6; Óxido de magnésio 24,0; Sulfato ferroso 7H₂O 5,21; Carbonato de zinco 1,65; carbonato de manganês 0,63; Carbonato cúprico 0,3; Iodato de potássio 0,01; Selenato de sódio 0,01025; Amônio paramolibdato 4H₂O-0,007; Sódio metasilicado 9H₂O-1,45; Sulfato de cromo potássio 12H₂O- 0,27; Cloreto de lítio 0,01; Ácido bórico 0,08; Carbonato de níquel. 0,03; Vanádio amônio 0,007 (AIN-93M-mineral mix DYETS #210052, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA).

4.4 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal

O consumo de ração e a massa corporal das ratas lactantes foram registrados em dias alternados até o final do período da lactação, considerado como último o 21º dia. A massa corporal dos filhotes foi aferida individualmente a cada sete dias, desde o início da lactação até o 120º dia de vida. Após o desmame, o controle do consumo de ração dos filhotes foi realizado a cada dois dias, mantendo-se assim até o 120º dia de vida.

Todas as medidas foram realizadas no período da tarde (entre 13:00 e 15:00 horas), em balança eletrônica aferida e com capacidade para 1100 g.

4.5 Coleta de sangue e TABR

No 120º dia de vida, os animais foram pesados no próprio biotério. O sacrifício ocorreu sempre no período da manhã, mediante decapitação em guilhotina. Para a realização dos ensaios bioquímicos, o sangue foi colhido em seringas contendo EDTA 0,2M (1:5, v/v) e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi separado e aliquotado, permanecendo estocado a -22 °C até a realização das dosagens.

Imediatamente após a decapitação, o tecido adiposo branco retroperitoneal foi retirado, pesado, resfriado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C, até a realização das análises.

4.6 Perfil bioquímico sanguíneo

4.6.1 Concentração de Triglicerídeos

Os triglicerídeos foram quantificados por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial da marca Biolabo (França). Esse método baseia-se na hidrólise dos triglicerídeos pela ação da lipase lipoproteica e fosforilação do glicerol liberado pela glicerol quinase. O glicerol fosfato resultante é oxidado por ação da glicerol-3-fosfato oxidase

resultando na liberação de dihidroxiacetona e água oxigenada. Através de reação oxidativa, catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com os compostos 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha) cuja absorbância é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos.

O ensaio foi conduzido em amostras contendo 10 µL de plasma dos animais e 250 µL de reagente de cor. Após incubação a 37°C durante 5 minutos, a leitura da absorbância a 500 nm foi realizada em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de triglicerídeos foram calculadas a partir de curvas-padrão de glicerol em solução aquosa e o resultado expresso em mg/dL.

4.6.2 Concentração de Colesterol total

O colesterol total foi determinado por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial da marca Biolabo (França). Esse método baseia-se na hidrólise dos ésteres de colesterol presentes na amostra, catalisada pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre, o qual, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-AMP, produz um composto róseo-avermelhado cuja absorbância é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

O ensaio foi conduzido em amostras contendo 10 µL de plasma dos animais e 1 mL de reagente de cor. Após incubação a 37°C durante 10 minutos, a leitura da absorbância a 500 nm foi realizada em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de colesterol total foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mg/dL.

4.6.3 Concentração de HDL – colesterol

O HDL-colesterol foi determinado por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial da marca Gold Analisa (Brasil). O método baseia-se na precipitação de quilomícrons, de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol), após a mistura de fosfotungstato e íons de magnésio, sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol). As enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase catalisam a formação de peróxido de hidrogênio a partir da HDL-colesterol que, após oxidação catalisada pela peroxidase, produz um composto de coloração avermelhada detectado espectrofotometricamente.

Alíquotas de 200 µL de plasma dos animais foram adicionadas de 500 µL de precipitante, mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos para obtenção de um sobrenadante límpido. Amostras de 100 µL do sobrenadante foram acrescidas de 1 mL de reagente de cor e, em seguida, agitadas e levadas ao banho-maria (D2800-Kottermann) a 37°C durante 10 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro (DU 650-Beckman). As concentrações de HDL-colesterol foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mg/dL.

4.6.4 Concentração de Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNE)

Os ácidos graxos não esterificados foram quantificados por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial da marca Wako (USA). O método baseia-se na acilação da coenzima A pelos ácidos graxos, na presença de acil-CoA sintetase. A acil-CoA produzida é oxidada pela acil-CoA oxidase com geração de peróxido de hidrogênio. Esse peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, permite o acoplamento oxidativo de 3-

metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina e 4-AMP. O produto é um composto róseo-avermelhado cuja absorbância é diretamente proporcional à concentração de ácidos graxos não esterificados na amostra.

O ensaio foi conduzido em amostras contendo 20 μ L plasma dos animais e 300 μ L de reagentes de cor. Após incubação a 37°C durante 10 minutos, com cada um dos reagentes a leitura da absorbância a 500 nm foi realizada em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de ácidos graxos não esterificados foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em μ mol/L.

4.6.5 Concentração de Glicerol

O glicerol foi quantificado por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial da marca Sigma (USA). Esse método baseia-se na fosforilação do glicerol na presença de ATP, formando glicerol-1-P, em uma reação catalizada pela glicerol quinase. O glicerol -1-P é oxidado a dihidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio por ação da glicerol fosfato oxidase. Esse peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, permite o acoplamento oxidativo de N-etil-N-(3-sulfopropil) m-anisidina de sódio e 4-AMP. O produto é um composto violeta detectado por um leitor de placas a 492nm, cuja absorbância é diretamente proporcional à concentração de glicerol na amostra.

O ensaio foi conduzido em amostras contendo 40 μ L de plasma dos animais e 200 μ L de reagente de cor. Após incubação a 37°C durante 5 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de glicerol foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mM.

4.6.6 Concentração de Glicose

A glicose foi determinada por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial da marca Roche (Espanha). O método baseia-se na oxidação da glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, catalisada pela glicose oxidase. Através de uma reação oxidativa de acoplamento, catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-AMP e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

O ensaio foi conduzido em amostras contendo 10 µL de plasma dos animais e 250 µL de reagente de cor. Após incubação a 37°C durante 10 minutos, a leitura da absorbância a 500 nm foi realizada em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de glicose foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mg/dL.

4.6.7 Concentração de Insulina

A insulina foi determinada por ensaio imunoenzimático ELISA, utilizando-se *kit* comercial para análise de insulina em ratos (Mercodia). O método baseia-se na técnica direta de sanduíche na qual, durante a incubação, a insulina presente na amostra reage com um anticorpo anti-insulina conjugado com peroxidase e com um anticorpo anti-insulina, presente na placa. Após a lavagem das placas com solução salina fosfatada (*Phosphate Buffered Saline* – PBS) Tween® 0.1% proveniente do kit, o anticorpo marcado, que não se ligou à insulina, é eliminado enquanto que, o anticorpo conjugado com a peroxidase, ligado à insulina, é detectado pela reação 3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. A reação é interrompida com a adição de um ácido (H₂SO₄), produzindo um composto róseo-avermelhado detectado por um leitor de placas a 450 nm.

Para determinar a concentração de insulina nas amostras foram utilizados 25 µL de plasma e 50 µL de solução de anticorpo monoclonal anti-insulina, conjugado com peroxidase. Após incubação por 2 horas a 20-25°C, a placa foi lavada 6 vezes com PBS-Tween® 0,1%. Acrescentou-se 200 µL de substrato da peroxidase e incubou-se novamente durante 15 minutos. Posteriormente a esta etapa, a reação foi interrompida com H₂SO₄ (0,5M) e a leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de insulina foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mg/dL.

4.7 Quantificação dos ácidos graxos nos lipídios totais do plasma, tecido adiposo branco retroperitoneal e dietas experimentais

A extração lipídica, saponificação e metilação dos ácidos graxos foram realizadas, em duplicata, partindo de uma alíquota de 0,2 g ou 100 ml de amostra (tecido, ração ou plasma) de acordo com o método de Lepage e Roy (1986). Os ésteres metílicos foram quantificados por cromatografia gás-líquido, utilizando-se um cromatógrafo Perkin Elmer autosystem XL equipado com detector de chama ionizável e um software Turbochrom. Os ácidos graxos foram separados com coluna capilar SP 2560 (Supelco, USA) com 100 m x 0,25 mm x 0,20 µm. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas de injeção e detecção foram respectivamente, 260°C e 280°C. A temperatura da corrida foi programada para iniciar a 135°C durante 5 minutos com subida de 2°C/minuto até 195°C. A partir daí, com subida de 4°C até alcançar 240°C, permanecendo por 2,5 minutos. O tempo total da corrida somou 45 minutos. A pressão do gás arraste foi de 32 Psi. A razão de split foi de 1:70. Os ésteres foram identificados por comparação com seu tempo de retenção com padrões conhecidos (Sigma, Supelco). Os resultados foram expressos como percentual de ácidos graxos totais.

4.8 Quantificação de RNAm para resistina, TNF α , adiponectina, leptina e PPAR γ no tecido adiposo branco retroperitoneal

4.8.1 Extração de RNA total

A amostra (0,5 g) de tecido adiposo retroperitoneal foi fragmentado em homogenizador de tecido. Durante todo o processo o tecido foi mantido congelado em nitrogênio líquido, prevenindo a atividade de enzimas que pudessem degradar o RNA. O pulverizado foi homogeneizado em 5 mL de TRI Reagent® (Sigma) e o RNA total foi extraído de acordo com o método descrito por Chomczynski e Sacchi (1987), utilizando-se *Kit* comercial. O método baseia-se na separação de RNA mediante fenol-clorofórmio e a proteção de RNA pela solução de guanidina tiocianato, que atua como inibidor de ribonucleases. Após a obtenção do tecido homogenizado em trizol, este foi incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Foi adicionado 1 mL de clorofórmio a solução e agitado vigorosamente durante 15 s, com repouso de 4 minutos à TA. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação durante 15 minutos a 14.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C em centrífuga refrigerada, com a separação de três fases. O RNA total presente na fase superior foi transferido para um outro tubo e submetido à precipitação com 2,5 mL de isopropanol com 10 minutos de incubação em gelo e posterior centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O *pellet* de RNA resultante foi lavado em 1 mL de etanol 75% com centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos em TA e foi ressuspensão em 40 μ L de água mili-Q estéril tratada com dietipirocarbonato 0,1%, que atua como inibidor de ribonucleases, aquecida, 5 minutos, a 65°C. O volume de solução aquosa utilizado para a ressuspensão do RNA variou entre 40 e 50 μ L, em função do rendimento da extração. A concentração de RNA das amostras foi determinada espectrofotometricamente, a partir da leitura da absorbância a 260 e 280 nm (Farrel, 1993).

4.8.2 Eletroforese em gel de Agarose

O volume de 12 μL contendo aproximadamente: 1 μL de RNA, 2 μL de solução de tampão de carga com brometo de etídio e formamida deionizada (*RNA Sample Loading Buffer*®) e 9 μL de água com dietilpirocarbonato, foi aplicado no gel de Agarose a 0,8%. Após a separação eletroforética (100 V e 250 mA), o gel foi observado em luz ultra violeta para visualização das bandas de RNA 18S e 28S. A aparência das bandas forneceu indicação quanto à integridade do RNA (Farrel, 1993) (figura 4A).

Com o objetivo de evitar a degradação enzimática do RNA por ribonucleases, todas as soluções e material utilizados, durante a preparação do gel, do tampão de carga e o de eletroforese, foram realizados em condições livres de contaminação.

4.8.3 Transcrição Reversa

A partir da concentração de RNA das amostras, previamente determinada por espectrofotômetro e água com dietilpirocarbonato foram realizados cálculos a fim de alcançar 2 μg de RNA em um volume de 14 μL e acrescentado 1 μL de Oligo-dT como oligonucleotídeo iniciador da reação para incubação a 70°C por 5 minutos em termociclador. Após essa etapa, foram acrescentados 5 μL de *M-MLV Buffer* 5x como tampão da enzima (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2), 1,25 μL de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 0,75 μL RNAzin como inibidor de RNase e 0,5 μL M-MLV transcriptase reversa como a enzima utilizada para catalisar a síntese de DNA complementar (DNAc) (Promega, USA) e completado com água de dietilpirocarbonato até um volume final de 25 μL e incubado a 37°C por 1 hora, afim de obter o DNAc, produto da transcrição reversa.

4.8.4 PCR em Tempo Real

Uma vez obtido o DNAc, foi determinada a expressão gênica mediante a amplificação da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real e análises dos dados, utilizando-se o sistema *LightCycler*® versão 4.0 (Roche Diagnostics GmbH) e o *kit* comercial *Light Cycler*® *FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics GmbH). Este sistema baseia-se na detecção e quantificação de um sinal fluorescente. Cada reação de 10 µL continha 2 µl de uma diluição 1:20 de DNAc e 8 µL de solução contendo MgCl₂, 0,5 µl de mix de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto (*forward*) e reverso (*reverse*) específicos para cada gene determinado, enzima *Light Cycler*® *FastStart* e água específica para uso em PCR em tempo real. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram as seguintes:

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR em tempo real para determinar a expressão dos diferentes genes.

Genes	<i>Primer 5' (direto)</i>	<i>Primer 3' (reverso)</i>
Adiponectina	AATCCTGCCCAGTCATGAAG	CATCTCCTGGGTCACCCTTA
Leptina	CACCAGGATCAATGACATTTTAC	CCTCTGTGGAGTAGAGCGAGG
Resistina	CTACATTGCTGGTCAGTCTCC	GCTGTCCAGTCTATGCTTCC
TNF α	CGTCAGCCGATTTGCCATTTC	TGGGCTCATACCAGGGCTTGAG
PPAR γ	CCCACCCAACCTTCGGAATCA	TGCGAGTGGTCTTCCATCAC
Ciclofilina b	TACAATGAGCTGCGTGTGG	TGGTGGTGAAGCTGTAGCC

O programa de amplificação constituiu-se de 45 ciclos repetidos quando foram realizados: desnaturação a 95°C durante 10 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a 60°C por 5 segundos e extensão a 72 °C durante 10 segundos. Após o término desta última etapa foi realizada leitura da fluorescência. Como a temperatura pode variar em função de cada oligonucleotídeo iniciador na etapa de anelamento, para a leptina e o TNF α foram empregadas temperaturas de 64°C e 68°C, respectivamente. As curvas de *melting* foram avaliadas para cada gene, confirmando a amplificação específica. Os produtos das reações de PCR em tempo real foram separados em um gel de agarose 2% e marcados com brometo de etídio para confirmar a presença de um produto único (figura 4B). A reação foi realizada em triplicata a partir das amostras de DNAc independentes de 6 animais por grupo. A tecnologia *LightCycler* proporciona, para cada gene analisado, o cálculo do Ct (*cycle threshold* – ciclo limiar) de cada amostra. O Ct corresponde ao momento em que a reação cruza o limiar de detecção, ponto que detecta o ciclo no qual a amplificação se inicia. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. Os compostos fluorescentes geram um sinal cuja emissão aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. A partir dos Ct, foi calculada a expressão dos distintos genes analisados no tecido adiposo branco retroperitoneal dos animais mediante a fórmula matemática descrita por Pfaffl (2001). De modo a viabilizar a determinação de diferenças na expressão dos genes entre os grupos experimentais, a expressão dos diferentes genes foi normalizada pela quantidade de DNAc total presente em cada amostra. O teor de DNAc total foi estabelecido mediante a quantificação da expressão de um gene normalizador (*housekeeping*), cuja expressão não se encontrava alterada entre os diferentes grupos experimentais. No presente estudo o gene normalizador detectado correspondeu à ciclofilina b. Os resultados foram expressos como o grau de expressão de cada gene (expressão de RNAm), em cada grupo experimental, relativo à expressão do gene ciclofilina b.

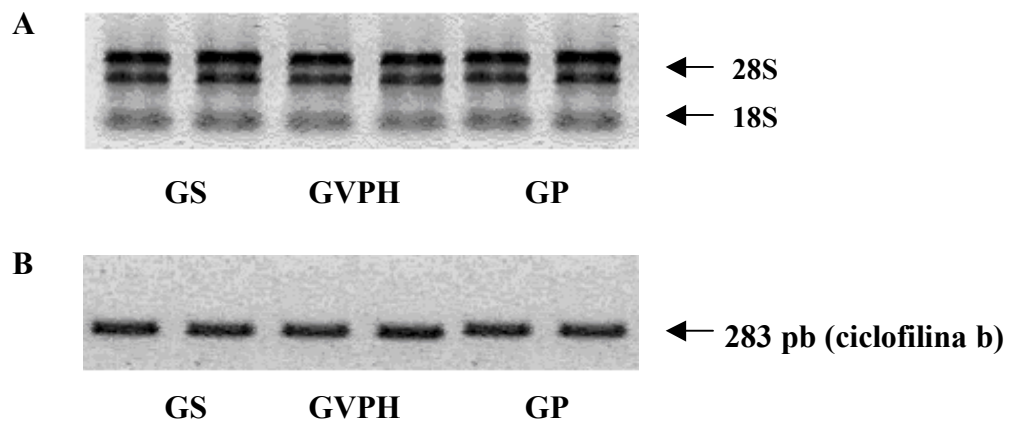


Figura 4. A) Gel ilustrativo da integridade do RNA total em 2 amostras de tecido adiposo retroperitoneal de cada grupo experimental (GS, GVPH, GP) em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio. B) Gel ilustrativo do produto de RT-PCR em tempo real do gene controle (ciclofilina b = 283 pb) em 2 amostras de cada grupo experimental (GS, GVPH, GP) em gel de agarose 2% com brometo de etídio, exemplificando a confirmação da presença de um produto único e específico. GS, grupo soja; GVPH, grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada; GP, grupo peixe; pb, pares de base.

4.9 Análise Estatística

Foi utilizada análise de variância (ANOVA), de uma via, para a comparação entre os grupos. Para a comparação das médias dos resultados obtidos entre os grupos, aplicou-se o teste *pos-hoc* para comparação múltipla de Duncan. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre a expressão dos genes estudados, em cada grupo. A análise estatística foi feita através do programa SPSS versão 14.0 (SPSS Inc., USA) O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

RESULTADOS

5.1 Consumo alimentar e massa corporal

A figura 5 apresenta os valores médios semanais das medidas de ingestão alimentar dos animais GS, GP e GVPH, desde o desmame até o 120º dia de vida (quarta a décima sétima semanas de vida), expressos em gramas de ração por 100g de massa corporal. Após o desmame, verifica-se que os animais alimentados com gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH) mantiveram, até a sua sétima semana de vida (cerca de 45 dias), consumo reduzido de ração, quando comparados aos animais GS e GP. A partir de então, verifica-se que um novo padrão de consumo alimentar entre estes animais foi estabelecido, de modo que as diferenças no consumo de ração entre os grupos deixaram de alcançar significância estatística até o 120º dia de vida dos animais (décima sétima semana).

A figura 6 apresenta os resultados das medidas médias semanais de massa corporal dos animais GS, GP e GVPH, desde o nascimento até o 120º dia de vida (décima sétima semana de vida). Os valores encontram-se expressos em gramas. Verifica-se que não há diferença significativa entre a massa corporal dos animais pertencentes aos três grupos experimentais estudados, desde o nascimento até o final do período de lactação (quarta semana de vida). Entretanto, após o primeiro mês de vida e até a décima quarta semana de vida (cerca de 95 dias), os animais que receberam dieta com gordura vegetal hidrogenada (GVPH) passam a apresentar massa corporal aumentada, quando comparados aos animais GS e GP. De outro modo, a partir da décima quinta semana, os animais GP passaram a apresentar redução da sua massa corporal, em relação aos animais GVPH, mantida até a data dos experimentos aos 120 dias de vida.

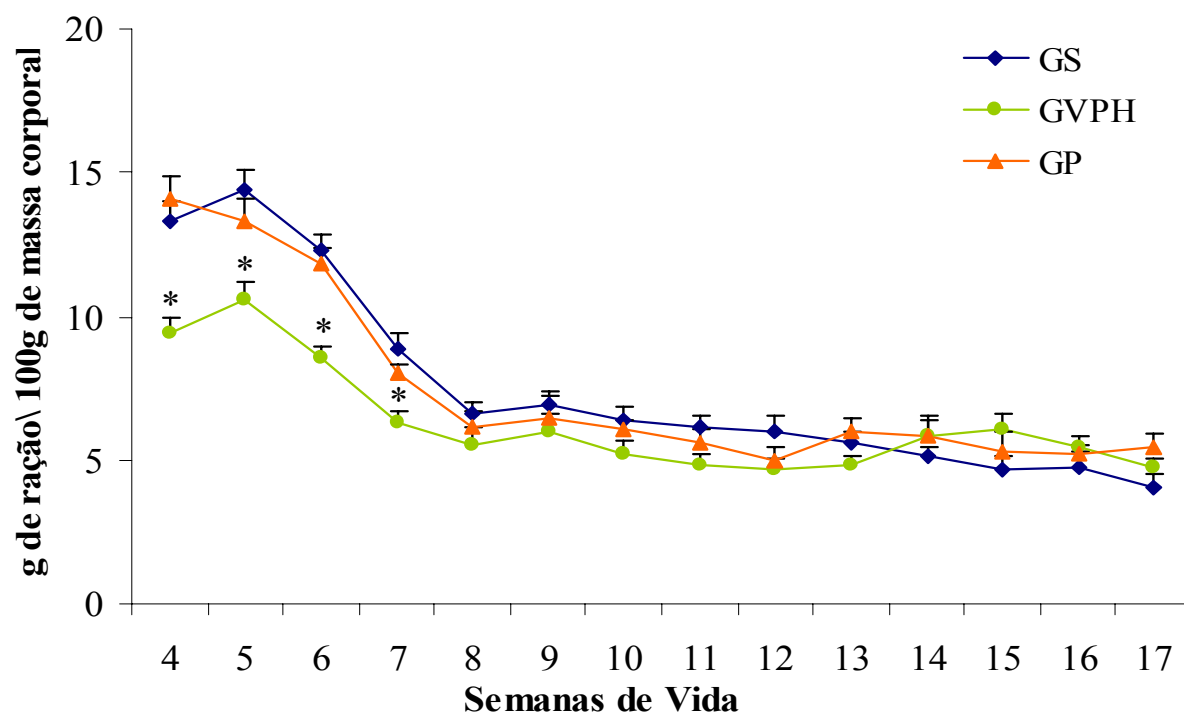


Figura 5. Ingestão alimentar semanal (g de ração/ 100g massa corporal) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas, desde o desmame (4ª semana de vida) até o 120º dia de vida (17ª semana de vida). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe). * $p < 0,05$ vs. GS e GP.

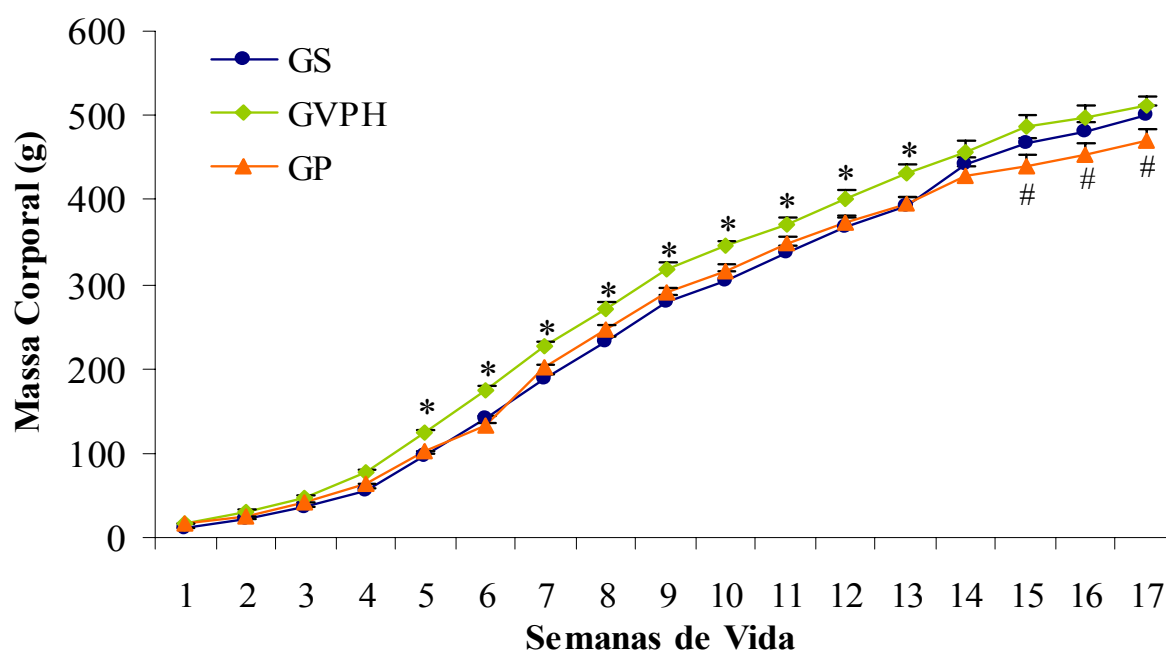


Figura 6 – Evolução ponderal dos filhotes machos desde o nascimento até a 17ª semana de vida (120º dia de vida) pós-natal. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe). * $p < 0,05$ GVPH vs. GS e GP; # $p < 0,05$ GP vs. GVPH.

5.2 – Composição percentual de ácidos graxos das dietas experimentais

Os resultados apresentados na tabela 3 correspondem aos valores percentuais médios de ácidos graxos das dietas confeccionadas com diferentes fontes lipídicas.

O valor percentual do ácido graxo saturado (AGS) esteárico (C18:0) bem como o relativo ao total de AGS, mostraram-se mais elevados na dieta confeccionada com gordura vegetal hidrogenada, comparados aos valores respectivos nas demais dietas analisadas. Conforme esperado, a presença de isômeros *trans* foi detectada apenas na dieta contendo gordura vegetal hidrogenada. O valor percentual do AG oléico (C18:1n-9) apresentou-se diminuído na dieta contendo óleo de peixe. A dieta confeccionada com óleo de soja revelou o maior conteúdo percentual do AG linoléico (C18:2n-6). Os AGPICL, EPA e DHA foram encontrados somente na dieta à base de óleo de peixe. A presença de quantidade expressiva do AG linoléico (C18:2n-6) nesta dieta reflete o seu conteúdo de óleo de milho, também adicionado durante a confecção da dieta, que contempla um elevado percentual deste AG em sua composição.

Tabela 3 – Composição percentual média de ácidos graxos das dietas experimentais.

Ácidos Graxos	Dietas (% do total de ácidos graxos)		
	GS	GVPH	GP
Total AGS[#]	19,64	36,58	14,44
C14:O	1,34	0,07	1,44
C16:O	14,45	10,24	6,9
C18:O	3,71	12,15	3,07
<i>Trans</i> AGM	n.d	14,12	n.d
C18:1 <i>trans</i> n-9 / n-7 isômeros	n.d	14,12	n.d
Total AGM[#]	19,92	25,08	12,96
C18:1 n9	19,03	19,92	9,51
C18:1 e outros <i>cis</i> -isômeros ^a	n.d	4,82	0,38
C20:1	0,52	0,32	1,7
C24:1	n.d	0,02	0,6
<i>Trans</i> AGPI	n.d	0,69	n.d
C18:2 (n-6)tc ^b	n.d	0,17	n.d
C18:2 (n-6)ct ^b	n.d	0,4	n.d
C18:2 (n-6)tt ^b	n.d	0,12	n.d
Total AGPI[#]	60,15	23,36	72,48
C18:2 (n-6)	55,87	20,75	10,85
C18:3 (n-3)	3,59	2,61	1,13
C20:5 (n-3) EPA	n.d	n.d	35,04
C22:6 (n-3) DHA	n.d	n.d	17,24
Total <i>trans</i>[#]	n.d	14,81	n.d

[#] indica o somatório e inclui ácidos graxos que não estão referidos na tabela. n.d – não detectado. ^a inclui todos os isômeros *cis* de posição do 18:1 exceto o 18:1 (n-9); ^b c, *cis* dupla ligação; t, *trans* dupla ligação. AGS – ácidos graxos saturados, AGM – ácidos graxos monoinsaturados, AGPI – ácidos graxos poliinsaturados. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico. GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

5.3 – Composição percentual de ácidos graxos plasmáticos

A tabela 4 apresenta os valores percentuais de ácidos graxos presentes no plasma dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

O plasma dos animais GVPH mostrou o maior percentual de AGS totais, em relação ao conteúdo plasmático total destes AG dos animais GS e GP. Dentre os AGS detectados, aquele que se apresentou em maior proporção no plasma de todos os grupos estudados foi o AG palmítico (C16:0). O teor plasmático total dos AG monoinsaturados não mostrou variações percentuais significativas entre os grupos estudados. Considerada a soma dos ácidos graxos poliinsaturados, foi detectado um valor percentual reduzido no GVPH, em relação ao valor correspondente detectado no plasma dos animais GS. Embora o GP também tenha exibido um total de AGPI maior do que o do GVPH, a diferença observada não alcançou significância estatística. O GS apresentou o maior percentual plasmático de AG linoléico (C18:2n-6), em relação aos valores correspondentes aos GVPH e GP. O conteúdo relativo de AA mostrou-se mais elevado no plasma dos animais GS e mais reduzido no dos animais GP. Os maiores percentuais plasmáticos de EPA e DHA foram detectados no GP, os quais também mostraram a menor relação AA/EPA, entre os três grupos experimentais. Como esperado, os ácidos graxos *trans* foram detectados somente no plasma dos animais GVPH.

Tabela 4 – Valores percentuais de ácidos graxos plasmáticos de filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

Ácidos Graxos (%)	GS	GVPH	GP
Total AGS [#]	28,80 ± 1,03 ^a	43,05 ± 0,97 ^b	33,48 ± 1,08 ^a
C16:0	14,05 ± 0,77 ^a	21,85 ± 1,36 ^b	17,61 ± 0,69 ^{ab}
C18:0	12,93 ± 0,50 ^a	12,64 ± 0,75 ^a	13,87 ± 0,42 ^a
<i>Trans</i> AGM	n.d	9,56 ± 0,97	n.d
Total <i>cis</i> AGM [#]	13,37 ± 0,88 ^a	15,34 ± 0,96 ^a	14,61 ± 1,03 ^a
C18:1 n-9	10,66 ± 1,00 ^a	11,41 ± 1,84 ^a	10,04 ± 0,98 ^a
Total AGPI [#]	57,83 ± 1,21 ^a	40,61 ± 1,62 ^b	51,91 ± 1,37 ^{ab}
C18:2 (n-6)	16,15 ± 1,15 ^a	7,06 ± 0,07 ^b	6,66 ± 0,25 ^b
C18:3 (n-3)	0,58 ± 0,06 ^a	0,22 ± 0,10 ^a	0,96 ± 0,10 ^a
C20:4 (n-6) AA	35,13 ± 1,49 ^a	28,99 ± 1,67 ^b	15,96 ± 1,42 ^c
C20:5 (n-3) EPA	4,3 ± 0,34 ^a	3,37 ± 0,17 ^a	15,37 ± 0,90 ^b
C22:6 (n3) DHA	0,49 ± 0,09 ^a	0,45 ± 0,03 ^a	10,96 ± 0,52 ^b
AA/EPA	8,17 ± 0,76 ^a	8,60 ± 0,81 ^a	1,04 ± 0,10 ^b
Total <i>trans</i>	n.d	9,56 ± 0,97	n.d

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para valores da mesma linha. # indica o somatório e inclui ácidos graxos não referidos na tabela. n.d – não detectado. AGS – ácidos graxos saturados, AGM – ácidos graxos monoinsaturados, AGPI – ácidos graxos poliinsaturados, AA – ácido araquidônico, EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico. GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

5.4 – Composição percentual de ácidos graxos do tecido adiposo branco retroperitoneal

A tabela 5 apresenta os valores percentuais de ácidos graxos incorporados no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABR) dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

O TABR dos animais GP mostrou teor total de AGS bem como conteúdo relativo de EPA e DHA, significativamente mais elevados do que os dos animais GVPH e GS. Estes animais apresentaram ainda a menor razão AA/EPA, dentre os valores verificados para os animais pertencentes aos três grupos estudados, enquanto que para os animais GS, foi definida a maior razão entre estes AG. O tecido adiposo dos animais alimentados com gordura hidrogenada mostrou incorporação de ácidos graxos *trans*, além de concentrar o maior conteúdo relativo de AGM totais. Os animais GS apresentaram maior conteúdo relativo tecidual de AGPI da série n-6 (C18:2n-6), enquanto os animais GVPH, com dieta rica em ácidos graxos *trans*, o menor conteúdo total de AGPI, quando comparados os tecidos dos três grupos experimentais.

Tabela 5 – Valores percentuais de ácidos graxos do tecido adiposo branco retroperitoneal de filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

Ácidos Graxos (%)	GS	GVPH	GP
Total AGS [#]	39,88 ± 0,99^b	35,48 ± 1,10^c	49,93 ± 1,13^a
C16:0	34,47 ± 0,74 ^a	29,63 ± 0,97 ^b	41,92 ± 0,94 ^a
C18:0	3,56 ± 0,29 ^a	4,19 ± 0,23 ^{ab}	5,55 ± 0,17 ^b
<i>Trans</i> AGM	n.d	4,30 ± 0,27	n.d
Total <i>cis</i> AGM [#]	27,39 ± 0,22 ^a	50,51 ± 1,13 ^b	24,76 ± 1,07 ^a
C18:1 n-9	17,48 ± 0,53 ^a	41,69 ± 0,90 ^b	15,96 ± 0,79 ^a
C18:1 n-9 <i>cis</i> isômeros	0,56 ± 0,10 ^a	2,31 ± 0,30 ^b	0,33 ± 0,03 ^a
Total AGPI [#]	32,59 ± 1,04 ^a	10,07 ± 0,37 ^c	24,52 ± 1,23 ^b
C18:2 (n-6)	30,34 ± 1,00 ^a	9,42 ± 0,37 ^b	7,09 ± 0,50 ^c
C18:3 (n-3)	0,13 ± 0,01 ^b	0,47 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,05 ^a
C20:4 (n-6) AA	0,48 ± 0,03 ^a	0,10 ± 0,02 ^b	0,56 ± 0,03 ^a
C20:5 (n-3) EPA	0,02 ± 0,002 ^a	0,01 ± 0,004 ^a	5,33 ± 0,35 ^b
C22:6 (n3) DHA	0,08 ± 0,009 ^a	0,01 ± 0,006 ^a	6,71 ± 0,43 ^b
AA/EPA	22,50 ± 2,72 ^a	8,75 ± 1,42 ^b	0,11 ± 0,01 ^c
Total <i>trans</i>	n.d	4,30 ± 0,27	n.d

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para valores da mesma linha. # indica o somatório e inclui ácidos graxos não referidos na tabela. n.d – não detectado. AGS – ácidos graxos saturados, AGM – ácidos graxos monoinsaturados, AGPI – ácidos graxos poliinsaturados, AA – ácido araquidônico, EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico. GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

5.5 – Perfil bioquímico sanguíneo

A tabela 6 apresenta os valores relativos às concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c), ácido graxo não esterificado (AGNE), glicerol, glicose e insulina, além das razões colesterol total/HDL-c e insulina/glicose dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

Ao final do experimento, os animais tratados com óleo de peixe (GP) apresentaram as menores concentrações plasmáticas de TG, CT, HDL-c, AGNE e glicerol, quando estes valores foram comparados aos respectivos valores relativos aos animais dos grupos tratados com óleo de soja (GS) e gordura hidrogenada (GVPH). Ainda que o grupo GP tenha apresentado a menor concentração plasmática de HDL-c, a razão CT/HDL-c mostrou que o grupo com a menor concentração, relativa, de HDL-c foi aquele tratado com gordura hidrogenada. Estes animais mostraram ainda elevação do seu conteúdo de insulina plasmática bem como maior razão insulina/glicose, em relação aos mesmos parâmetros analisados para os animais GS e GP, além de menor concentração plasmática de glicose quando comparado ao GP. Entre todos os parâmetros bioquímicos analisados, os animais GVPH e GS somente mostraram diferenças entre si para a insulinemia e as razões CT\HDL e insulina/glicose.

Tabela 6 - Concentrações de parâmetros bioquímicos plasmáticos dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

Parâmetros Bioquímicos	GS	GVPH	GP
Triglicerídeo (mg/dL)	56,47 ± 3,95 ^a	79,72 ± 8,62 ^a	24,90 ± 3,02 ^b
Colesterol Total (mg/dL)	59,25 ± 4,66 ^a	64,30 ± 4,01 ^a	34,19 ± 2,98 ^b
HDL-colesterol (mg/dL)	32,24 ± 1,91 ^a	30,10 ± 1,37 ^a	20,06 ± 1,57 ^b
CT / HDL-c (mg/dL)	1,84 ± 0,11 ^a	2,13 ± 0,19 ^b	1,70 ± 0,14 ^a
AGNE (mM)	0,68 ± 0,05 ^a	0,54 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,07 ^b
Glicerol (mM)	336,9 ± 10,12 ^a	373,4 ± 13,16 ^a	192,0 ± 8,13 ^b
Glicose (mg/dL)	108,63 ± 12,51 ^{ab}	145,40 ± 3,40 ^a	75,69 ± 5,35 ^b
Insulina (mg/dL)	0,56 ± 0,18 ^b	1,36 ± 0,27 ^a	0,50 ± 0,13 ^b
Insulina/Glicose (mg/dL)	0,005 ± 0,001 ^a	0,009 ± 0,0002 ^b	0,006 ± 0,001 ^a

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para valores da mesma linha. AGNE – ácido graxo não esterificado. GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GP (grupo peixe).

5.6 – Expressão de RNAm para resistina, TNF α , adiponectina, leptina e PPAR γ no tecido adiposo branco retroperitoneal

As figuras 7 a 11 apresentam os dados de quantificação da expressão dos genes resistina, TNF α , adiponectina, leptina e PPAR γ no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABR) dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

O consumo de ração a base de gordura vegetal hidrogenada produziu aumento significativo na expressão dos genes resistina e TNF α , comparada à expressão destes genes no TABR dos animais GS e GP, os quais, por sua vez, não manifestaram diferenças entre si na expressão destes genes (figuras 7 e 8). A ingestão de GVPH promoveu também redução significativa da expressão de adiponectina, comparada à expressão deste gene no TABR dos animais GS e GP, os quais, mais uma sua vez, não manifestaram diferenças entre si na expressão deste gene (figura 9). Os animais que receberam dieta à base de óleo de peixe apresentaram redução significativa da expressão de leptina, quando comparados aos animais GS e GVPH, os quais, não manifestaram diferenças entre si na expressão deste gene (figura 10). O tratamento com óleo de peixe promoveu ainda a maior expressão de PPAR γ no TABR, obtida entre todos os grupos estudados. De outro modo, o tratamento com gordura hidrogenada produziu a menor expressão desse gene, dentre os três grupos experimentais (figura 11).

A tabela 7 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson (r), com os respectivos valores de p, relativos às diferentes análises de correlação efetuadas entre os resultados de expressão dos genes estudados, nos três grupos experimentais.

Os animais que consumiram óleo de soja como fonte lipídica, manifestaram forte correlação positiva entre as expressões de PPAR γ e leptina ($r = 0,93$) em seu TABR. Entre os

animais tratados com ração rica em GVPH, foram encontradas correlações negativas entre as expressões dos genes PPAR γ e TNF α ($r = - 0,89$) bem como entre as expressões dos genes resistina e adiponectina ($r = - 0,83$). De outro modo, neste grupo de animais, as quantificações da expressão dos genes PPAR γ e adiponectina correlacionaram-se positivamente ($r = 0,86$). Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre as expressões dos genes analisados para o grupo alimentado com ração à base de óleo de peixe.

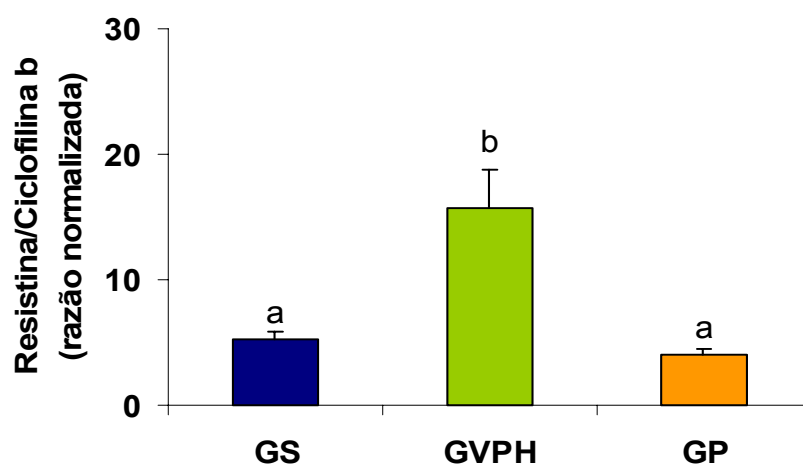


Figura 7 - Expressão de Resistina no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida. Resultados de RT-PCR em tempo real do gene Resistina, expressos em unidade arbitrária, em relação à expressão do gene Ciclofilina b, utilizado como gene de referência. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

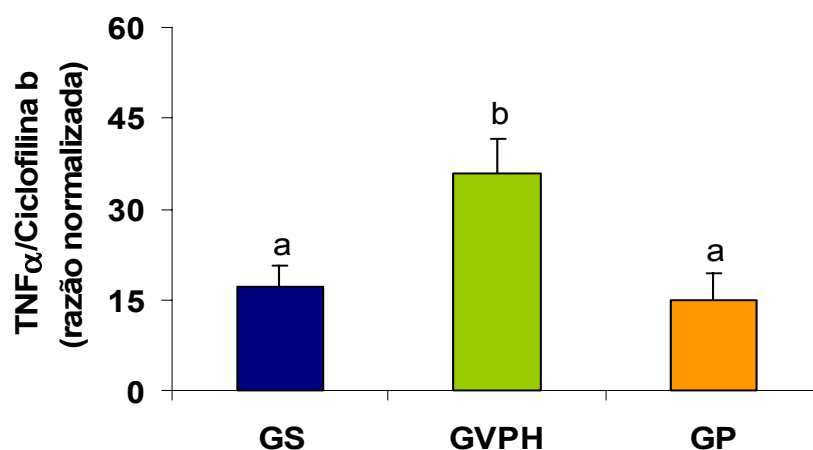


Figura 8 - Expressão de TNF α no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida. Resultados de RT-PCR em tempo real, expressos em unidade arbitrária, em relação à expressão do gene Ciclofilina b, utilizado como gene de referência. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

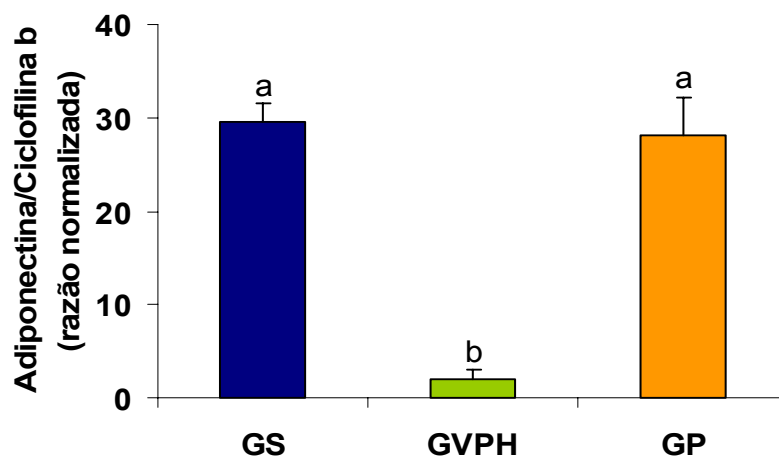


Figura 9 - Expressão de Adiponectina no tecido adiposo branco retroperitoneal dos machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida. Resultados de RT-PCR em tempo real, expressos em unidade arbitrária, em relação à expressão do gene Ciclofilina b, utilizado como gene de referência. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

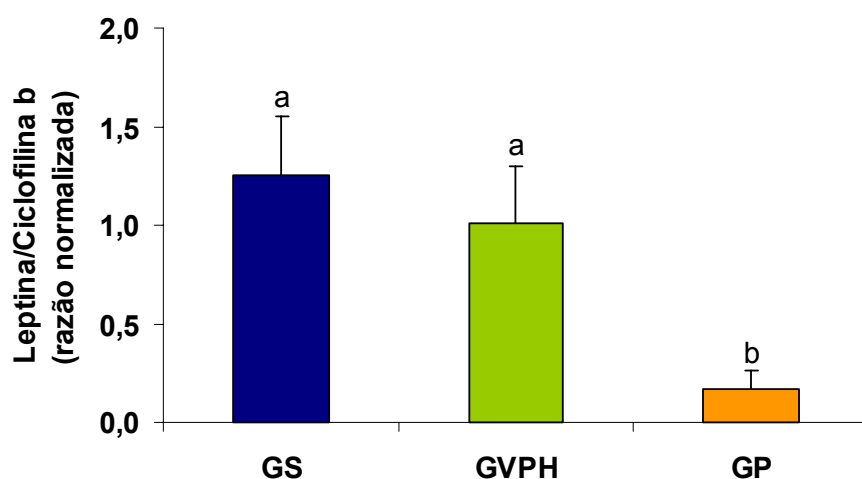


Figura 10 - Expressão de Leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida. Resultados de RT-PCR em tempo real, expressos em unidade arbitrária, em relação à expressão do gene Ciclofilina b, utilizado como gene de referência. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

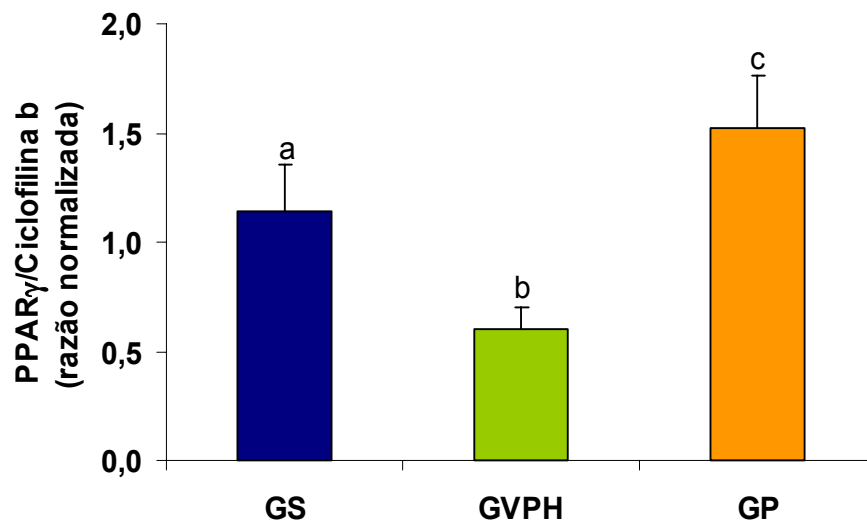


Figura 11 - Expressão de PPAR- γ no tecido adiposo branco retroperitoneal dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida. Resultados de RT-PCR em tempo real, expressos em unidade arbitrária, em relação à expressão do gene Ciclofilina b, utilizado como gene de referência. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada) e GP (grupo peixe).

Tabela 7 – Correlação linear (Pearson) entre a expressão dos genes PPAR γ , resistina, TNF α , adiponectina e leptina pelo tecido adiposo branco dos filhotes machos adultos alimentados com diferentes fontes lipídicas, no 120º dia de vida.

Genes	GS		GVPH		GP	
	r	p-valor	r	p-valor	r	p-valor
PPARγ vs Resistina	-0,11	0,849	-0,73	0,158	-0,51	0,379
PPARγ vs TNFα	0,15	0,806	-0,89*	0,044	0,29	0,634
PPARγ vs Adiponectina	0,63	0,252	0,86*	0,031	0,31	0,612
PPARγ vs Leptina	0,93*	0,022	0,27	0,654	0,43	0,467
Resistina vs TNFα	0,55	0,253	0,67	0,142	0,36	0,478
Resistina vs Adiponectina	-0,42	0,406	-0,83*	0,040	-0,32	0,537
Resistina vs Leptina	0,09	0,884	0,18	0,767	0,35	0,562
TNFα vs Leptina	0,08	0,890	0,58	0,296	0,28	0,647
Adiponectina vs TNFα	-0,20	0,696	-0,36	0,484	-0,53	0,276
Adiponectina vs Leptina	0,42	0,472	-0,06	0,916	-0,58	0,304

r * valor de coeficiente de correlação de Pearson significativa ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GP (grupo peixe).

Relatos científicos recentes têm demonstrado que a importância metabólica e fisiológica dos ácidos graxos transcende o reconhecimento das suas clássicas funções como macronutrientes energéticos e constituintes de estruturas celulares. Atribui-se aos ácidos graxos ações moleculares distintas e dependentes das suas características estruturais e espacialmente conformacionais. Neste sentido, a composição específica de ácidos graxos constituintes de membranas pode modular mecanismos envolvidos com a regulação da função celular (Fickova *et al.*, 1998). Estas estruturas lipídicas podem também interagir com fatores de transcrição, agindo como ligantes ativadores de fatores de transcrição, modulando diretamente a expressão de genes capazes de desencadear diferentes respostas metabólicas, inclusive na diferenciação celular e crescimento de adipócitos (Roche, 2004; Gerhold *et al.*, 2002). Assim, o acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo, caracterizando condição patológica, em geral, associada a distintos agravos à saúde, pode estar relacionado, não exclusivamente ao consumo excessivo de lipídeos, mas também às suas variações qualitativas, dentre outros fatores, sabidamente envolvidos na etiologia da obesidade. Adicionalmente, tem sido reconhecido que as variações de qualidade das estruturas lipídicas podem alterar a função endócrina do tecido adiposo, modulando a secreção e expressão de adipocinas (Bray *et al.*, 2002; Flachs *et al.*, 2006). Reunidas, estas e outras evidências científicas, têm respaldado o interesse na investigação acerca da interação entre diferentes ácidos graxos e o controle da expressão gênica, traduzindo-se na possibilidade da elucidação dos mecanismos envolvidos em diferentes disfunções metabólicas de reconhecida importância para a saúde humana.

Neste contexto, no presente estudo, buscamos avaliar os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa das séries n-3 e n-6 e dos ácidos graxos *trans*, sobre a

modulação da expressão de genes associados à função endócrina do tecido adiposo, bem como sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos relacionados à homeostase glicêmica e ao metabolismo lipídico. Utilizamos ratos machos adultos, tratados com dietas manipuladas, confeccionadas com fontes alimentares daqueles diferentes ácidos graxos, desde a sua concepção até o 120º dia de vida.

O protocolo experimental utilizado consistiu na oferta das dietas manipuladas desde a concepção dos animais, respaldando-se no reconhecimento de que durante a vida intrauterina o feto depende do suprimento de nutrientes fornecido pela mãe. Fisiologicamente, esta dependência ainda se mantém durante o período pós-natal correspondente à amamentação (King, 2000). Cita-se ainda que o feto seja capaz de adaptar-se metabolicamente, frente às condições ambientais as quais é submetido durante o seu desenvolvimento (Barker, 2000). Assim é possível que sejam estabelecidas programações, metabólicas e funcionais, capazes de acompanhar os indivíduos ao longo de toda a sua vida. Questões desta natureza estão amplamente descritas na literatura, tratando essencialmente de condições ambientais adversas. Entretanto já há descrição acerca do papel de distintos fatores nutricionais, dentre estes os AGs, modulando, precocemente, o metabolismo (Albuquerque *et al.*, 2006). Neste sentido, o modelo experimental adotado em nosso estudo permitiu garantir a oferta de AGs distintos desde a vida pré-natal, viabilizando o estabelecimento de uma condição controlada, supostamente capaz de produzir alterações metabólicas tardias nestes animais. Testamos à hipótese de ocorrência de modificações na habilidade do tecido adiposo expressar adipocinas, em função dos diferentes tipos de AG disponibilizados através de fontes dietéticas, desde a concepção dos animais.

Procedendo à análise conjunta dos resultados relativos à massa corporal e a ingestão alimentar dos animais pertencentes aos três grupos experimentais estudados, verificamos que, o grupo que recebeu dieta normolipídica, rica em ácidos graxos *trans* (GVPH), manifestou

comportamento diferenciado. Nestes animais, o menor consumo de ração, em relação aos animais GS e GP, estabelecido após o desmame (aos 21 dias de vida) e mantido até a sétima semana de vida (cerca de um mês e meio de idade), não foi acompanhado por redução da sua massa corporal que, contrariamente, mostrou elevação significativa, em relação aos animais GS e GP, entre a quinta (cerca de um mês de idade) e a décima terceira (cerca de três meses de idade) semanas de vida. Adicionalmente, os animais que receberam ração rica nos AGPICL n-3, EPA e DHA (GP), mostraram comportamento alimentar, ao longo de todo o período experimental, semelhante ao dos animais GS, que consumiram dieta rica em ácido linoléico, importante representante da família de AGPI n-6 e também ao do GVPH, após a sétima semana de vida. Contudo, os animais GP manifestaram redução da sua massa corporal, em relação aos animais GVPH, a partir da décima quinta semana de vida até a data do seu sacrifício (aos 120 dias) (figuras 5 e 6).

Recentes publicações, descrevendo a utilização de protocolos dietéticos semelhantes, aplicados aos animais de experimentação, também mostraram resultados análogos aos nossos. Albuquerque e colaboradores (2006), também encontraram redução da ingestão alimentar após o desmame de animais que receberam dieta manipulada, normolipídica e isocalórica, rica em ácidos graxos *trans*, exclusivamente durante a gestação e lactação bem como desde a concepção até os 90 dias de vida, quando estes animais foram comparados aos animais controle, indicando que uma exposição no início da vida aos AGs *trans* está relacionada a adaptações no controle da ingestão alimentar através de alterações em mecanismos hipotalâmicos (Albuquerque *et al.*, 2006). Do mesmo modo, em investigação, conduzida em nosso próprio laboratório, animais tratados com ração confeccionada com gordura hidrogenada mostraram comportamento alimentar semelhante (Mizurini, 2006).

Diferenças no acúmulo de massa corporal, promovidas por dietas contendo lipídeos de distintas fontes alimentares também têm sido descritas. Sugere-se que a composição dos

ácidos graxos da fonte lipídica da dieta constitui fator determinante da eficiência metabólica da energia consumida, ou seja, da capacidade de utilização e/ou acumulação energética. Assim, as diferenças no acúmulo de massa corporal promovidas por dietas compostas por base de lipídeos de distintas naturezas dietéticas, podem ser justificadas em função das diferentes taxas de oxidação dos ácidos graxos (Jones, 1989). Neste sentido, Clarke (2000) mostrou que os AGPI da série n-3 atuam favorecendo a oxidação dos ácidos graxos e, assim, desfavorecendo o armazenamento desta molécula energética. O autor sugeriu que estes AGPI poderiam influenciar a expressão de genes de inúmeras enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, resultando no menor acúmulo de massa adiposa (Clarke, 2001). No presente estudo, entretanto, não constatamos diferenças entre as massas corporais dos animais GP e GS. No entanto, DeLany e colaboradores (2000) mostraram que os ácidos graxos insaturados são oxidados mais rapidamente, em detrimento de seu armazenamento, do que os ácidos graxos saturados (DeLany *et al.*, 2000). Assim, o elevado conteúdo total de AGS na dieta oferecida aos animais GVPH (tabela 3) pode ter contribuído para o maior acúmulo de massa adiposa observado neste grupo experimental.

Resultados experimentais acerca da evolução ponderal de animais, obtidos a partir da aplicação de protocolos experimentais que utilizam dietas isocalóricas e normolipídicas, ricas em ácidos graxos *trans* são escassos. Sabarense (2003) e Albuquerque e colaboradores (2006), quando trataram ratos com dieta hiperlipídica e normolipídica, respectivamente, à base de gordura vegetal hidrogenada, não observaram diferença significativa na massa corporal dos animais, quando comparados aos animais controle (Sabarense, 2003; Albuquerque *et al.*, 2006). Recentemente, demonstramos em nosso laboratório que dietas normolipídicas, a base de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, oferecidas desde a lactação, favorecem a retenção de massa corporal, em animais na idade jovem. O aumento da adiposidade observada nestes animais resultou, provavelmente,

em parte, da elevada taxa lipogênica, também observada em seus tecidos adiposos (Silva *et al.*, 2006).

Considerados os nossos achados bem como os dados da literatura, sugerimos que a qualidade lipídica da dieta, independentemente da quantidade deste macronutriente, oferecido durante os períodos de crescimento e desenvolvimento orgânicos, pode contribuir para uma maior adiposidade em etapas posteriores da vida.

Em nossas dietas experimentais, os percentuais de ácidos graxos poliinsaturados das séries n-6 e n-3 e de ácidos graxos *trans* variaram em função do percentual da fonte lipídica específica adicionada à dieta, normolipídica, à base de caseína. Constatamos a presença de ácidos graxos *trans* em nossas dietas confeccionadas com gordura vegetal hidrogenada, conforme pressuposto. Nas dietas confeccionadas com óleo de soja, os ácidos graxos essenciais apresentaram-se em maior quantidade e o principal representante foi o ácido linoléico (C18:2 n-6). Na dieta com óleo de peixe foi detectada a presença dos ácidos graxos de cadeia longa da série n-3, eicosapentaenóico (C20:5 n-3) e docosahexaenóico (C22:6 n-3). Convém ressaltar a ausência desses AGPICL (EPA e DHA) nas demais dietas utilizadas no presente estudo (tabela 3). Estes resultados assemelham-se àqueles já descritos na literatura, nos quais também foi realizada a análise cromatográfica da distribuição percentual de AG das dietas manipuladas utilizadas em seus ensaios experimentais, com fontes lipídicas alimentares de natureza semelhante às utilizadas em nosso estudo (Albuquerque *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Mizurini, 2006). A identificação e distribuição característica destes AGs nas diferentes dietas manipuladas, respaldam a aplicabilidade do protocolo experimental eleito, no sentido da garantia da oferta de fontes de AGs específicos.

Corroborando o aspecto supracitado, o tipo e a quantidade de ácidos graxos, presentes nos lipídeos plasmáticos dos animais estudados, refletiram o perfil de distribuição de AG de suas respectivas dietas (tabelas 3 e 4). De fato, após 120 dias de consumo de fontes dietéticas

de AGs específicos, encontramos no plasma dos animais GP, os maiores valores percentuais dos AGPICL da série n-3 EPA e DHA. Antagonicamente ao que se observou nos animais GS, o grupo GP apresentou, no plasma, redução significativa no percentual de AGPI da série n-6, principalmente de AA e de ácido linoléico. O grupo que recebeu gordura hidrogenada como fonte lipídica foi o único a apresentar acúmulo de ácidos graxos *trans* nos lipídeos plasmáticos. Estes achados são indicativos de que a ingestão dietética de AG estruturalmente distintos promove modificações no perfil lipídico sistêmico, as quais refletem o seu consumo.

Há evidências de que indivíduos que consomem dietas ricas em ácidos graxos polinsaturados e em ácidos graxos *trans* apresentam maior percentual destes AGs depositados em seus tecidos adiposos (Baylin *et al.*, 2002). Estudos envolvendo animais de experimentação também confirmam que o perfil de distribuição de lipídeos dietéticos determina a composição de AG no tecido adiposo bem como nos fosfolipídeos de membranas (Fickova *et al.*, 1998), mostrando que as concentrações dos AGs depositados no tecido adiposo branco visceral são, em geral, proporcionais à composição da dieta (Silva *et al.*, 2006; Arab, 2003; Sabarense, 2003). No presente estudo também verificou-se que a composição relativa de AG do tecido adiposo branco retroperitoneal refletiu, em grande parte, o conteúdo de AG das dietas experimentais, na medida em que aqueles AG encontrados em maior proporção nas dietas de diferentes bases lipídicas, também apresentaram-se em maior proporção no tecido adiposo dos animais tratados (tabelas 3 e 5). A incorporação dos ácidos graxos *trans* no TABR dos animais GPVH constitui indicador preciso da utilização tecidual de AG de origem dietética, uma vez que estes AGs não são sintetizados pelos animais não ruminantes. Esta deposição pode estar relacionada à característica deste tecido de servir como reservatório de energia na forma de triglicerídeos (Sabarense, 2003).

A menor razão AA/EPA, tanto no plasma como no tecido adiposo branco retroperitoneal, foi definida para o grupo GP, que recebeu dieta rica em AGPICL da série n-3

(tabelas 4 e 5). Segundo Simopoulos (2006, 2002b), elevação na razão AGPI n-6/n-3, associa-se fortemente a distintas alterações metabólicas promovendo o desenvolvimento de DCNTs. De outro modo, um aumento nas concentrações de AGPI da série n-3, reduzindo aquela razão, produz efeitos benéficos na prevenção destas enfermidades em indivíduos. Ainda de acordo com este autor, a razão AGPI n-6/n-3 ideal pode variar entre 1-2/1 e, as dietas ocidentais, na atualidade, caracterizam-se por apresentar razão entre estes AGPI que se aproximam de 15-20/1 (Simopoulos, 2006; Simopoulos 2002b). Não encontramos na literatura informações acerca da existência de um valor ideal específico para roedores.

Considerados os parâmetros bioquímicos plasmáticos relacionados ao metabolismo lipídico, nossos resultados mostraram que a ingestão de diferentes fontes lipídicas pode ser um importante modulador do perfil de lipoproteínas circulantes. Os animais que receberam dieta com óleo de peixe apresentaram as menores concentrações de triglicerídeos e colesterol total. Embora as concentrações plasmáticas de HDL-c tenham se mostrado reduzidas nestes animais, a razão CT/HDL-c revelou a inexistência de diferença significativa em relação aos animais que receberam dieta com óleo de soja (tabela 6).

De acordo com Din e colaboradores (2004), o efeito mais característico dos AGPI da série n-3 no perfil lipoprotéico constitui na redução, dose dependente, das concentrações sanguíneas de triglicerídeos (Din *et al.*, 2004). Há evidências indicativas de que os AGPI n-3 reduzem as concentrações de triglicerídeos através da redução na produção endógena de VLDL-c (Baker e Gibbons, 2000), o que poderia justificar, parcialmente, a redução da resposta lipêmica pós-prandial após a ingestão desse tipo de AG (Sutherland, 2002). Também é possível que este efeito resulte da supressão da transcrição de genes de enzimas lipogênicas e do aumento concomitante da oxidação de AG (Jump e Clarke, 1999).

Halvorsen e colaboradores (2001) demonstraram que, em modelos animais, a administração de óleo de peixe estimulou a β oxidação mitocondrial e peroxissomal,

contribuindo para o efeito hipolipemiante da ingestão de AGPI n-3 (Halvorsen *et al.*, 2001). Adicionalmente, Peyron-Caso e colaboradores (2003) encontraram redução no tecido adiposo visceral de animais que receberam dieta rica em óleo de peixe (Peyron-Caso *et al.*, 2003). No presente estudo, também foi verificado redução na quantidade de tecido adiposo branco retroperitoneal (dados não demonstrados) nos animais GP, possivelmente devido à diminuição das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e/ou aumento na oxidação de AGs em detrimento a menor reesterificação (Ukropec *et al.*, 2003; Drevon, 2005). Também é possível que as menores concentrações de AGNE e glicerol, encontradas no plasma dos animais que receberam dieta com óleo de peixe, comparadas as dos animais GS e GVPH, reflitam, em parte, a menor deposição de TG no tecido adiposo (tabela 6).

O efeito hipocolesterolêmico dos AGPI da série n-3, identificado nos animais GP, pode ser atribuído, entre outros fatores, à redução da taxa de formação da LDL-colesterol, pois tanto o EPA quanto o DHA seriam eficazes em estimular a atividade do seu receptor no tecido hepático, contribuindo ainda mais para a redução das concentrações de LDL-colesterol (Spady, 1999).

A significativa elevação na razão CT/HDL-c, verificada entre os animais que receberam gordura hidrogenada como fonte lipídica, comparada aos valores respectivos aos animais GS e GP, sugere que, de fato, os animais GVPH apresentaram o menor conteúdo relativo de HDL-c plasmática dentre grupos estudados, apesar da igualdade estatística dos teores desta lipoproteína em relação ao GS (tabela 6). Denke (1995) já havia descrito que o consumo de gordura vegetal hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, promove diminuição da HDL-colesterol. Embora o exato mecanismo, através do qual os ácidos graxos *trans* modifica a concentração de lipídeos circulantes não esteja totalmente esclarecido, alguns autores sugerem que estes isômeros promovem aumento da atividade da enzima responsável

pela transferência de ésteres de colesterol (CETP, proteína transferidora de éster de colesterol) da HDL-colesterol para a LDL-colesterol e VLDL-colesterol (Gatto *et al.*, 2001).

A associação entre os indícios do menor ganho de massa corporal entre os nossos animais adultos que consumiram dieta com óleo de peixe (figura 6) e as concentrações reduzidas de TG e AGNE no seu plasma (tabela 6), permitem-nos sugerir uma ação protetora dos AGPI da série n-3 na prevenção do diabetes tipo II, tendo em vista que há evidências de que alterações metabólicas, como elevações crônicas nas concentrações plasmáticas de AGNE e TG, principalmente associadas às dietas hiperlipídicas, constituem o primeiro passo para a perda da sensibilidade periférica à insulina e diminuição da resposta insulínica à glicose (Chicco *et al.*, 2003). A análise global destes dados corrobora a hipótese de que o consumo de AGPI da série n-3 influencia favoravelmente a dinâmica das lipoproteínas.

A insulina constitui hormônio pancreático que exerce efeitos periféricos sobre processos metabólicos de natureza anabólica nas espécies mamíferas, dentre estes, a captação de glicose, a síntese de glicogênio muscular e hepático e a síntese de triglicerídeos no tecido adiposo. Resistência à insulina pode ser definida como uma diminuição da resposta de diferentes tecidos ao hormônio, condição fortemente associada ao aparecimento do diabetes tipo II (Ferranini *et al.*, 1999). Com relação a este parâmetro hormonal, nossos resultados mostraram que o grupo que recebeu dieta rica em ácido graxo *trans*, apresentou a maior concentração plasmática de insulina bem como a maior razão insulina/glicose, quando comparados os mesmos resultados relativos aos animais GS e GP, cujas dietas continham quantidades expressivas de AGPI. Os animais GVPH apresentaram ainda aumento significativo na glicemia plasmática frente ao grupo que recebeu óleo de peixe como fonte lipídica da dieta (tabela 6).

A literatura concernente ao efeito dos ácidos graxos *trans* sobre a homeostase glicêmica não é consensual. Desde o reconhecimento da ação dos ácidos graxos *trans* sobre a

fluidez das membranas celulares, credita-se a estes lipídeos efeitos adversos sobre a ação da insulina e de seus receptores, traduzindo-se em risco para o desenvolvimento da resistência insulínica (Saravanan *et al.*, 2005). Entre indivíduos diabéticos do tipo II ou resistentes à insulina, com consumo elevado de GH, observa-se alteração mais acentuada na sensibilidade à insulina (Christiansen *et al.*, 1997). Em contrapartida, estudos de intervenção não têm demonstrado uma relação significativa entre a ingestão destes AG e a perda da sensibilidade à insulina, em indivíduos saudáveis e magros (Lovejoy *et al.*, 2002; Louheranta *et al.*, 1999). Risérus (2006), em recente revisão sobre o tema, relata que a inconsistência nos estudos capazes de demonstrar associação entre os ácidos graxos *trans* e a resistência insulínica pode ser também decorrente de limitações metodológicas, tais como estudos de curta duração, reduzido número amostral, modelos experimentais diferenciados, incluindo a utilização de distintas quantidades e tipos de ácidos graxos *trans*.

Atualmente, os ácidos graxos *trans* estão sendo associados à presença de marcadores sistêmicos inflamatórios, de modo que têm sido considerados pró-inflamatórios. Foi sugerido que este efeito provocado pela ingestão destes AGs pode ser parcialmente mediado pelo tecido adiposo (Mozaffarian *et al.*, 2006). De fato, o tecido adiposo é um órgão que secreta adipocinas, relacionadas a distintos processos metabólicos, incluindo a resposta inflamatória orgânica, além da sensibilidade à insulina, adiposidade, dentre outros (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006; Grundy, 2006). Dentre as adipocinas relacionadas aos referidos processos metabólicos, destacam-se: a resistina, o TNF α , a adiponectina e a leptina, cujas expressões gênicas foram determinadas no tecido adiposo branco retroperitoneal dos animais adultos submetidos ao nosso protocolo experimental.

Maior expressão de RNAm de resistina e de TNF α foi verificada no TABR dos animais GVPH, comparadas às determinadas no tecido adiposo dos animais GS e GP (figuras 7 e 8), sugerindo a possibilidade de prejuízos para a sensibilidade à insulina, o metabolismo

lipídico e a adiposidade. Outros autores também encontraram associação entre o consumo de AG *trans* e o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , embora analisando o conteúdo plasmático desta adipocina (Mozaffarian *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2002). Essa associação pode representar um novo caminho para a compreensão dos efeitos dos ácidos graxos *trans* sobre o risco do desenvolvimento de DCNT, tais como as doenças cardiovasculares e diabetes. De todo o modo, é importante ressaltar a disparidade, por vezes existente, entre a expressão de genes referentes às adipocinas e a respectiva expressão e atividade de suas proteínas correspondentes, secretadas pelo tecido adiposo, como recentemente foi indicado (Fain *et al.*, 2004).

Têm sido sugeridos possíveis mecanismos através dos quais, o TNF α poderia afetar a sensibilidade à insulina, descreve-se dentre eles: a regulação de genes e proteínas importantes para a cascata de sinalização insulínica, a estimulação da lipólise, induzindo ao aumento na liberação dos AGNE e a regulação negativa de PPAR γ , receptor nuclear relacionado a melhoria da sensibilidade à insulina (Borst, 2004). De outro modo, a expressão de RNAm e a secreção de TNF α encontram-se elevadas em animais e humanos obesos, correlacionando-se positivamente com o aumento do volume das células adiposas em todos os depósitos de gordura corporal (Hotamisligil, 2000).

A resistina, considerada por alguns autores como um marcador subclínico de inflamação, correlaciona-se fortemente com outras citocinas como a proteína C reativa e o TNF α (Yaturu *et al.*, 2006). Recentemente foi demonstrado que a resistina reduziu a expressão de genes responsáveis pela adipogênese, como o fator de transcrição PPAR γ , além de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e reduzir a resposta à insulina pelos transportadores de glicose, sugerindo-se para esta adipocina, uma nova função como um fator autócrino e parácrino que afeta o processo inflamatório e a sensibilidade insulínica no tecido adiposo (Fu *et al.*, 2006). Há dados sugestivos de que a resistina promova resistência

insulínica por meio do aumento da glicogênese hepática, exercendo rápido efeito sobre este tecido (Rajala *et al.*, 2003). Também foi demonstrado, em cultura de adipócitos, que os AGPIs reduzem a expressão de resistina, sugerindo-se que os efeitos benéficos da ingestão destes AGs na sensibilidade à insulina poderiam ser explicados, em parte, por esse mecanismo (Haugen *et al.*, 2005). Cabe ressaltar, entretanto, que ainda não há clareza acerca do envolvimento da resistina na sinalização insulínica (Ukkola, 2002). De todo o modo, também se encontra na literatura relato de que, assim como em nosso estudo, os ácidos graxos *trans* induziram maior expressão de resistina (Saravanan *et al.*, 2005). Embora seja importante ressaltar que o estudo citado utilizou para as análises o tecido adiposo branco epididimal e uma dieta com 10% de fonte lipídica durante três meses, comparando a ingestão de ácidos graxos *trans* com outros grupos contendo ácido graxo saturado e poliinsaturado da série n-6 como base lipídica.

Tanto resistina quanto TNF α estão envolvidos no processo inflamatório da aterogênese. Participam da migração de monócitos e da sua conversão em macrófagos, na parede endotelial, por meio da transcrição do NF κ B, que modula uma série de reações inflamatórias no tecido vascular, como a expressão da molécula de adesão na superfície das células endoteliais e musculares lisas (Kawanami *et al.*, 2004; Lyon *et al.*, 2003).

Em contraste às ações das demais adipocinas, a expressão de adiponectina constitui processo relacionado à proteção contra a obesidade, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares (Hotta *et al.*, 2000) e, portanto, a investigação a seu respeito vem merecendo intensa atenção. Este hormônio apresenta elevada expressão pelos adipócitos e exerce uma variedade de efeitos benéficos ao organismo incluindo funções antiaterogênicas e anti-inflamatórias, além de favorecer a sensibilidade a insulina (Abbasi *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2003; Weyer *et al.*, 2001). No presente estudo, o grupo que recebeu dieta rica em gordura hidrogenada mostrou menor expressão do gene referente à adiponectina no TABR quando

comparado aos grupos GS e GP (figura 9). Apesar do parcial conhecimento acerca dos mecanismos de atuação desta adipocina, a existência de teores circulantes reduzidos de adiponectina entre indivíduos com enfermidades metabólicas e vasculares, sugere que hipoadiponectinemia pode ser um importante fator favorecedor destas alterações (Matsuzawa, 2005). Neste sentido tem sido apontado como um hormônio capaz de reduzir a resistência insulínica e o risco de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos e obesos (Fruebis *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001).

Em recente investigação foi demonstrado que dietas ricas em óleo de peixe, fonte de AGPICL da série n-3, induzem maior expressão e concentração plasmática de adiponectina, via mecanismo dependente de PPAR γ (Neschen *et al.*, 2006). Nossos resultados também mostraram maior expressão de adiponectina e de PPAR γ no tecido adiposo daqueles animais alimentados com dieta rica em óleo de peixe, reforçando o reconhecimento da inter-relação entre estas proteínas.

A leptina, primeira e uma das mais caracterizadas proteínas secretadas pelos adipócitos, é responsável por importantes efeitos na regulação da ingestão alimentar, gasto energético e função neuroendócrina. Normalmente apresenta-se aumentada na obesidade e, possivelmente, afeta a sensibilidade à insulina (Margetic *et al.*, 2002). Considerando o papel fundamental dos AGs no metabolismo energético, bem como a importância da leptina na regulação da massa corporal, buscamos examinar o efeito de diferentes fontes lipídicas dietéticas sobre a expressão do gene responsável pela formação de leptina no tecido adiposo. Nossos resultados não mostraram alterações na expressão de leptina no grupo GVPH, quando comparado ao grupo GS (Figura 10). É possível que este resultado reflita a menor expressão desta adipocina no tecido adiposo retroperitoneal. A literatura refere menor expressão de leptina no tecido adiposo visceral, no entanto, também é sabido que a sua liberação é proporcional ao tamanho da massa do tecido adiposo (Maffei *et al.*, 1995). Assim, é possível

que a menor expressão desta adipocina no TABR do grupo de animais alimentados com dieta confeccionada com óleo de peixe, quando comparada à expressão relativa aos animais GS e GVPH, justifique-se pelo fato daquele grupo apresentar massa adiposa mais reduzida, na medida em que a partir da décima quinta semana de vida estes animais também passaram a apresentar menor massa corporal (figuras 6 e 10). Raclot e colaboradores (1997) e Ukropec e colaboradores (2003) mostraram resultados semelhantes além de também verificarem correlação positiva entre o tamanho do adipócito e a expressão de leptina, sugerindo uma ação reguladora dos AGPI da série n-3 na massa de tecido adiposo (Raclot *et al.*, 1997), já que esses ácidos graxos também estão relacionados com uma redução na síntese e/ou um aumento na oxidação lipídica (Ukropec *et al.*, 2003). Referências adicionais já demonstraram que a utilização de dietas ricas em AGPICL da série n-3 reduz a expressão de leptina *in vivo* e *in vitro* (Reseland *et al.*, 2001). A ingestão de dieta normolipídica, rica em AGPI n-3 também promoveu redução da expressão do gene referente à leptina pelo tecido adiposo. Esta redução não foi acompanhada por reduções nas concentrações plasmáticas do hormônio, quando foram comparados estes resultados com os do grupo que recebeu dieta rica em AGS (Drevon, 2005). Adicionalmente, merece ressalva o reconhecimento de que a expressão e as concentrações plasmáticas de leptina também podem ser alteradas por algumas citocinas, tais como o TNF α e a IL-6 (Mantzoros, 1999), além de por fatores de transcrição, como o PPAR γ os quais agem modulando negativamente a expressão desta adipocina (Kallen e Lazar, 1996).

O fato de que lipídeos interagem com inúmeros fatores de transcrição, regulando diretamente a expressão de diferentes genes, pode constituir base molecular capaz de justificar a forte associação verificada entre alterações na composição de ácidos graxos consumidos e o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina (Roche, 2004; Clarke, 2000).

Considerada esta hipótese, no presente estudo, a ingestão de dieta rica em AGPICL da série n-3 promoveu aumento da expressão de PPAR γ pelo tecido adiposo branco

retroperitoneal dos animais GP, maior do que o verificado no TABR do grupo de animais que recebeu dieta rica em óleo de soja, fonte de AGPI da série n-6 (figura 11). Em 1997, Kliewer e colaboradores já haviam demonstrado que o PPAR γ pode ser ativado por ligantes endógenos como os AGPI e os seus derivados. Estes autores também sugeriram que esta afinidade do PPAR γ por AGPI pode constituir mecanismo molecular através do qual os AGPI seriam capazes de atuar na prevenção de alterações metabólicas ocorridas nas DCNT (Kliewer *et al.*, 1997). Há referências adicionais indicativas de que os AGPICL da série n-3, principalmente o EPA, são potentes ativadores de PPAR γ 2 no tecido adiposo branco. A expressão de PPAR γ 2 resulta na remodelação do tecido adiposo em animais adultos, favorecendo a sensibilidade à insulina e uma coordenada ativação de inúmeros genes de hormônios, citocinas e enzimas envolvidas no metabolismo dos adipócitos (Lombardo e Chicco, 2006; Willson *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 1997). Adicionalmente, a expressão de PPAR γ 2 inibe a ativação de NF κ B, fator de transcrição responsável pela transcrição de mediadores pró-inflamatórios (Zhao *et al.*, 2004). Assim, os AGPI da série n-3 além de promoverem efeito anti-inflamatório, através de competição pela inibição de eicosanóides produzidos pelos AGPI da série n-6, também atuam no processo inflamatório via ativação de PPAR γ (Delarue, 2001).

Saravanan e colaboradores (2005), estudando os efeitos do consumo de dieta rica em ácidos graxos *trans* sobre a expressão de genes associados à sensibilidade insulínica, sugeriram que um mecanismo potencial capaz de justificar a associação destes AG com a resistência à insulina poderia ser através da expressão reduzida de PPAR γ no tecido adiposo (Saravanan *et al.*, 2005). Em acordo com esta hipótese, no presente estudo encontramos que os ácidos graxos *trans*, fonte lipídica da dieta oferecida aos animais GVPH, promoveram o menor efeito como ativador da expressão daquele fator de transcrição, quando comparados aos efeitos dos AGPI das séries n-6 e n-3, fontes lipídicas das dietas oferecidas aos animais GS e GP, respectivamente (figura 11).

Considerando-se que a ingestão de diferentes fontes lipídicas pode alterar a expressão de genes relacionados à função endócrina do tecido adiposo, nos interessou investigar a existência de associações entre os diferentes resultados de expressão dos genes avaliados no TABR de um mesmo grupo experimental. Nossos resultados mostraram que aos 120 dias de vida, o grupo que recebeu óleo de soja como fonte lipídica da dieta, apresentou uma associação positiva entre o PPAR γ e a leptina. Associações distintas com o receptor foram encontradas no grupo que recebeu dieta rica em ácidos graxos *trans*, verificando-se associação negativa entre PPAR γ e TNF α , além de positiva com a adiponectina (tabela 7). Cita-se que a modulação de adipocinas como TNF α , leptina e adiponectina pelos agonistas de PPAR γ como os ácidos graxos poliinsaturados ou as tiazolidinedionas (TZDs) constitui mecanismo de ação potencial destes ligantes, destinado a promover a melhoria da sensibilidade a insulina e restabelecer a homeostase metabólica em indivíduos (Guri *et al.*, 2006; Rangwala e Lazar, 2004). De outro modo, Auwerx (1999) sugeriu que a ativação de PPAR γ não favorece a diferenciação de adipócitos, exclusivamente por alterar o metabolismo destas células, mas também afeta a resposta endócrina, parácrina e autócrina do tecido adiposo.

Ainda no grupo que recebeu gordura hidrogenada foi encontrada correlação negativa entre adiponectina e resistina (tabela 7). A literatura refere, dentre outros efeitos positivos para a saúde orgânica, a habilidade da adiponectina circulante em proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose bem como também sugere o envolvimento da adipocina na regulação central da homeostase energética, promovendo redução da massa corporal (Funahashi *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2004). De outro modo, o papel da resistina, adipocina encontrada em regiões de inflamação, permanece por ser esclarecido, existindo dados descritivos de associação positiva entre resistina, obesidade e diabetes, ainda que controversos (Steppan e Lazar, 2004; Gomez-

Ambrosi e Fruhbeck, 2001). Consideradas estas informações, é possível supor que a correlação negativa verificada no grupo GVPH reflete os supostos efeitos antagônicos exercidos por estas adipocinas no metabolismo. Sendo assim, nossos resultados mostraram que aos 120 dias de vida, a ingestão de ácidos graxos *trans*, exerceu uma maior influência em estabelecer correlações entre a expressão dos genes estudados, comparado aos demais ácidos graxos incluídos no estudo.

Destacamos assim, que a ingestão de gordura hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, bem como de óleo de peixe, rico em AGPI de cadeia longa da série n-3 e óleo de soja, rico em AGPI da série n-6 ao longo da vida, favoreceu modificações na expressão de adipocinas e de fatores de transcrição como PPAR γ pelo tecido adiposo branco retroperitoneal. Estas modificações podem estar relacionadas entre si e ao risco aumentado de complicações sistêmicas envolvendo processos inflamatórios, resistência à insulina, alterações da massa adiposa - fatores de risco relacionados ao estabelecimento de doenças crônicas não transmissíveis.

O consumo de dietas isocalóricas e normolipídicas, contendo diferentes fontes lipídicas alimentares (gordura vegetal parcialmente hidrogenada, óleo de peixe ou óleo de soja), oferecidas desde a concepção até a fase adulta, promoveu nos filhotes machos:

- menor consumo de dieta até a sétima semana de vida (cerca de 45 dias) no grupo que recebeu dieta a base de gordura vegetal hidrogenada. A partir desse período e até o 120º dia de vida dos animais (décima sétima semana), os grupos não apresentaram diferenças significativas no padrão alimentar.
- maior ganho de massa corporal após o primeiro mês de vida e até a décima quarta semana de vida (cerca de 95 dias) nos animais que receberam dieta com gordura vegetal hidrogenada. A partir desse período e até o 120º dia de vida dos animais (décima sétima semana), os animais que receberam uma dieta a base de óleo de peixe apresentaram redução da massa corporal, em relação aos animais alimentados com dieta à base de gordura vegetal hidrogenada.
- menor percentual plasmático e incorporação pelo tecido adiposo visceral no total de ácidos graxos poliinsaturados no grupo que recebeu uma dieta à base de gordura hidrogenada. Com relação aos outros grupos, o grupo óleo de soja apresentou o maior percentual no plasma e no tecido adiposo de ácidos graxos poliinsaturados da série n6, enquanto o grupo óleo de peixe apresentou o maior percentual de ácidos graxos de cadeia longa da série n3, além de uma menor relação AA/EPA. O grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada foi o único que apresentou um percentual plasmático e incorporação no tecido adiposo de ácidos graxos *trans*.

- menor concentração plasmática de triglicerídeo, colesterol total, HDL-c, ácido graxo não esterificado, glicerol e glicose no grupo que recebeu dieta à base de óleo de peixe. O grupo que recebeu gordura vegetal hidrogenada como fonte lipídica dietética apresentou uma maior relação CT/HDL-c e insulina/glicose, além de uma maior concentração plasmática de insulina em jejum.
- maior expressão gênica de resistina e TNF α , bem como menor de adiponectina e PPAR γ pelo tecido adiposo branco retroperitoneal do grupo que recebeu dieta à base de gordura hidrogenada. Os animais do grupo óleo de peixe apresentaram maior expressão gênica de PPAR γ e menor de leptina comparado aos outros dois grupos.
- correlação positiva entre PPAR γ e leptina no TABR do grupo que recebeu dieta à base de óleo de soja enquanto o grupo que recebeu gordura hidrogenada apresentou correlação negativa de PPAR γ ao TNF α e positiva em relação a adiponectina, além de correlacionar negativamente resistina à adiponectina no tecido estudado.

O consumo de ácidos graxos *trans*, demonstra exercer um efeito desfavorável na sensibilidade insulínica, além de favorecer o aumento da massa corporal e de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente os de cadeia longa da série n3, demonstra exercer um efeito favorável na sensibilidade insulínica, além de promover redução da massa corporal e a expressão de genes relacionados a processos antiinflamatórios. Assim, esses dados sugerem que o tipo de ácido graxo dietético, oferecido desde o período perinatal, pode afetar a função endócrina do tecido adiposo com repercussões no metabolismo energético em ratos.

Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM, et al. Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes*. 2004; 53: 585-590.

Abe M, Saito M, Shimizu T. Neuropeptide Y and norepinephrine injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus activate endocrine pancreas. *Biomed Res*. 1989; 10:431-6.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2000a; 11(88): 327-332.

Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000b; 62: 413 – 37.

Ahren B, Havel PJ. Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol*. 1999; 277: 959–66.

Ailhaud G, Guesnet P. Fatty acid composition of fats is early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *The international association for the study of obesity. Obes Rev*. 2004; 5: 21-26.

Albuquerque KT, Sardinha FLC, Telles MM, Watanabe RC, Nascimento CM, Tavares do Carmo MG, et al. Intake of trans fatty acid rich in hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. *Nutrition*. 2006; 22 (7-8): 820-829.

Arab L. Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr*. 2003; 133: 925–932.

Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; 14(3): 137-45.

Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*. 1999; 42: 1033-1049.

Baker PW, Gibbons GF. Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin. *J Lipid Res*. 2000; 41: 719–26.

Barker DJP. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull*. 2001; 60: 69-88.

Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76: 750–7.

Beare-Rogers JL. Trans positional isomers of common fatty acids. *Adv Nutr Res*. 1988; 5: 171-200.

Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13: 84-9.

Bertolino CN, Castro TG, Sartorelli DS, Ferreira SR, Cardoso MA. Dietary trans fatty acid intake and serum lipid profile in Japanese-Brazilians in Bauru, São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2006; 22(2): 357-364.

Bjorntorp P. Abdominal fat distribution and disease: an overview of epidemiological data. *Ann Med.* 1992; 24: 15-18.

Borst SE. The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine.* 2004; 23: 177-182.

Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr.* 2002; 132 (9): 2488-91.

Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav.* 2004; 83 (4): 549-55.

Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61 (3): 345-358.

Chan DC, Watts GF, Sussekov AV, Hugh P, Barrett R, Yang Z, et al. Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese caucasian men. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2004; 63: 77-85.

Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr.* 2003; 133: 127-33.

Chopra M, Galbraith S, Darnton Hill. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bulletin of the World Health Organization.* 2002; 80 (12): 952-958.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162 (1): 156 -159.

Christiansen E, Schnider S, Palmvig B, Tauber-Lassen E, Pedersen O. Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. *Diabetes Care.* 1997; 20: 881-887.

Clarke SD. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 13-18.

Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.* 2001; 131: 1129-1132.

Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition.* 2000; 83 (1): 59-66.

- Clement K. Leptin and the genetics of obesity. *Acta Paediatr Suppl.* 1999; 88:51–7.
- Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60: 349-56.
- Cooke JP, Oka RK. Does leptin cause vascular disease? *Circulation.* 2002; 106: 1904-1905.
- Das UN. Long-chain Polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition.* 2003; 19(1): 62-65.
- Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acids and diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75 (4): 780-1.
- Daynes AR, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 748-759.
- Delarue J. Polyunsaturated fatty acid and inflammation. *Nutritin Clinique et Metabolisme.* 2001; 15 (3): 172-176.
- De Roos NM, Bots ML, Katan MB. Replacement of dietary saturated fatty acids by trans fatty acids lowers serum HDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1233–7.
- DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72 (4): 905-11.
- Denke MA. Trans fatty acids and coronary heart disease risk: serum lipid concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62: 693-700.
- Després JP. Abdominal obesity: the most prevalent cause of the metabolic syndrome and related cardiometabolic risk. *European Heart Journal Supplements.* 2006; 8: 4–12.
- Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *Br Med J.* 2004; 328: 30-5.
- Dlouhy P, Tvrzicka E, Stankova B, Vecka M, Zak A, Straka Z, et al. Higher content of 18:1 trans fatty acids in subcutaneous fat of persons with coronarographically documented atherosclerosis of the coronary arteries. *Ann Nutr Metab.* 2003; 47(6): 302-5.
- Drevon CA. Fatty acids and expression of adipokines. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005; 1740 (2): 287-92.
- Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1500: 88-96.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005; 16 (22): 1415-28.

Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004; 10(4): 355-6.

Fain JN, Madan AK, Hiler MC, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; 145: 2273-2282.

Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, Tcell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002; 110: 1093-103.

Farrel RE. *RNA Methodologies: a laboratory guide for isolation and characterisation*. Academic Press. 1993.

Ferrannini E, Galvan AQ, Gastaldelli A, Camastra S, Sironi AM, Toschi E, et al. Insulin: new roles for an ancient hormone. *Eur J Clin Inv*. 1999; 29: 842-852.

Fickova M, Hubert P, Cremel G, Leray C. Dietary (n-3) and (n-6) Polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J Nutr*. 1998; 128: 512-519.

Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2006; 49 (2): 394-7.

Florencio TT, Ferreira HS, Cavalcante JC, Sawaya AL. Short stature, obesity and arterial hypertension in a very low income population in North-eastern Brazil. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2004; 14 (1): 26-33.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50 (2): 216-229.

Fried SK, Zechner R. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J Lipid Res*. 1989; 30: 1917-1923.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98: 2005-2010.

Fruhbeck G, Ambrosi JG, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280: 827-847.

Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition & Metabolism*. 2006, 3: 28.

Funahashi T, Matsuzawa Y, Kihara S. Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome Insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. International Congress Series. 2004; 1262: 368-71.

Gatto LM, Lyons MA, Brown AJ, Samman S. Trans fatty acids cholesterol metabolism : mechanism studies in rats and rabbits fed semipurified diets. Int J Food Sci Nutr. 2001; 52: 435-441.

Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, Lu M, et al. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. Endocrinology. 2002; 143(6): 2106-18.

Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G. Do resistin and resistin-like molecules also link obesity to inflammatory diseases? Ann Intern Med. 2001; 135: 306-7.

Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci. 1992; 89(10): 4653-7.

Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. Am J Clin Nut. 2006, 83 (2): 461-465.

Grubb SR. Where obesity goes, so goes diabetes – dual epidemics of alarming proportions. West Virginia Medical Journal. 2002; 98 (6): 268-270.

Grundey SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. Nat Rev. 2006; 5: 295-309.

Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. Diabetes Metab. 2004; 30(1): 13-9.

Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005; 19 (4): 501–523.

Guri AJ, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptors: Bridging metabolic syndrome with molecular nutrition. Clin Nutr. 2006; 25(6): 871-85.

Haffner S, Taegtmeyer H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. Circulation. 2003; 108: 1541-1545.

Halaas JL, Gajiwala KL, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the ob gene. Science. 1995; 269: 543-6.

Halvorsen B, Rustan AC, Madsen L, Reseland J, Berge RK, Sletnes P, et al. Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. Ann Nutr Metab. 2001; 45: 30 – 37.

Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2002; 43: 445–452.

Haugen F, Zahid N, Dalen KT, Hollung K, Nebb HI, Drevon CA. Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *J Lipid Res.* 2005; 46: 143–153.

Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav.* 2004; 83 (4): 653-8.

Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001; 2 (4): 239-54.

Hirsch J. Studies of adipose tissue in man; a microtechnic for sampling and analysis. *Am J Clin Nutr.* 1960; 8: 499-511.

Honstra G. Dietary fats, prostanoids and arterial thrombosis. In: *Biochemical physiology of dietary fats.* Boston: Martinus Nijhoff Publishers. 1982; 15-29.

Honstra G. Essential fatty acids in mother and their neonates. *Am J Nutr.* 2000; 71: 126-9.

Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24: 23-27.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1595–1599.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1997; 337 (21): 1491-1499.

Ibrahim A, Natrajan S, Ghafoorunissa R. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism.* 2005; 54(2): 240-6.

Innis SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr.* 2003; 143 (4): 1-8.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro; 2004.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res.* 2002; 10: 1-5.

Jiménez J, Boza J, Suárez MD, Gil A. The effect of a formula supplemented with n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids on plasma phospholipid, liver microsomal, retinal and brain fatty acid composition in neonatal piglets. *Nutri Biochem.* 1997; 8(4): 217-223.

Jones PJ. Effect of fatty acid composition of dietary fat on energy balance and expenditure in hamster. *Can J Physiol Pharmacol*. 1989; 67 (9): 994-8.

Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19: 63–90.

Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (Ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 5793– 5796.

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314: 415-9.

Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor alpha expression. *Diabetes*. 2003; 52: 1779–85.

King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1281-1225.

Khan SA, Heuvel JPV. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *J Nutr Biochem*. 2003; 14: 554-567.

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94: 4318–4323.

Konig D, Berg AC, Weinstock C, Keul J, Northoff H. Essential fatty acids, immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 1997; 3: 1-31.

Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, et al. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1533-1540.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000; 404: 635–643.

Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005; 51(2): 85-94.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4 (5): 371-9.

Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipid in one-step reaction. *J Lip Res*. 1986; 27: 114-120.

Lichtenstein AH. Trans fatty acid and hydrogenated fats – what do we know? *Nutrition Today*. 1995; 30 (3).

Lochsen T, Ormstad H, Braud H, Brodal B, Christiansen EN, Osmundsen H. Effects of fish oil and n-3 fatty acids on the regulation of $\Delta 9$ fatty acid desaturase mRNA and activity in rat liver. *J Nutr Biochem*. 1997; 8: 408-13.

Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 1–13.

Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Staupfer MJ, Willett WC. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr*. 2005; 135: 562-6.

Louheranta AM, Turpeinen AK, Vidgren HM, Schwab US, Usitupa MI. A high-trans fatty acid diet and insulin sensitivity in young healthy women. *Metabolism*. 1999; 48 : 870–875.

Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, DeLany JP, Bray GB, Lefevre M, et al. Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and women with a range of glucose tolerance. *Metabolism*. 2001; 50 (1): 86-92.

Lyon CJ, Law RE, Hsueh W. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*. 2003;144(6): 2195-200.

Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1740: 266-286.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentration of adiponectin, an adipose derived protein. *Diabetes*. 2001; 50: 2094-2099.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and Ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nature Med*. 1995;1:1155-1161.

Maffei M, Stoffel M, Barone M, Moon B, Dammerman M, Ravussin E, et al. Absence of mutations in the human ob gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes*. 1996; 45: 679-82.

Mahan LK, Scott-Stump S. Alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca 1998; 1179.

Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89 (3): 1102-7.

Mantzoros ECS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current. *Ann Intern Med*. 1999; 130: 671-680.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26: 1407–33.

Marin P, Darin N, Amemiya T, Andersson B, Jern S, Bjorntorp P. Cortisol secretion in relation to body fat distribution in obese premenopausal women. *Metabolism*. 1992; 41: 882-886.

Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atherosclerosis Supplements*. 2005; 6: 7–14.

Matthan NR, Cianflone K, Lichtenstein AH, Ausman LM, Jauhiainen M, Jones PJH. Hydrogenated fat consumption affects acylation-stimulating protein levels and cholesterol esterification rates in moderately hypercholesterolemic women. *Journal of Lipid Research* 2001; 42: 1841-1848.

Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(6):2784-91.

Mizurini DM. Influência da fonte lipídica da dieta desde o período perinatal até o envelhecimento sobre a susceptibilidade ao desenvolvimento de acidentes tromboembólicos – estudo em ratos (Dissertação). Instituto de Nutrição Josué de Castro: UFRJ; 2006.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes and obesity related health risk factors. *J Am Med Assoc*. 2003; 289: 76-79.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997; 387: 903-8.

Morin CL, Eckel RH, Marcel T, Pagliassotti MJ. High fat diets elevate tissue-derived tumor necrosis factor- α activity. *Endocrinology*. 1997; 138: 4665–71.

Mozaffarian D. Trans fatty acids - effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler Suppl* 2006; 7(2): 29-32.

Mozaffarian D, Rimm EB, King IB, Lawler RL, McDonald GB, Levy WC. Trans Fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am J Clin Nutr*. 2004a; 80:1521–5.

Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr*. 2004b; 79: 606 –12.

Neschen N, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, et al. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-dependent mechanism in mice. *Diabetes*. 2006; 55: 924-928.

Nielsen MF, Caumo A, Chandramouli V, Schumann WC, Cobelli C, Landau BR, et al. Impaired basal glucose effectiveness but unaltered fasting glucose release and gluconeogenesis during short-term hypercortisolemia in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 286 (1): 102-10.

Nguyen MT, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JJ, et al. JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2005; 280(42): 35361-71.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature*. 1998; 395: 137–143.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Obesidade: prevenindo e controlando a epidemia global. 1ª edição ed. São Paulo, 2000.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Estratégia global para alimentação saudável Atividade Física e Saúde: 57º Assembléia Mundial de Saúde. Genebra; 2004.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999; 100: 2473-6.

Pablo MA, Cienfuegos GA. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunology and Cell Biology*. 2000; 78: 31-39.

Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, et al. Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 83: 8313-8317.

Pedersen A. La fabricación de margarina: tecnología y proceso. *Aceites & Grasas IV*. 1994; 4: 49.

Pena M, Bacallao J. Obesity among the poor: an emerging problem in latin america and the caribbean. *Pan American Health Organization*. 2000; 576: 3-10.

Perdue WC, Stone LA, Gostin LO. The built environment and its relationship to the public's health : the legal framework. *American Journal of Public Health*. 2003; 93 (9): 1390 -1394.

Peyron-Caso E, Quignard-Boulange A, Laromiguiere M, Feing-Knwong-Chan S, Veronese A, Ardouin B, et al. Dietary fish oil increases lipid mobilization but does not decrease lipid storage related enzymes activities in adipose tissue of insulin-resistant, sucrose-fed rats. *J Nutr*. 2003; 133: 2239 –43.

Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29 (9).

Pompéia C. Essencialidade dos ácidos graxos. *Entendendo as gorduras*. 2002; 3: 17-342.

Qi Y, Takahashi N, Hileman S, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004; 10 (5) 524 – 529.

Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferre P. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res*. 1997; 38(10): 1963-72.

Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest.* 2003; 111(2): 225–30.

Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 331–336.

Reeves PG, Neilesen FH, Fahey GC. American Institute of Nutrition (AIN). Purified Rodent Diets. *Jour Nutr.* 1993; 123: 1939-51.

Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA. Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 2001; 42: 743–750.

Rexrode KM, Pradhan A, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. *Ann Epidemiol.* 2003; 13: 1-9.

Risérus U. Trans fatty acids and insulin resistance. *Atherosclerosis Supplements.* 2006; 7(2): 37-9.

Roche HM. Dietary lipids and gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32 (6): 999-1002.

Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282: 657–663.

Rousseau V, Becker DJ, Ongemba LN, Rahier J, Henquin JC, Brichard SM. Developmental and nutritional changes of ob and PPAR γ 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem J.* 1997; 321: 451– 6.

Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : implications for insulin resistance. *Diabetes.* 2002; 51: 3176-88.

Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer, Schneider S. The metabolically obese, normal weight individual revisited. *Diabetes.* 1998; 47: 699-713.

Sabarense CM, Mancini Filho J. Efeito da gordura vegetal parcialmente hidrogenada sobre a incorporação de ácidos graxos trans em tecidos de ratos. *Rev Nutr Campinas.* 2003; 16 (4): 399-407.

Sabarense CM. Avaliação do efeito dos ácidos graxos trans sobre o perfil lipídico dos lipídios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais (Tese). Faculdade de Ciências Farmacêuticas: USP; 2003.

Saldiva SR, Escuder MM, Venancio SI, Benicio MH. Prevalence of obesity in preschool children from five towns in São Paulo State, Brazil. *Cad Sau Pub.* 2004; 20 (6): 1627-32.

San Juan PMF. Study of isomeric trans-fatty acid content in the commercial Spanish foods. *Int J Food Sci Nutr.* 1996; 47(5): 399-403.

Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *European Journal of Endocrinology*. 2005; 153: 159–165.

Savage DB, Sewter CP. Resistin / Fizz3 Expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001; 50: 2199-2202.

Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol*. 1997; 8(3): 159-66.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; 404: 661-671.

Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 670–6.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000; 106: 171–176.

Siddiqui RA, Shaikh SR, Sech LA, Yount HR, Stillwell W, Zaloga GP. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem*. 2004; 4 (8): 859-71.

Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998; 281: 1683-6.

Silva APS, Guimarães DED, Mizurini DM, Maia IC, Ortiz-Costa S, Sardinha FL, et al. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids*. 2006; 41 (6): 1-7.

Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002a; 21(6): 495–505.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of Omega-6/Omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002b; 56: 365-379.

Simopoulos AP, Leaf A, Salem JN. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006; 3: 119–121.

Smidovnick A, Stimac A, Kobe J. Effect of temperature on linoleic acid loss and 18:3 delta 9 cis, delta 12-cis, delta 15-trans formation in soybean oil. *J Am Oil Chem Soc*. 1993; 69: 405-409.

Spady DK. Dietary fatty acids and atherosclerosis regression. *British Journal of Nutrition*. 1999; 82: 337-8.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2003; 361: 226-8.

Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med.* 2004; 255: 439–447.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; 409:307-12.

Stryer, L. *Bioquímica.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996; 1000 p.

Sutherland WHF, Jong AS, Walker RJ, Willians MJA, Skeaff CM, Duncan A, Harper M. Effects of meals rich in heated olive and safflower oils on oxidation of postprandial serum in healthy men. *Atherosclerosis.* 2002; 160: 195-203.

Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhäus W, Stulnig TM. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n–3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia.* 2006; 49: 2109–2119.

Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60: 329-339.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004; 92: 347–355.

Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions.* 2005; 33 (5).

Uauy R, Castillo C. Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. *J Nutr.* 2003; 133: 2962-72.

Ukkola O. Resistin – a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *European Journal of Endocrinology.* 2002; 147: 571–574.

Ukropec J, Reseland JE, Gasperikova D, Demcakova E, Madsen L, Berge RK, et al. The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 fatty acid is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids.* 2003; 38: 1023– 1029.

Vague J. The degree of masculine differentiation of obesity: a factor-determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric acid calculus disease. *Am J Clin Nutr.* 1956; 4: 20-34.

Vessby B. Dietary fat and insulin action in humans. *Br J Nutr.* 2000; 83: 91-96.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003; 112 (12): 1821–1830.

Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.* Rio de Janeiro: Atheneu 2000; 1026p.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews.* 2000; 21 (6): 697-738.

Walczak R, Tontonoz P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPAR γ in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2002; 43: 177–186.

Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC, Mantzoros CS. Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(22): 1688-94.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1796-1808.

Wellman NS, Friedberg B. Causes and consequences of adult obesity: health, social and economic impacts in the United States. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 2002; 11 (Suppl. 8): 705-709.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1930–5.

Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator activated receptor γ and metabolic disease. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 341–67.

World Health Organization (WHO). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Report of a joint WHO / FAO expert consultation. Geneva; 2003 (WHO Technical Report Series 916).

World Health Organization (WHO). Reducing risks, promoting healthy life. The world health report. Geneva; 2002.

Wonsil B, Herbein J, Watkins B. Dietary and ruminally derived trans 18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. *J Nutr.* 1994; 124: 556-565.

Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, et al. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond).* 2002; 103 (2): 137-42.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP activated protein kinase. *Nat Med.* 2002; 8: 1288-95.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001; 7: 941–946.

Yaturu S, Daberry RP, Rains J, Jain S. Resistin and adiponectin levels in subjects with coronary artery disease and type 2 diabetes. *Cytokine.* 2006; 34: 219–223.

Yildiz BO, Haznedaroglu IC. Rethinking leptin and insulin action: therapeutic opportunities for diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38 (5-6): 820-830.

You T, Yang R, Lyles MF, Gong D, Nicklas BJ. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 288: 741-747.

Young FV. The usage of hydrogenated fish oil in margarines, shortenings and compound fats. *Fish Oils Bull.* 1986; 20: 1- 8.

Zamaria N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reprod Nutr Dev.* 2004; 44(3): 273-82.

Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel, RL. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol.* 2002; 282: 226-234.

Zhang Y, Proenca P, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372: 425-432.

Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF expression by preventing NF κ B activation. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23 (1): 71–78.

Zimmet P. The burden of type 2 diabetes: are we doing enough. *Diabetes & Metabolism.* 2003; 29 (4): 9-18.

Trabalho em fase final de elaboração:

Dietary Hydrogenated Fat-rich in *trans* Fatty Acids Compared with the n-3 and/or n-6 Polyunsaturated acid Affects Gene Expression of Adipokines Regulating Energy Metabolism in Rats.

Dietary Hydrogenated Fat-rich in *trans* Fatty Acids Compared with the n-3 and/or n-6 Polyunsaturated acid Affects Gene Expression of Adipokines Regulating Energy Metabolism in Rats.

Daniella ED Guimarães¹, Javier de Castro², Javier Martinez-Botas³, Fatima LC Sardinha¹,
Pilar Ramos², Emilio Herrera², Maria das Graças Tavares do Carmo¹.

¹Institute of Nutrition, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ²Faculty of Experimental and Health Sciences, University of San Pablo-CEU, Madrid, Spain; ³Service of Biochemistry - Department of Research, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

Running title: FATTY ACIDS, ADIPOKINES AND ENERGY METABOLISM

Keywords: trans fatty acids, polyunsaturated fatty acids, adipose tissue, adipokines, PPAR γ , energy metabolism.

Abbreviations:

RET, retroperitoneal; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HF, hydrogenated fat; SO, soy oil; FO, fish oil; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; NEFA, non esterified fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; LCPUFA; long chain polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; TFA, *trans* fatty acid; AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexanoic acid; TNF α , tumor necrosis factor-alpha; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; mRNA, messenger ribonucleic acid; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; NTCD, not transmissible chronic disease.

ABSTRACT

In this study the effects of dietary *trans* and n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of resistin, TNF α , adiponectin, leptin and PPAR γ (mRNA) in retroperitoneal adipose tissue (RET) and plasmatic biochemical parameters were investigated. Female Wistar rats were fed isoenergetic and normolipidic diets containing soy oil (rich in n-6 polyunsaturated fatty acid), fish oil (rich in n-3 long chain polyunsaturated fatty acid) or hydrogenated fat (rich in *trans* fatty acid) during gestation and lactation and then fed young weaning males the same until the 120th day of life. We observed: a) greater increase in body weight in *trans* group; b) the fish group had lower triglycerides, total cholesterol, HDL-c, non esterefied fatty acids, glycerol and glucose levels and the *trans* group showed higher CT/HDL-c, insulin/glucose ratio and insulin levels; c) there was higher resistin and TNF α mRNA and lower adiponectin and PPAR γ mRNA in the RET of the *trans* group. Furthermore, there was higher PPAR γ mRNA and lower leptin mRNA in the RET of the soy group; PPAR γ mRNA was correlated with leptin mRNA ($r= 0.93$, $P<0.05$) in RET from the soy group while it was correlated with TNF α ($r= -0.89$, $P<0.05$) and adiponectin mRNA ($r= 0.86$, $P<0.05$) in RET from the *trans* group. This group also showed a correlation between resistin and adiponectin mRNA ($r= -0.83$, $P<0.05$) in RET. Therefore, this data suggests that the kind of dietary fat offered in early life should affect the endocrine function of adipose tissue with repercussions on energy metabolism in rats.

INTRODUCTION

The influence of high consumption and fat composition of diet on development of not transmissible chronic disease (NTCD) has focused intense scientific research (Bray et al, 2002). Not only the amount, but the quality of lipid intake has important influence in cellular functions, modulating the processes of differentiation, growth and metabolism. The regulation of the cellular function by lipids can occur from modulation of membrane fatty acid composition (Fickova et al, 1998) or a direct modification in the expression of genes, acting as ligands of transcription factors (Roche, 2004). Particularly, distinguished among others, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) which is an nuclear receptor express mainly in adipocytes being able to be activated for fatty acids that besides participating of adipogenesis process and energy homeostasis, can function as a modulator of hormone and cytokine expression or secretion, called adipokines, by adipose tissue, that influence a variety of physiological processes, for example, the control of food intake, energy homeostasis, insulin sensitivity and inflammatory process (Ahima & Flier, 2000).

Literature demonstrates that n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) possess proinflammatory and prothrombotic activity (Kark et al, 2003) and Fickova et al (1998) suggest that the ingestion of different PUFAs produces distinct effect in lipidic metabolism and adipose tissue, demonstrating that the n-6 PUFAs favors to accumulation of fat for adipocytes compared with n-3 PUFAs and that these last ones present important antiinflammatory function (Neschen, 2006; Todoric et al, 2006). Simopoulos (2006), in recent revision about this subject, indicates that rise in n-6/n-3 ratio frequently is found in current occidental diet, contributes for many of the metabolic alterations present in NTCD.

Studies demonstrate that *trans*-fatty acids (TFAs) intake promotes positive association with inflammatory markers (Mozaffarian et al, 2004), insulin resistance (Saravanan et al,

2005), beyond alterations in lipoproteins metabolism (Hu et al, 1997) and gene expression (Saravanan et al, 2005).

Given that some fatty acids influence PPAR γ expression and activity (Nolte et al, 1998), and that activation of this transcription factor may impact the adipokines expression and also energy metabolism (Evans et al, 2004), the primary objective of this study was to determine the impact of dietary TFAs, n-6 and n-3 PUFAs on PPAR γ and some adipokines expression (mRNA) linked to biological processes including glucose homeostasis and inflammatory process in rats adipose tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals, diets and general procedures. Adult virgin female Wistar rats weighing 180 to 220 g were obtained from the animal breeding unit of the Institute of Nutrition, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. Animals were maintained under controlled conditions of light and dark (12 h each) and temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). After mating, pregnant rats were housed in individual cages and fed laboratory chow pellets (Purina, Labina Ltda., Brazil) with free access to water. On the parturition day (day 0 of lactation), litters were weighed and adjusted to six male pups per dam. The lactating dams and their respective litters were divided into three groups according to the experimental diets, which were isocaloric (all diets provided 4.1 kcal/g of dry diet) but differed in the fatty acid profile. After weaning (day 21 of life), the pups received the same diets as their mothers until the 120th day of life. The soy oil (SO) group received a diet containing 7% soy oil; the hydrogenated fat (HF) group received 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; the fish oil (FO) group received 6% fish oil plus 1% corn oil. Soy oil and corn oil was added to each diet to adjust the diet to the requirement for essential fatty acids. The composition of each diet complied with

the American Institute of Nutrition (Reeves, 1993) recommendation and is shown in Table 1. The fatty acid composition of the diets is summarized in Table 2. Diets were prepared as pellets and stored at 4°C until use. Rats had free access to diet and water throughout the experimental period. Food consumption was measured daily and body weight weekly from day 1 to 120 of life. The young male rats were killed on the 120th day of life. Six rats in each group were killed after an overnight fast, between 10:00 and 12:00 a.m., by guillotine. Immediately after decapitation, the blood was collected in tubes containing EDTA (1 mmol/L) and used for plasma metabolite measurements. Samples of retroperitoneal white adipose tissue (RET) were quickly extracted and stored at -70°C for determination of gene expression. All experimental protocols and procedures were approved by the University's Experimental Research Committee.

TABLE 1 and TABLE 2

Fatty acid analysis. Lipid extraction, saponification, and methylation of fatty acids in the experimental diets and retroperitoneal white adipose tissue were performed in duplicate using 0.5 g samples according to the method of Lepage and Roy (Lepage & Roy, 1986), which includes treatment with 2 ml of 4:1 (v/v) methanol:benzene solution and addition of 200 µl of acetyl chloride under light agitation. Fatty acid methyl esters were quantified with gas-liquid chromatography in a Perkin Elmer autosystem XL chromatograph with an ionizable flame detector and Turbochrom software (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Fatty acids were separated on a 100-m x 0.25-mm x 0.20-µm capillary column (SP2560, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Hydrogen was used as carrier gas. Injection and detection temperatures were 260°C and 280°C, respectively. The run temperature was programmed to start at 135°C for 5 min, with a 2°C increase per minute up to 195°C. Thereafter, the temperature increased 4°C per minute up to 240°C and was kept at this level for 2.5 min. Total run time was 45 min. The carrier gas pressure was 32 psi. The split ratio was 1:70. Esters were identified by comparing

their retention times with those of standard fatty acids. Results are expressed as percentage of total fatty acids.

Plasma metabolites. Blood samples were taken by decapitating rats after an overnight fast of 12 h. Blood was collected in tubes containing EDTA (1 mmol/L), and plasma was separated immediately by centrifugation. Plasma triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, non esterefied fatty acid, glycerol and glucose concentrations were determined by enzymatic methods with commercial kits (Biolabo, France) and insulin concentration was determined by ELISA (Mercodia, Sweden).

Gene expression. Total RNA was extracted with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA (2µg) was reverse-transcribed using M-MLV RT enzyme (Promega). Real-time PCR amplification was performed on a LightCycler and data analysis software version 3.5 (Roche Diagnostics GmbH), FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH). The primers used are listed in Table 3. Amplification cycles used were 95°C for 10s, 60°C for 20s, and 72°C for 20s, except for TNFα and leptin, for which the annealing temperature was 68°C and 64°C respectively. Melting curves were evaluated for each gene, and PCR reaction products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide to confirm the presence of a single product. All analyses were performed in duplicate, cyclophilin b mRNA levels were measured as an internal standard, and the data were expressed as units relative to cyclophilin b mRNA concentrations.

TABLE 3

Statistical analysis. The results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM), and statistical comparison among groups was done by a one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between means were tested for significance by Duncan's multiple range test. The relationships between gene expression were explored using the Pearson's correlation technique. Statistical significance is defined as a p value <0.05.

RESULTS

Evaluation of post-weaning food intake (in grams/100 g body weight) revealed that, immediately after weaning, the HF group consumed a significantly lower amount of food than the SO and FO groups. However from day 45 on, food intake was significantly lower only when compared to FO group. From the 60 days of life it had a change in the standard intake and observes lower difference in the consumption of the animals between the groups and from the 90 days already not observes significant difference between the different groups (figure 1). Regarding body weight, no significant differences were observed in experimental groups during lactation. However, from day 30 on, was significantly higher in the HF than the other groups and at the 120th day of life, the FO group showed a lower body weight than HF and SO groups (figure 2).

FIGURE 1 and FIGURE 2

The fatty acid composition of RET is summarized in Table 4. It is readily apparent that the fatty acid composition of the RET varied with the type of dietary fat. The proportion of saturated fatty acid was higher in the FO group than in the other groups. The content of monounsaturated fatty acid was significantly higher in the HF group than in the SO and FO groups and is relevant to note that *trans* fatty acids were only incorporated into RET lipids of this group, which received a diet rich in these isomers. Furthermore, when the essential polyunsaturated fatty acids were evaluated, a significant decrease was observed in the percentage of linoleic and linolenic fatty acids in RET of HF group compared to the others. Higher levels of linoleic acid [C18:2 (n-6)] were detected in RET of the SO group compared to that of the remaining groups. Moreover, DHA and EPA were more abundant in the FO group than in the other two groups. The AA/EPA ratio was significantly lower in FO group and higher in SO group.

TABLE 4

Table 5 shows that triglyceride (TG), total cholesterol (TC), non esterified fatty acid (NEFA), glycerol and glucose level was significantly lower in the FO group compared to the other groups. Despite of the results have presented a reduction in plasma HDL-c concentration in FO group, when the relation between HDL-c and CT is calculated, was observed a significant decrease of HDL-c in HF group compared to the others. At the 120th day of life, the insulin level and insulin/glucose ratio were significantly higher in the HF group than the SO and FO groups.

TABLE 5

The expression of resistin, TNF α , adiponectin, leptin and PPAR γ (mRNA) in RET on the 120th day of postnatal life are showed in Figure 3. The results showed that the HF diets increased significantly the mRNA levels of resistin, TNF α and decreased the mRNA levels of adiponectin in RET. The FO group showed a significant decrease in leptin expression by RET compared to SO and HF groups and no significant differences were observed between these groups. Moreover, the expression of PPAR γ was significantly higher in RET followed by SO group. HF group showed a significant decrease in expression of this receptor as can be observed in figure 3.

FIGURE 3

The data presented in table 6 illustrate the positive correlation between the mRNA levels of PPAR γ and those of leptin ($r=0.93$; $p<0.022$) by RET of SO group. The HF group showed that mRNA levels of this receptor correlated negatively with TNF α ($r=0.89$; $p<0.044$) and positively with adiponectin ($r=0.86$; $p<0.031$). Moreover, in this group was observed a negative correlation between resistin and adiponectin ($r=0.83$; $p<0.040$). The FO group did not correlated significantly the mRNA levels of the genes included in this study.

TABLE 6

DISCUSSION

The present study demonstrates that intake of different lipids can be an important modulator of gene expression associated with endocrine function of adipose tissue, an organ which has come to be considered central to control of the metabolism. This tissue secretes hormones and cytokines that offer potential mechanisms to explain how adipose tissue is able to modulate glucose and lipid metabolism under various physiologic and pathologic states. Our results demonstrate that *trans*-fatty acid intake, compared with n6 and n3 long chain polyunsaturated fatty acids reduced adiponectin expression and increased resistin and TNF α expression by retroperitoneal adipose tissue (Figure 3). These alterations in adipokines expression can contribute, in part, to systemic inflammation, adiposity and changes in insulin sensitivity. Currently TFA is associated with the presence of inflammatory markers and thus has been considered pro-inflammatory. Mozzafarian (2006) and Willett (2006) suggests that this proinflammatory effect of TFA can be mediated partially by adipose tissue. In addition, others studies have shown that TNF α is chronically elevated in the adipose tissues of obese rodents (Sethi & Hotamisligil, 1999) and humans (Hotamisligil et al, 1995; Kern et al, 1995) and may represent an important link between obesity and insulin resistance. In the currently study the TFA group gained the most weight and increased expression of this cytokine in the adipose tissue (figure 2 and 3). Moreover, an increase in plasma insulin concentration and a higher insulin/glucose relation was observed in this group compared with polyunsaturated fatty acids groups and a significant increase in plasma glucose compared with FO group (Table 5). These data suggest that low/moderate amounts of TFA consumed during long time-periods might impair insulin sensitivity in adult rats. Such results agree with recent studies in animals that indicate a possible impairment in insulin sensitivity through TFAs intake (Ibrahim et al, 2005, Saravanan et al, 2005).

In relation to leptin expression, we did not observe alterations in the HF group compared with the SO group (Figure 3). However, FO compared with SO and HF showed a reduction in the amount of RET adipose tissue (data not shown). Although visceral adipose tissue expresses less than subcutaneous, the release of leptin is proportional to the size of total mass adipocytes, which would probably explain the lower expression of this adipokine by RET adipose tissue in the group fed FO (Figure 3), as demonstrated by Reseland et al (2001). A reduction in the amount of RET adipose tissue and the reduced plasma NEFAs, TG and glycerol concentrations observed in the FO group (Table 5), suggest an increase in the oxidation of fatty acids in detriment to the lower re-esterification in RET, although additional studies are needed to prove this hypothesis. Chicco et al (2003) showed the beneficial effect of n3 LCPUFAs in type II diabetes prevention, improving insulin sensitivity in association with the hypotriglyceridemic effect.

The results of the present study indicate that dietary fatty acids may also modify circulating lipoproteins, favoring the hypothesis that consumption of n3 PUFA would favorably influence all the dynamics of lipoproteins in the organism. The group that received a diet rich in fish oil, presented a decrease in triglyceride and total cholesterol concentration (Table 5). In the other land, the group that received HF, although not presenting a significant HDL-c reduction, the CT/HDL-c ratio was increased, suggesting a significant reduction of this lipoprotein compared with that of the remaining groups. This effect supports previous results that demonstrated that the consumption of HF, rich in TFAs, promoted a reduction in the plasma HDL-c concentration (Denke et al, 1995; Gatto et al, 2002).

Studies in humans show that individuals consuming diets rich in PUFAs and TFAs present a greater percentage of these fatty acids deposited in their adipose tissues (Baylin et al, 2002). In the adipose tissue of animals fed the HF diet, the incorporation of TFAs with a reduction in the percentage of PUFAs in this group occurred, while the FO and SO groups

observed increases in n-3 and n-6 PUFAs, respectively. In the FO group, the AA/EPA ratio in white RET adipose tissue was lower in relation to the other groups (Table 3). According to Simopoulos (2002), the rise in the n-6/n-3 PUFA ratio, currently often found in occidental diets, contributes to the development of diverse NTCDs, while an increase in n3 PUFAs levels, by reducing this ratio, exerts beneficial effects in preventing these diseases in individuals.

If the proportional ratio is greater in the RET of TFA in group HF, as well as n-3 LCPUFA in the FO group and n-6 PUFA in the SO group, it could directly interact with transcription factors regulating the expression of diverse genes and explain one of the molecular bases for fatty acids having an impact on the development of resistance to obesity and insulin. These results motivated us to study PPAR γ expression in the RET of these animals.

In the present study, we observed that ingestion of a diet rich in n3 LCPUFA, followed by the SO group, which is a source of n6 PUFA, increased the PPAR γ expression of the RET adipose tissue, exerting its function as a ligand and presenting a higher affinity to this receptor (Figure 3). In 1997, Kliewer et al demonstrated that PPAR γ can be activated by such endogenous ligands as polyunsaturated fatty acids and their derivatives. These authors also suggest that this affinity may be a possible molecular mechanism for which the PUFAs act to prevent metabolic alterations occurring in NTCDs. Others studies indicate that the n3 LCPUFAs, mainly EPA, is a activator of PPAR γ in adipose tissue, whereby the expression of this receptor results in the remodeling of adipose tissue in adult animals with apoptosis of hypertrofics adipocytes and an increased number of small new adipocytes, favoring insulin sensitivity and a coordinate activation of innumerable genes of hormone, cytokines and enzymes in adipocyte metabolism (Willson et al, 2001; Lombardo & Chicco, 2006). Moreover, when the PPAR γ is expressed, it inhibits the activation of NF κ B, another

transcription factor that is responsible for proinflammatory mediator transcription (Zhao et al, 2004). Thus, n3 PUFAs induces an antiinflammatory effect through competition for the inhibition of eicosanoids produced by n6 PUFAs and it can also act as an inflammatory process via PPAR activation (Delarue, 2001). Concerning this question, one of the possible mechanisms to explain why TFAs are associated with insulin resistance could be through the reduced PPAR γ expression by adipose tissue, as observed in the present study, agreeing with data from Saravanan et al (2005).

In addition, we were interested in inquiring into whether the ingestion of different fatty acid could be generating associations between the genes studied. Our results showed that the SO group presented a positive association between leptin and PPAR γ , while other associations with the receptors were demonstrated in the group that received a diet rich in HF, which negatively associated with TNF α and positively with adiponectin (Table 6). Previous studies found in the literature demonstrate that the modulation of adipokines, such as TNF α , leptin and adiponectin, by PPAR γ agonists, such as polyunsaturated fatty acids, could possibly be one of the mechanisms exerted for these ligands to improve insulin sensitivity (Rangwala & Lazar, 2004; Guri et al, 2006). Neschen et al (2006) demonstrated that a rich diet in FO, the source of n3 LCPUFA, caused an increase in adiponectin expression through the PPAR γ dependent mechanism and Auwerx (1999) indicated that PPAR γ activation not only favors the differentiation of adipocytes for modifying the adipose tissue metabolism, but also affects the endocrine, paracrine and autocrine response of adipose tissue. In the HF group a negative relationship was found between resistin and adiponectin, both adipokines expressed by the adipocytes (Matsuzawa, 2005; Steppan et al, 2001) (Table 6). There are numerous references describing the protective effect of adiponectin in the organism (Matsuzawa, 2005) and although the function of resistin has not been well clarified (Ukkola, 2002), there is a correlation with inflammatory markers in humans and possibly insulin

resistance (Steppan et al, 2001), thus the negative correlation found in the present study can confirm the contrary effect exerted by these adipokines on the metabolism and inflammatory process.

In conclusion, our study showed that consumption of different fatty acids favors modifications in adipokines expression and PPAR γ by retroperitoneal adipose tissue, as well as alterations in plasmatic biochemical parameters. It demonstrates that HF intake, rich in TFAs, has a negative effect on the expression of some genes included in this study, offering a possible explanation of the molecular mechanism for which this fatty acid consumption relates to a pro-inflammatory state, reducing insulin sensitivity and cardiovascular risk, whereas polyunsaturated fatty acids, mainly the n-3 LCPUFAs, in the diet prevent insulin resistance. This study supports the current recommendation to substitute PUFAs at the expense of TFA-containing foods/oils to prevent diet related chronic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarship awarded to Daniella Esteves Duque Guimarães, a graduate student at the Federal University of Rio de Janeiro.

REFERENCES

- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2000; 11(88): 327-332.
- Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999; 42: 1033-1049.
- Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 750-7.
- Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr* 2002; 132 (9): 2488-91.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr* 2003; 133: 127-33.
- Delarue J. Polyunsaturated fatty acid and inflammation. *Nutritin Clinique et Metabolisme* 2001; 15 (3): 172-176.
- Denke MA. Trans fatty acids and coronary heart disease risk: serum lipid concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 693-700.
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004; 10(4): 355-6.
- Fickova M, Hubert P, Cremel G, Leray C. Dietary (n-3) and (n-6) Polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J Nutr* 1998; 128: 512-519.
- Gatto LM, Lyons MA, Brown AJ, Samman S. Trans fatty acids affect lipoprotein metabolism in rats. *J Nutr* 2002; 132(6):1242-8.
- Guri AJ, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptors: Bridging metabolic syndrome with molecular nutrition. *Clin Nutr*. 2006;25(6): 871-85.
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1997; 337: 1491-1499.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95(5): 2409-2415.
- Ibrahim A, Natrajan S, Ghafoorunissa. Dietary *trans*-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism* 2005; 54: 240-246.

Kark JD, Kaufmann NA, Binka F, Goldberger N, Berry EM. Adipose tissue n-6 fatty acids and acute myocardial infarction in a population consuming a diet high in polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 796–802.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95(5): 2111–2119.

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 4318–4323.

Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipid in one-step reaction. *J Lip Res* 1986; 27: 114–120.

Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 1–13.

Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl* 2005; 6: 7–14.

Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, Rimm EB. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 606–12.

Mozaffarian D. Trans fatty acids - effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler Suppl* 2006; 7(2): 29–32.

Neschen N, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, Gillum M, Shulman GI. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-dependent mechanism in mice. *Diabetes* 2006; 55: 924–928.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 1998; 395: 137–143.

Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferre P. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res*. 1997; 38(10): 1963–72.

Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 331–336.

Reeves PG, Neilesen FH, Fahey GC. American Institute of Nutrition (AIN). Purified Rodent Diets. *Jour Nutr* 1993; 123: 1939–51.

Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA. Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2001; 42: 743–750.

Risérus U. Trans fatty acids and insulin resistance. *Atheroscler Suppl* 2006; 7 (2): 37-9.

Roche HM. Dietary lipids and gene expression. *Biochem Soc Trans* 2004; 32 (6): 999-1002.

Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153: 159–165.

Sethi J K, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 19–29.

Simopoulos AP, Leaf A, Salem JN. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 3: 119–121.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of Omega-6/Omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 365-379.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307–12.

Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhäus W, Stulnig TM. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 2006; 49: 2109–2119.

Ukkola O. Resistin – a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *European Journal of Endocrinology* 2002; 147: 571–574.

Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease-epidemiological data. *Atheroscler Suppl.* 2006; 7(2):5-8.

Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator activated receptor γ and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 341–67.

Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF expression by preventing NF- κ B activation. *Journal of the American College of Nutrition* 2004; 23 (1): 71–78.

TABLE 1

Composition of Diets

Constituents (g/kg)	SO	HF	FO
Casein (vitamin free)	150.0	150.0	150.0
Cornstarch	679.49	679.49	679.49
Soy oil *	70.0	10.0	-
Hydrogenated fat †	-	60.0	-
Fish oil "	-	-	60.0
Corn oil #	-	-	10.0
Butylhydroquinone-BHT	0.014	0.014	0.014
Cellulose	50.0	50.0	50.0
Vitamin mix‡	10.0	10.0	10.0
Mineral mix§	35.0	35.0	35.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
L-cystine	1.8	1.8	1.8

* Oil from Lisa/Ind.Brazil

" Oil from Roche/Ind.Brazil

Oil from Lisa/Ind.Brazil

† Hydrogenated vegetable oil was obtained from Gessy Lever, São Paulo, Brazil.

‡ Vitamin mix (g/kg diet); thiamin HCl. 0.6; riboflavin. 0.6; pyridoxine HCl 0.7; niacin. 3.0; calcium pantothenate. 1.60; folic acid. 0.20; biotin. 0.02; vitamin B12. 2.5; vitamin A palmitate (500.0 IU/g) 0.80; vitamin E acetate (500 IU/g) 15.0; vitamin D3. (400.000 IU/g) 0.25; vitamin K1. 0.75. (AIN-93. vitamin mix. DYETS 310025. Dyets Inc. Bethlehem. PA. USA).

§ Mineral mix provided (g/kg): calcium. 357.0; phosphorus. 250.0; potassium. 74.6; sodium. 74.0; sulfur. 300; magnesium. 24.0; iron. 5.21; copper. 0.3; manganese. 0.63; zinc. 1.65; chromium. 0.27; iodine 0.01; selenium. 0.01; boron. 0.08; molybdenum.0.01; silicon. 1.45; nickel. 0.03; lithium. 0.02; vanadium. 0.007 (AIN-93 mineral mix DYETS 210025. Dyets Inc. Bethlehem. PA. USA). SO. 7.0% soy oil (AIN – 93); HF. 6.0 % partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil (AIN – 93); FO. 6.0 % fish oil plus 1% corn oil (AIN – 93).

TABLE 2

Fatty Acid Composition (%) in Experimental Diets

Fatty Acids (Percentages)	SO	PHVO	FO
Total SFA	19.64	36.56	14.44
C14:0	1.34	0.07	1.44
C16:0	14.45	10.24	6.9
C18:0	3.71	12.15	3.07
<i>Trans</i> MUFA	-	14.12	-
C18:1 <i>trans</i> n-9 / n-7 isomers	-	14.12	-
Total cis MUFA	19.92	25.08	12.96
C18:1 n-9	19.03	19.92	9.51
C18:1 other <i>cis</i> -isomers*	-	4.82	0,38
C20:1	0.52	0.32	1.7
C24:1	-	0.02	0.6
<i>Trans</i> PUFAs	-	0.69	-
C18:2 (n-6) <i>tc</i>	-	0.17	-
C18:2 (n-6) <i>ct</i>	-	0.40	-
C18:2 (n-6) <i>tt</i>	-	0.12	-
Total PUFAs	60.15	23.36	72.48
C18:2 (n-6)	55.87	20.75	10.85
C18:3 (n-3)	3.59	2.61	1.13
C20:5 (n-3) EPA	-	-	35.04
C22:6 (n-3) DHA	-	-	17.24
Total trans	-	14.81	-

* Includes all positional *cis*-isomers of 18:1 except 18:1 (n-9). SO, 7.0% soy oil; HF, 6.0 % partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6.0 % fish oil plus 1% corn oil; MUFA, mono-unsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid; *t*, *trans* double bond.

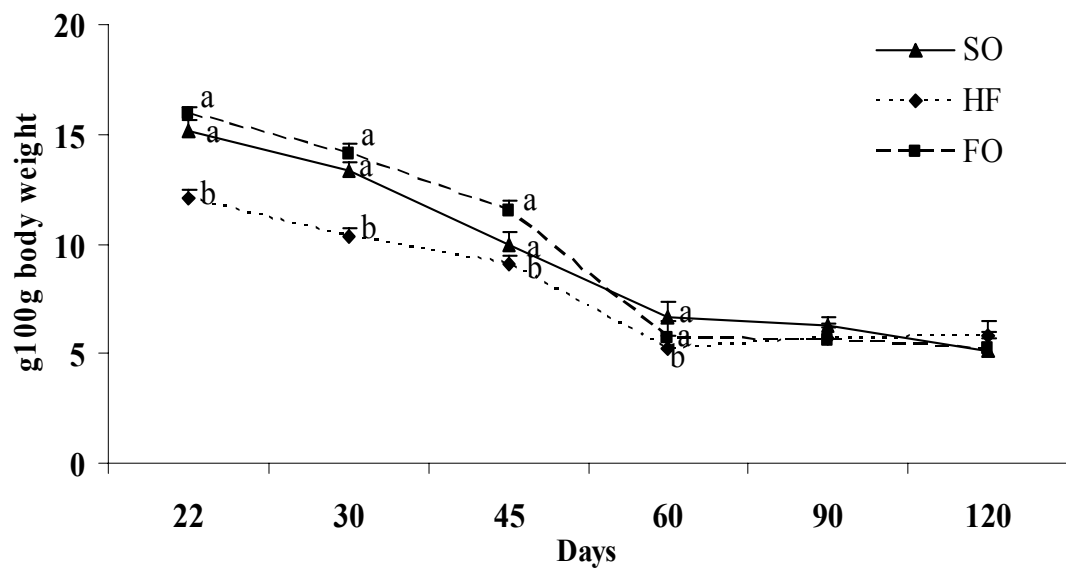


Figure 1. Effects of Dietary Fat on Food Consumption in Rats Fed SO, HF or FO Diets during 120 Days. Values are mean $\pm$ SEM of six rats per group. Different superscript letters indicate significant differences from one another on the same day at $P \leq 0.05$ as determined by Duncan's test. SO, 7% soy oil; HF, 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6% n-3 long chain polyunsaturated fatty acid plus 1% soy oil.

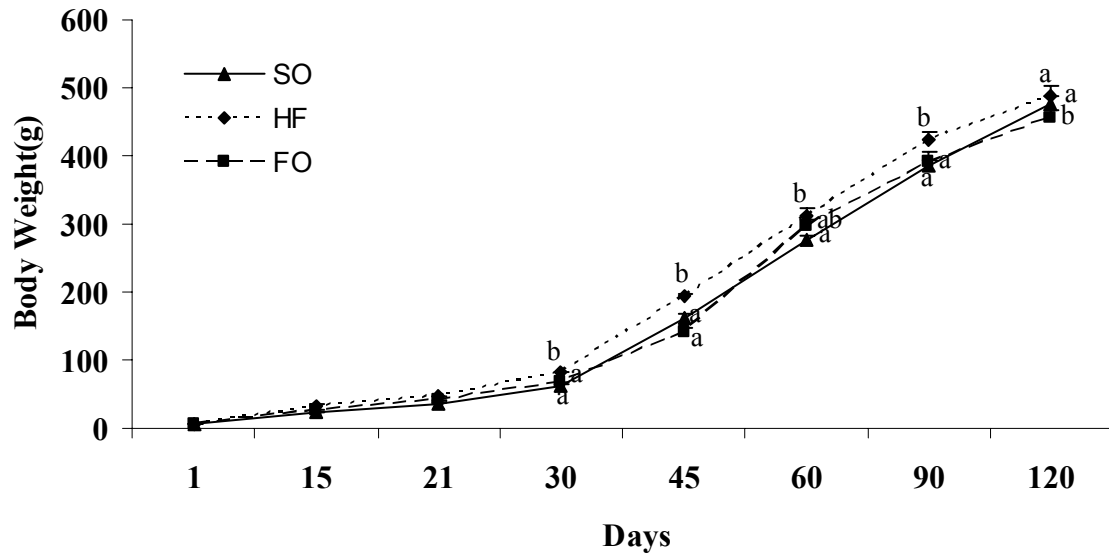


Figure 2. Body Weight (g) of the Male Pups during Lactation (1 and 14 days) and after Weaning (21-120 days). Values are mean $\pm$ SEM of six rats per group. Different superscript letters indicate significant differences from one another on the same day at $P \leq 0.05$ as determined by Duncan's test. SO, 7% soy oil; HF, 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6% n-3 long chain polyunsaturated fatty acid plus 1% soy oil.

TABLE 3

Fatty Acid Composition (%) of Total Lipids in Retroperitoneal Adipose Tissue

Fatty Acids (%)	SO	HF	FO
Total SFA	39.88 ± 0.99^b	35.48 ± 1.10^c	49.93 ± 1.13^a
C16:0	34.47 ± 0.74 ^a	29.63 ± 0.97 ^b	41.92 ± 0.94 ^a
C18:0	3.56 ± 0.29 ^a	4.19 ± 0.23 ^{ab}	5.55 ± 0.17 ^b
Total cis MUFA	27.39 ± 0.22^a	50.51 ± 1.13^b	24.76 ± 1.07^a
C18:1 n-9	17.48 ± 0.53 ^a	41.69 ± 0.90 ^b	15.96 ± 0.79 ^a
C18:1 and other cis isomers [†]	0.56 ± 0.10 ^a	2.31 ± 0.30 ^b	0.33 ± 0.03 ^a
Total PUFA	32.59 ± 1.04^a	10.07 ± 0.37^c	24.52 ± 1.23^b
C18:2 n-6	30.34 ± 1.00 ^a	9.42 ± 0.37 ^b	7.09 ± 0.50 ^c
C18:3 n-3	0.13 ± 0.01 ^b	0.47 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.05 ^a
C20:4 n-6	0.48 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.02 ^b	0.56 ± 0.03 ^a
C20:5 n-3	0.02 ± 0.002 ^a	0.01 ± 0.004 ^a	5.33 ± 0.35 ^b
C22:6 n-3	0.08 ± 0.009 ^a	0.01 ± 0.006 ^a	6.71 ± 0.43 ^b
Total trans	-	4.30 ± 0.27	-

Values are mean ± SEM for six animals per group. Different superscript letters indicate significant differences from one another at $P \leq 0.05$ as determined by Duncan's test. † Includes all positional *cis*-isomers of 18:1 except 18:1 n-9. SO, 7% soy oil; HF, 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6% n-3 long chain polyunsaturated fatty acid plus 1% soy oil. MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid; *Trans*, *trans*-fatty acid.

TABLE 4

Primers used in real-time RT-PCR study

Target	Primer 5' (forward)	Primer 3' (reverse)
Adiponectin	AATCCTGCCCAGTCATGAAG	CATCTCCTGGGTCACCCTTA
Leptin	CACCAGGATCAATGACATTTTAC	CCTCTGTGGAGTAGAGCGAGG
Resistin	CTACATTGCTGGTCAGTCTCC	GCTGTCCAGTCTATGCTTCC
TNFα	CGTCAGCCGATTTGCCATTTC	TGGGCTCATAACCAGGGCTTGAG
PPARγ	CCCACCCAACTTCGGAATCA	TGCGAGTGGTCTTCCATCAC
Cyclophilin b	TACAATGAGCTGCGTGTGG	TGGTGGTGAAGCTGTAGCC

TABLE 5

Plasmatic biochemical parameters

Biochemical parameters	SO	HF	FO
Triglyceride (mg/dL)	56,47 ± 3,95 ^a	79,72 ± 8,62 ^a	24,90 ± 3,02 ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	59,25 ± 4,66 ^a	64,30 ± 4,01 ^a	34,19 ± 2,98 ^b
HDL-cholesterol (mg/dL)	32,24 ± 1,91 ^a	30,10 ± 1,37 ^a	20,06 ± 1,57 ^b
TC / HDL-c (mg/dL)	1,84 ± 0,11 ^a	2,13 ± 0,19 ^b	1,70 ± 0,14 ^a
NEFA (mM)	0,68 ± 0,05 ^a	0,54 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,07 ^b
Glycerol (mM)	336,9 ± 10,12 ^a	373,4 ± 13,16 ^a	192,0 ± 8,13 ^b
Glucose (mg/dL)	108,63 ± 12,51 ^{ab}	145,40 ± 3,40 ^a	75,69 ± 5,35 ^b
Insulin (mg/dL)	0,56 ± 0,18 ^b	1,36 ± 0,27 ^a	0,50 ± 0,13 ^b
Insulin/glucose (mg/dL)	0,005 ± 0,001 ^a	0,009 ± 0,0002 ^b	0,006 ± 0,001 ^a

Values are mean ± SEM for six animals per group. Different superscript letters indicate significant differences from one another at $P \leq 0.05$ as determined by Duncan's test. SO, 7% soy oil; PHVO, 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6% n-3 long chain polyunsaturated fatty acid plus 1% soy oil. TC, total cholesterol; NEFA, non esterified fatty acid.

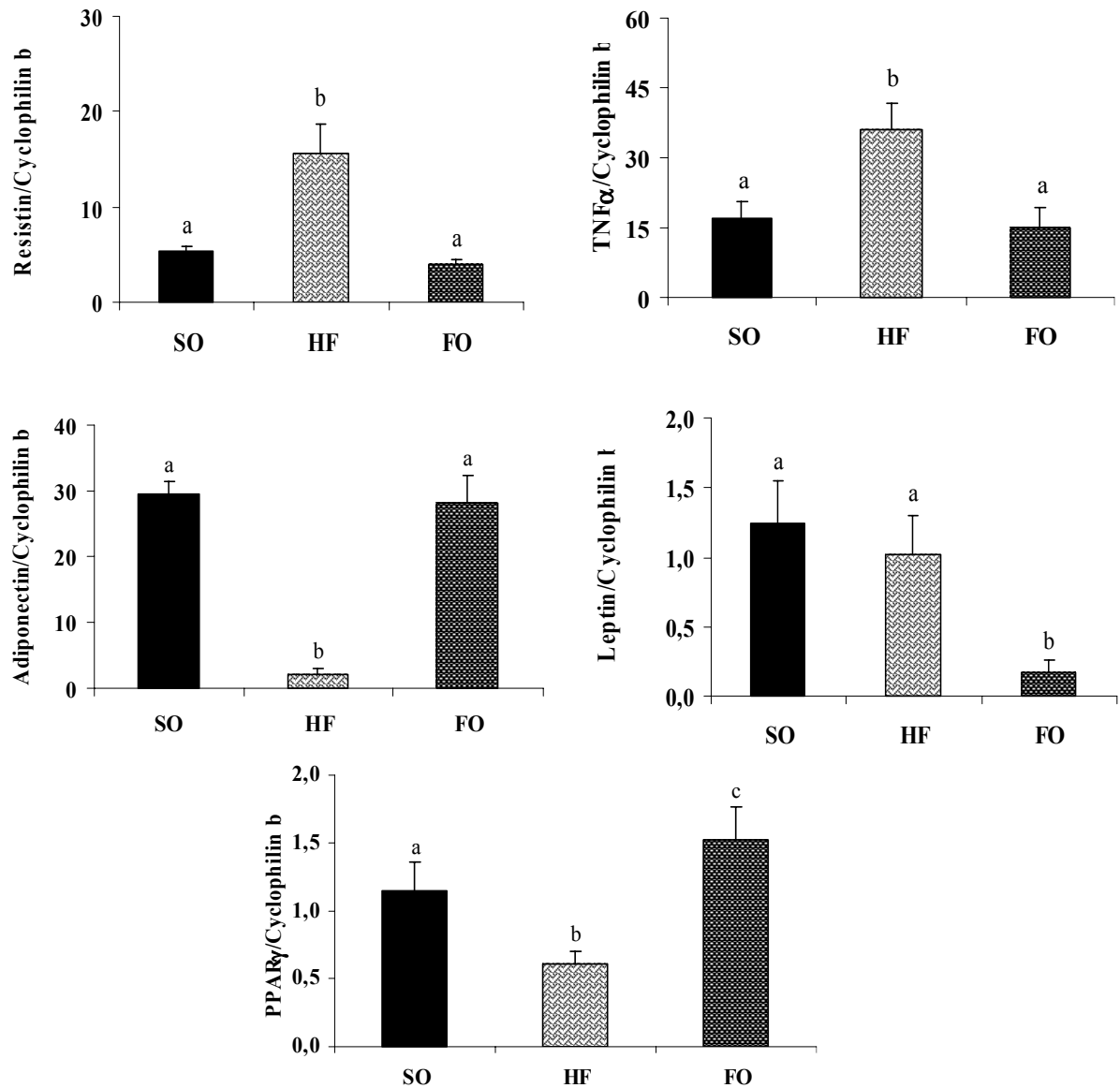


Figure 3 – Resistin, TNFα, Adiponectin, Leptin and PPARγ mRNA expression in retroperitoneal adipose tissue of rats fed SO, HF or FO diets during 120 days. Results of real time RT-PCR were expressed as units relative to cyclophilin b mRNA concentrations. Cyclophilin b mRNA levels were measured as an internal standard and used as reference gene. Values are mean ± SEM for six animals per group. Different superscript letters indicate significant differences from one another at $P \leq 0.05$ as determined by Duncan's test. SO, 7% soy oil; HF, 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6% n-3 long chain polyunsaturated fatty acid plus 1% soy oil.

TABLE 6

Pearson Correlation Coefficients (*r*) between resistin, TNF α , adiponectin, leptin and PPAR γ mRNA expression

Genes	SO		HF		FO	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
PPARγ vs Resistin	-0,11	0,849	-0,73	0,158	-0,51	0,379
PPARγ vs TNFα	0,15	0,806	-0,89*	0,044	0,29	0,634
PPARγ vs Adiponectin	0,63	0,252	0,86*	0,031	0,31	0,612
PPARγ vs Leptin	0,93*	0,022	0,27	0,654	0,43	0,467
Resistin vs TNFα	0,55	0,253	0,67	0,142	0,36	0,478
Resistin vs Adiponectin	-0,42	0,406	-0,83*	0,040	-0,32	0,537
Resistin vs Leptin	0,09	0,884	0,18	0,767	0,35	0,562
TNF-α vs Leptin	0,08	0,890	0,58	0,296	0,28	0,647
Adiponectin vs TNFα	-0,20	0,696	-0,36	0,484	-0,53	0,276
Adiponectin vs Leptin	0,42	0,472	-0,06	0,916	-0,58	0,304

r * correlation is significant ($p < 0,05$). SO, 7% soy oil; PHVO, 6% partially hydrogenated vegetable oil plus 1% soy oil; FO, 6% n-3 long chain polyunsaturated fatty acid plus 1% soy oil.

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](#)