

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU-UNESP

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES-ALVO DO RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERADORES DO PEROXISSOMA ALFA (PPAR α), EM INDIVÍDUOS OBESOS E
NÃO-OBESOS, EM SITUAÇÃO DE JEJUM**

Ingrid Felicidade

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

BOTUCATU - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU-UNESP

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES-ALVO DO RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERADORES DO PEROXISSOMA ALFA (PPAR α), EM INDIVÍDUOS OBESOS E
NÃO-OBESOS, EM SITUAÇÃO DE JEJUM

Ingrid Felicidade

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Felicidade, Ingrid.

Avaliação da expressão de genes-alvo do receptor ativado por proliferadores do peroxissoma alfa (PPAR α), em indivíduos obesos e não-obesos, em situação de jejum / Ingrid Felicidade. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lúcia Regina Ribeiro

Coorientador: Mário Sérgio Mantovani

Capes: 20804008

1. Biologia molecular. 2. Obesidade. 3. Jejum. 4. Ácidos graxos.

Palavras-chave: Ácidos graxos livres; Células mononucleares periféricas do sangue; Jejum; Obesidade; PPAR α .

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por sempre estar ao meu lado, amparando-me e fortalecendo-me!
Pelas palavras, sabedoria, confiança e esperança que me fizeram persistir e alcançar meus objetivos. Senhor, Tu és meu tudo!

“Senhor Meu

Meu Tudo

Meu Mestre

Te adorarei.

Senhor, eu nada sou

Em Ti me esconderei”

(ZIZA FERNANDES)

A meus pais, Antonio e Rosangela

Palavras, talvez, não expressem a gratidão e o amor que tenho por vocês!
Obrigada pelos exemplos, pelo amparo, pelas alegrias, pelas conquistas...
Por tudo que hoje sou.
Absolutamente, nada seria possível sem vocês!
Vocês são e sempre serão meu porto seguro e minha fortaleza.
Amo vocês!

A meu esposo Alisson

Obrigada pelo apoio e pelas longas conversas durante os meus momentos de desespero, quando você sempre soube o que falar. Obrigada pelo ombro, pelo amor, pela dedicação e atenção.

Amo-te pela pessoa maravilhosa que és, por abrir mão dos seus sonhos pelos meus, pela cumplicidade e respeito que dedica a mim e ao nosso amor!

Amo-te para todo o sempre.

“Amar é você não conseguir se expressar, pois toda palavra que encontra não é o bastante.

Amar é virar poeta e adotar todos os métodos culturais.

Amar é ousar, transcender o tempo, o tempo todo.

Amar é você querer a pessoa feliz, mesmo contigo longe.

Amar é...

Amar é ficar ao lado dele, e ficar com pensamento positivo, mesmo quando não exista

pensamento.

Amar é ter um nó na garganta e vontades de chorar de alegria

Amar é trocar o sorriso pelo choro, porque quando você está ao lado dele os dois são emocionantes.

Amar é ter dentro de sua cabeça pequenos "Filminhos" de pequenos momentos que você viveu, e que faria de tudo para revivê-lo.

Amar é interditar uma frase, para entrada de um sorriso.

Amar é abrir a boca e sua mente não saber o que dizer, mas quando você percebe seu coração já disse tudo!

Amar é ter uma felicidade repentina motivado pela felicidade alheia.

Amar é ter a certeza que ele vai estar SEMPRE com você... mesmo sendo no coração ou na imaginação"

(CARLOS MACHADO FILHO)

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Lúcia, você me deu um dos bens mais preciosos que alguém pode passar a outra pessoa: o conhecimento. Obrigada por me deixar fazer parte desse mundo extraordinário...

Obrigada pela confiança, pelas palavras e pela ajuda.

Sem você, sem sua orientação, seria impossível que este trabalho chegasse ao fim, com tanto primor.

Espero que nossa parceria perdure ao longo da minha vida acadêmica e profissional.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

(ALBERT EINSTEIN)

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Mário, obrigada por permitir que eu trabalhasse no seu laboratório.

Todas as nossas conversas e discussões sobre o meu projeto acrescentaram muito ao meu conhecimento. Obrigada por ceder seu tempo para co-orientar-me.

Suas opiniões foram extremamente significantes para o resultado final da minha dissertação.

Espero que ainda possamos trabalhar juntos por muito tempo!

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende"

(LEONARDO DA VINCI)

À Dra. Lydia Afman – Wageningen University, The Netherlands

Mesmo distante, sempre esteve presente. Obrigada pela ajuda desde a escolha do tema, pela colaboração e dedicação ao meu projeto.

Muito obrigada!

Ao Dr. Michael Müller – Wageningen University, The Netherlands

Michael, obrigada por um dia ter deixado que eu realizasse um estágio em seu laboratório.

A oportunidade dada por você foi o início do meu despertar pela ciência!

Obrigada pelas aulas, fonte incomensurável de conhecimento.

Que possamos dar continuidade à nossa colaboração.

Ao Dr. Guido Hooiveld – Wageningen University, The Netherlands

Guido, você passou de um orientador a um amigo.

Obrigada por tudo que fez por mim durante o período em que estive em Wageningen.

Obrigada por me incluir nos estudos de seus orientandos, por me ensinar o máximo que pôde, por me apresentar a Holanda e por permitir que me tornasse amiga da sua família!

Sou muito grata pela sua amizade! Espero que, em um futuro próximo, você volte a ser um dos meus co-orientadores.

Ao Dr. Lars Eijssen – Maastricht University, The Netherlands

Conhecemo-nos há pouco, mas não poderia não deixar aqui meus agradecimentos.

Sou grata por toda a sua disponibilidade em me ajudar com meus dados e estatísticas.

Obrigada pelas valiosíssimas aulas de estatísticas, via e-mail, que, desse momento, estarão sempre comigo. Obrigada pelo seu bom humor em responder todas as minhas dúvidas.

À Els Oosterink – Wageningen University, The Netherlands

Seria impossível realizar a minha análise de dados sem sua ajuda. Sua ajuda foi constante desde o desenho dos *primers* à análise de dados. Com seu conhecimento e disponibilidade, foi possível “salvar” meus dados e dar continuidade ao meu manuscrito. Obrigada por estar presente e disponível sempre que ocorria uma dúvida técnica. Muito obrigada!

À MSc. Clísia Mara Carreira

Obrigada pela ajuda na seleção dos indivíduos, parte essencial ao estudo. Obrigada pela disponibilidade e carinho que dispôs a esse estudo e aos voluntários. Muito obrigada.

À MSc. Juliana Cristina Marcarini

Jú, não sei nem o que te dizer, além do que eu jamais canso ou cansarei de te dizer:

MUITO OBRIGADA!

Você foi essencial neste estudo e na minha vida. Foi você que me ensinou tudo que sei sobre técnicas de biologia molecular, com uma paciência digna de uma mãe.

Obrigada por ficar no laboratório até tarde da noite, por ficar horas e dias executando as mesmas tarefas. Obrigada por deixar seus experimentos para me ajudar! Obrigada por todos os meses que dedicou sua atenção a este projeto!

Jú, espero que possamos trabalhar por muito tempo juntas.

Obrigada pela amizade e companheirismo...

**Ao Programa de Pós-graduação em Patologia (UNESP), na pessoa da Dra. Márcia
Guimarães da Silva**

Obrigada ao programa por me dar suporte para a realização dessa dissertação e do meu desenvolvimento profissional e pessoal. À Dra. Márcia por me ajudar, aconselhar e sempre estar disposta a esclarecer qualquer dúvida. Obrigada por coordenar com excelência e zelo o programa.

À Vânia do Amaral Soler – UNESP

Vânia muitíssimo obrigada por tudo que você fez durante o meu mestrado. Sempre me ajudando e respondendo minhas inúmeras dúvidas com carinho e dedicação. Sem você tudo teria sido mais complicado.

Ao Laboratório de Genética Toxicológica – UEL

A todos do laboratório, por acolherem-me com carinho! Muito obrigada pelos momentos de amizade que pudemos compartilhar durante esses anos de mestrado. Obrigada pela força, dedicação e oração, que com toda certeza fizeram a diferença para eu chegar onde estou! Que continuemos nessa amizade pelos próximos e próximos anos...

À Dra. Marla Karine Amarante

Marla, obrigada por toda a ajuda, desde a padronização de algumas técnicas até a análise estatística. Obrigada por repassar inúmeras vezes o protocolo de separação de PBMCs comigo, até eu conseguir padronizar. Seus conselhos e dicas foram essenciais. Ao fim do estudo, busquei socorro em você e, mais uma vez, com toda a sua delicadeza e paciência, ajudou-me. Este estudo tem muito de você. Obrigada!

À diretoria de Serviços – UEL

Por me ajudar em tudo que precisei durante a seleção da amostra. Meu muito obrigada por apoiar este estudo.

Flávio Maranhão de Lima, Eduardo Henrique Ronchi, SergioPereira, Reginaldo

Eduardo de Jesus

Muito obrigada pela disponibilidade e atenção que sempre deram a este estudo. Pela ajuda na identificação de voluntários e por liberá-los durante o período de intervenção. Sem a compreensão e ajuda de vocês, este estudo teria se tornado muito mais difícil.

À diretoria de obras UEL

Por me ajudar na seleção de indivíduos, mesmo quando eu solicitei sem muito tempo de antecedência. Sem o apoio de vocês, eu não conseguiria ter completado os meus grupos de estudo. Muito obrigada.

Aos voluntários do estudo

Essa conquista também é de vocês! Que se esforçaram, foram determinados e sempre solícitos. Obrigada por tudo que fizeram por mim e para este estudo. A ciência não conseguiria chegar longe se não fosse pela ajuda de pessoas como vocês! Nunca me esquecerei de vocês! Do momento do estudo em diante, vocês fazem parte de um grupo de pessoas que eu jamais terei condições de agradecer por completo, deixo aqui, apenas, o meu
Muito obrigada!

À Pró-reitoria de Recursos Humanos – UEL

Obrigada por permitir a dispensa dos indivíduos da pesquisa sem qualquer ônus. O comprometimento dessa Pró-reitoria com o bem-estar dos servidores fez com que este trabalho fosse realizado. Obrigada pela disponibilidade e ajuda.

Ao SESMT- UEL, na pessoa do Dr. João Luiz Bonini Campanha

Obrigada por me ajudar na seleção dos indivíduos, escolhendo somente aqueles que, ao participar, não teriam qualquer prejuízo médico.

Ao Hospital das Clínicas – UEL, na pessoa da nutricionista Ilidia T. Martelli Takahashi

Ilidia, muito obrigada por ceder o refeitório do Hospital das Clínicas. Obrigada, também, por dispor-se a ajudar os voluntários que apresentarem obesidade ou qualquer distúrbio com relação à nutrição.

Ao DASC – UEL, na pessoa da Enfermeira Márcia Regina Bizzo de Castro

Márcia, muito obrigada por liberar a sala de coleta de sangue para usarmos durante o nosso estudo. Sua disponibilidade em ajudar-nos foi essencial para termos dinamismo durante a execução do projeto, além de trazer conforto aos indivíduos.

Ao Setor de coletas (HC) – UEL, na pessoa do Prof. Valter Abou Murad

Por ter ajudado e permitido que eu coletasse meu sangue, quantas vezes fossem necessárias, para a padronização das técnicas. Muito obrigada.

Ao CEFE – UEL, na pessoa da Profa. Dra. Rosangela Marques Busto

Obrigada por autorizar o uso das salas de ginástica para passarmos o período de intervenção do estudo com os voluntários. Isso permitiu maior controle, mais comodidade e fez com que pudéssemos realizar diversas formas de entretenimento. Muito obrigada.

Ao laboratório Sérgio Franco (RJ), na pessoa da Dra. Mônica Di Calafiori Freire

Mônica, obrigada pela ajuda com a dosagem de ácidos graxos e por doar todo o material necessário para a realização da dosagem. Muito obrigada.

Ao Enfermeiro Fabiano Moreira Ganeo

Conhecemo-nos há muito tempo e, naquela época, nunca imaginaríamos que iríamos trabalhar juntos em uma pesquisa! Enfim, esse dia chegou e você realizou sua parte com muito primor. Obrigada por acordar cedo, mesmo com chuva, para me ajudar na triagem dos indivíduos; por estar comigo e com os voluntários durante todo o dia da intervenção do estudo, sempre atento e com profissionalismo, pronto para intervir caso alguém passasse mal, mesmo sendo um dos dias mais importantes da sua vida: o resultado do internato! E que felicidade estar contigo na hora do resultado! Obrigada por tudo! Você ainda realizará todos os seus sonhos profissionais, pois já é ótimo no que faz!

Ao Biomédico Walter Minotu Susuki

Walter, conheci você na coleta, nas inúmeras vezes que fui lá para coletar meu sangue. No dia da intervenção do estudo, eu estava sem ninguém para me ajudar na coleta e, quando solicitei sua ajuda, você ajudou prontamente! Obrigada por me ajudar e disponibilizar horas de serviço, mesmo após um dia todo de internato.

À Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira e Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Muito obrigada por fazerem parte deste momento! Obrigada pela disponibilidade e atenção na correção da minha dissertação. Suas recomendações durante minha qualificação foram de um grandioso valor. Muito obrigada!

À Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini e Dra. Raquel Alves dos Santos,

Muito obrigada por aceitarem fazer parte de minha banca, em especial, nesses momentos finais. Agradeço antecipadamente, os comentários, sugestões e observações. Obrigada por dividir o conhecimento de vocês nesse meu momento de amadurecimento profissional.

Aos meus amigos

Pelas orações, pelos momentos de alegrias e pela certeza de que sempre terei em quem me apoiar. Obrigada por somarem as suas alegrias e tristezas às minhas! Amo vocês muito!

“E sempre serei os teus olhos quando a dor te cegar

Te levo em meu colo se o teu passo falhar

Serei um elo entre o céu e você

Pra sempre serei tua luz se a escuridão te assustar

O abraço e o ombro pro teu pranto rolar

Serei um elo entre o céu e você

Sou teu anjo guardião”

(CANAL DA GRAÇA)

À BD, na pessoa do Dr. Wilton Carlos Zanetti Lopes

Wilton, obrigada pela ajuda na escolha dos melhores tubos para a execução do meu experimento. Obrigada, também, pelas doações de materiais e indicações de locais de compra.

Muito obrigada.

À Roche, na pessoa de Glauca Ribeiro

Obrigada pelo empréstimo do aparelho, assim como a doação das fitas para dosagem da glicose dos pacientes.

Ao João Renato Pesarini e à Marcela Tsuboy

Obrigada por me ajudarem a separar e preparar as inúmeras amostras no dia da intervenção do estudo.

A todos aqueles que torceram, rezaram, ajudaram ou simplesmente fizeram-me companhia durante esses anos, meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Em diversas partes do mundo, a prevalência da obesidade tem aumentado rapidamente. A Organização Mundial da Saúde estima que, em 2015, haverá 700 milhões de pessoas obesas (índice de massa corporal $\geq 30\text{kg/m}^2$) em todo o mundo. No Brasil, aproximadamente, 50% da população acima dos 20 anos apresentam sobrepeso (índice de massa corporal $\geq 25\text{kg/m}^2$) e 16% já demonstram quadro de obesidade. A obesidade é um dos fatores desencadeadores de diversas doenças crônicas, assim, é importante identificar características que predisõem indivíduos à obesidade, ou condições negativas que ocorrem durante o desenvolvimento da obesidade, as quais alteram o metabolismo e o estado de saúde de maneira negativa. O objetivo do presente estudo foi avaliar diferenças na expressão de genes-alvo do PPAR α em células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs) e na concentração plasmática de ácidos graxos livres no sangue, entre indivíduos obesos e não-obesos, após 24 horas de jejum. Este estudo foi o primeiro realizado na população brasileira. Em ambos os grupos (obeso e não-obeso), a concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) elevou-se de forma significativa após as 24 horas de jejum, em especial, no grupo não-obeso, onde a média da concentração elevou-se 3 vezes se comparada com a média da concentração no tempo 0h. A média da concentração plasmática basal (0h) de AGL revelou-se 2 vezes maior no grupo obeso quando comparada com a média do grupo não-obeso. No entanto essa diferença não foi observada após as 24h de jejum. Os genes estudados participam diretamente na β -oxidação mitocondrial hepática e musculoesquelética e são ativados por PPAR α . Após o jejum, todos os genes estudados evidenciaram um incremento na expressão (*fold change*) quando comparados com o tempo 0h, em ambos os grupos. Ao se identificar qual a via de β -oxidação preferencial durante o jejum, o gene da CPT1A demonstrou um incremento na expressão (*fold change*) em comparação com a CPT1B, assinalando, assim, que a β -oxidação ocorreu de uma maneira maior no fígado, em ambos os grupos. Por fim, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo, quanto à regulação da expressão gênica, nos genes estudados, os resultados observados no grupo obeso são ligeiramente mais pronunciados do que no grupo não-obeso. Os resultados obtidos pelo presente estudo podem ser importantes para a análise de intervenções dietéticas e diagnóstico precoce ainda em um estágio subclínico.

Palavras-chave: Ácidos graxos livres; Células mononucleares periféricas do sangue; Jejum; Obesidade; PPAR α .

ABSTRACT

The prevalence of obesity has increased rapidly in many parts of the world. The World Health Organization estimates that in 2015, there should be 700 million obese people (body mass index $\geq 30\text{kg} / \text{m}^2$) around the world. In Brazil, approximately 50% of the population aged 20 years and older are overweight (body mass index $\geq 25\text{kg} / \text{m}^2$) and 16% already meet the criterion for obesity. Obesity is considered a trigger factor for several chronic diseases, so it is important to identify traits that predispose individuals to obesity or negative conditions that occur during the development of obesity, affecting metabolism and health negatively. The aim of this study was to evaluate differences in the expression of PPAR-alpha target genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in plasma free fatty acid concentration in the blood of obese and non-obese subjects, after 24 hours of fasting. This was the first study conducted in the Brazilian population. In both groups (obese and non-obese), plasma free fatty acid (FFA) concentration increased significantly after 24 hours of fasting, especially in the non-obese group, in which the mean concentration rose 3 times compared with the mean concentration at time 0h. The baseline (0h) mean of plasma FFA concentration was 2 times higher in the obese group compared with the mean from the non-obese group. This difference, however, was not observed after 24h of fasting. The studied genes participate directly in hepatic and musculoskeletal mitochondrial beta-oxidation and are activated by PPAR-alpha. After fasting, all the studied genes had an increase in fold change compared with time 0h, in both groups. By identifying the preferential beta-oxidation during fasting, the CPT1A gene presented an increase in fold change compared with the CPT1B gene, indicating thus that beta-oxidation occurred more in the liver, in both groups. Finally, although there was no statistically significant difference between the study groups regarding the regulation of gene expression in the studied genes, the results observed in the obese group are slightly more pronounced than in the non-obese group. The results obtained by this study may be important for the analysis of dietary interventions and early diagnosis, even in a sub-clinical stage.

Keywords: Fasting; Free fatty acids; Obesity; Peripheral blood mononuclear cells; PPAR-alpha;

SUMÁRIO

Capítulo I	13
1. Revisão da literatura	13
a. Obesidade e ácidos graxos	13
b. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)	15
c. Jejum	17
d. Células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs)	19
e. Genes de interesse	20
2. Referências	23
Capítulo II	29
1. Introdução	29
2. Materiais e métodos	31
2.1 Amostra estudada	31
2.2 Delineamento do estudo	31
2.3 Determinação da concentração de glicose no sangue e na urina, e níveis de ácidos graxos livres no plasma	32
2.4 Isolamento das células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs)	32
2.5 Extração do RNA total	32
2.6 Síntese de cDNA	33
2.7 PCR convencional	33
2.8 PCR em tempo real quantitativo	34
2.9 Análise estatística	35
3. Resultados	35
3.1 Características dos indivíduos estudados	35
3.2 Expressão gênica	38
4. Discussão	40
5. Referências	45
Conclusão Final	50
APÊNDICE A – Dieta dos indivíduos	51
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	52
APÊNDICE C – Questionário	55
ANEXO 1	58

CAPÍTULO I

1. Revisão da Literatura

a. Obesidade e ácidos graxos

Na maioria dos países desenvolvidos, a prevalência de obesidade continua aumentando, fenômeno o qual também se verifica nos países em desenvolvimento, onde a obesidade apresenta dados epidêmicos. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou pelo menos 400 milhões de pessoas como obesas (índice de massa corporal $\geq 30\text{kg/m}^2$), e projeta que, em 2015, esse número chegará a 700 milhões (CONSITT et al., 2009). No Brasil, segundo a última Pesquisa de Orçamento Familiar (POF- 2008/2009), divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o sobrepeso atinge mais de 30% das crianças entre 5 e 9 anos de idade, cerca de 20% da população entre 10 e 19 anos e 48% das mulheres e 50,1% dos homens acima de 20 anos. No caso da obesidade, observa-se que, na faixa etária entre 5 e 9 anos, 16,6% e 11,8% do sexo masculino e feminino, respectivamente, apresentam obesidade; e, entre os indivíduos com mais de 20 anos, os valores encontrados foram de 12,4% para os homens e 16,9% para mulheres (IBGE, 2010).

A obesidade é causada por um desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia, resultando em um balanço positivo de energia, associado ao ganho de peso (KERSTEN, 2002; PATSOURIS et al., 2004). Esse excesso de energia é, primariamente, armazenado nos tecidos adiposos, na forma de triacilglicerídeos. Algumas evidências sugerem que, em resposta à hipertrofia dos adipócitos, durante o desenvolvimento da obesidade, a função do tecido adiposo é comprometida (STIENSTRA et al., 2007). A obesidade também provoca mudanças estruturais e metabólicas em outros órgãos, incluindo musculoesquelético e fígado (STIENSTRA et al., 2007). A etiologia da obesidade parece estar associada com a inabilidade de oxidação de lipídios circulantes em obesos (KIM et al., 2000).

O acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo, fígado e musculoesquelético predispõe fortemente ao desenvolvimento de mudanças metabólicas que aumentam o risco de morbidades (STIENSTRA et al., 2007). As anormalidades metabólicas que frequentemente são acompanhadas de obesidade incluem hipertensão, tolerância à glicose diminuída, resistência à insulina associada à hiperinsulinemia, dislipidemia, desordens de coagulação e doenças cardiovasculares (STIENSTRA et al., 2007; HOUMARD, 2008; BODEN, 2011).

Os indivíduos que apresentam obesidade e/ou diabetes tipo 2, comumente, encontram-se com os níveis de ácidos graxos circulantes duas vezes maiores do que os indivíduos não-obesos e saudáveis (CONSITT et al., 2009; BODEN, 2011).

O aumento de ácidos graxos no plasma é capaz de inibir a utilização da glicose, aumentando, assim, a resistência à insulina (RANDLE, 1998). Portanto, muita atenção tem sido dada ao papel dos ácidos graxos livres (AGL) no plasma, os quais são capazes de interromper o metabolismo celular em muitos órgãos (MANDARD et al., 2006).

O tecido adiposo é reconhecido por ter diferentes funções, as quais são importantes na regulação do balanço de energia e substrato do metabolismo. O principal papel desse tecido é agir como um reservatório, no qual os ácidos graxos são armazenados como triacilglicerídeos (NAPAL et al., 2005), bem como mobilizar essa energia quando necessário, por exemplo, durante o jejum ou em situações com elevada demanda de energia (PALOU et al., 2010). O tecido adiposo visceral tem sido mais relacionado com as anormalidades clínicas ligadas à obesidade do que o tecido adiposo subcutâneo. O excesso de tecido adiposo visceral levaria a maior liberação de ácidos graxos para o fígado, podendo prejudicar a depuração e ação da insulina e aumentar a glicose e a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) fora do fígado, provocando, assim, resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperglicemia (PALOU et al., 2010). A adiposidade central (visceral), associada com altos níveis de ácidos graxos livres, também, está envolvida com a diminuição da atividade das células β -pancreáticas, tornando a progressão para o diabetes mais rápida (BERGMAN & ADER, 2000).

O musculoesquelético, assim como o tecido adiposo, desempenha um papel importante no metabolismo de lipídios, por meio da oxidação (KIM et al., 2000). Embora a quantidade de triacilglicerídeos no musculoesquelético seja relativamente menor que no tecido adiposo, essa quantidade é significativamente associada com a resistência à insulina (KELLY et al., 1999). Estudos relatam que a oxidação lipídica no músculo é reduzida em indivíduos obesos no estado pós-absortivo, sugerindo que a diminuição da oxidação de lipídios no músculo resulta em um acúmulo de lipídios intramuscular que pode estar ligado com a resistência à insulina em indivíduos obesos (KIM et al., 2000). Essa diminuição na oxidação tem sido atribuída à capacidade mitocondrial reduzida (SUGDEN et al., 2009).

Randle et al. (1963) foram os primeiros a discutir os mecanismos pelos quais os ácidos graxos poderiam mediar a resistência à insulina em ratos. Após quase 50 anos, estudos em musculoesquelético de humanos demonstram os mesmos resultados, então, referindo que os ácidos graxos induzem ao aumento de gordura e diminuem a oxidação de carboidratos. No entanto os resultados revelaram que esses eventos, por si só, não foram a causa para uma subsequente resistência à insulina (BODEN, 2011). Atualmente, sabe-se que ácidos graxos

livres inibem a ação da insulina em nível de transporte da glicose, estimulada pela insulina e/ou fosforilação, por meio da inibição do sinal da insulina (BODEN, 2011).

A obesidade também está associada a um padrão inflamatório, com aumento nos níveis de citosinas pró-inflamatórias e quimiocinas na circulação e nos tecidos. Os ácidos graxos parecem ser uma possível causa para esse padrão, visto que demonstrou, *in vivo* e *in vitro*, ativar vias pró-inflamatórias NF-kB (BODEN, 2011). Em humanos, altos níveis de ácidos graxos demonstraram ativar NF-kB no musculoesquelético, resultando em um aumento na expressão de diversas citosinas pró-inflamatórias (ITANI et al., 2002). Além da inflamação, os ácidos graxos demonstram associação com o estresse oxidativo (BODEN, 2011).

b. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)

O termo ativado por proliferadores de peroxissoma foi, pela primeira vez, citado em 1990, quando o primeiro membro da família de receptores ativado por proliferadores de peroxissoma (PPARs), o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), foi descoberto (ISSEMANN & GREEN, 1990; MANDARD et al., 2004).

Em nível molecular, os PPARs atuam de maneira similar a outros receptores hormonais nucleares e mediam os efeitos de pequenos compostos lipofílicos, como os esteroides, retinoides, ácidos biliares e ácidos graxos, na transcrição do DNA (KERSTEN, 2002; MANDARD et al., 2004). Os PPARs e outros receptores hormonais nucleares se ligam a promotores somente como um heterodímero com o receptor ácido retinoico 9-cis, RXR (receptor retinoide X) (KERSTEN et al., 2000a; MANDARD et al., 2004). O heterodímero PPAR/RXR se liga a uma região específica dos promotores, elementos de resposta a proliferador de peroxissomo (PPREs), regulando a expressão de genes (MANDARD et al., 2004; GUO et al., 2006). PPREs consistem em uma repetição direta de uma sequência AGGTCA, separada por um nucleotídeo (DR1) e flanqueada por uma sequência rica em A/T (NAPAL et al., 2005).

Três isótopos de PPARs foram identificados: α , β (também conhecidos como δ e NUC1) e γ . O PPAR α é mais expresso no tecido adiposo marrom e fígado, mas também está presente nos rins, coração e musculoesquelético. O PPAR γ é, principalmente, expresso no tecido adiposo e, de forma menor, no cólon, no sistema imune e na retina. O PPAR β é encontrado preferencialmente expresso no intestino, rins e coração (KERSTEN et al., 2000a; MANDARD et al., 2004).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligantes. A ativação da transcrição de genes-alvo depende da ligação de ligantes no receptor (FRUCHART, 2009). Alguns ligantes são compartilhados pelos três isótopos, como ácidos graxos poli-insaturados e, provavelmente, ácidos graxos oxidados. Diversos compostos ligam-se com alta afinidade ao PPAR α , incluindo ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como ácido linoleico, ramificado e conjugado; ácidos graxos oxidados, como ácido fitânico e ácido linoleico conjugado; e eicosanoides, como 8S-HETE e leucotrieno (LT) B₄ (KERSTEN et al., 2000a; KERSTEN, 2002; MANDARD et al., 2004; BOUWENS et al., 2008).

Uma ligação funcional entre oxidação de ácidos graxos e PPAR α foi estabelecida em 1992, quando foi demonstrado que o gene oxidase acetil-CoA peroxissomal, o qual é envolvido na β -oxidação de ácidos graxos peroxissomal, é regulado por PPAR α . Desde então, vários genes envolvidos no catabolismo de ácidos graxos hepáticos têm sido descritos como sendo induzidos por proliferadores do peroxissoma e PPAR α . O catabolismo hepático de ácidos graxos consiste de inúmeras vias distintas. Em primeiro lugar, ácidos graxos livres, que são gerados através da lipólise no tecido adiposo, são retomados do plasma sanguíneo para o fígado, onde são ativados em acil-CoA graxos. Os acil-CoA graxos ativados são, subsequentemente, retomados na mitocôndria ou peroxissomos para a degradação do acetil-CoA, via β -oxidação. Enquanto a mitocôndria oxida ácidos graxos de cadeia curta, média e, preferencialmente, longa, o peroxissomo oxida alguns de cadeia longa, mas, principalmente, ácidos graxos de cadeia muito longa (MANDARD et al., 2004).

Os ácidos graxos são ligantes dos PPARs, sendo, portanto, possível que uma grande quantidade de ácidos graxos liberada do tecido adiposo, durante o jejum, possa estimular seu próprio metabolismo por meio da ativação de PPAR α (KERSTEN et al., 2000a; MANDARD et al., 2004). Outro estímulo fisiológico que pode modificar o sistema de sinal dependente de PPAR α é uma dieta rica em gordura (KERSTEN et al., 1999).

Os genes-alvo do PPAR α são um grupo relativamente homogêneo de genes que participam em vários aspectos do catabolismo de lipídios, como absorção de ácidos graxos através da membrana, ligação de ácidos graxos nas células, oxidação de ácidos graxos (no microsomo, peroxissomo e mitocôndria) e montagem e transporte de lipoproteínas (KERSTEN et al., 2000a).

O papel desses fatores de transcrição, no metabolismo e fisiologia do corpo humano, pode ser mais bem ilustrado ao serem comparadas duas situações nutricionais opostas: período de absorção inicial ou estado alimentado e período pós-absorção tardia ou estado de jejum. No estado alimentado, que, em humanos, é de até 4 horas após uma farta

refeição, carboidratos e gorduras entram na circulação na forma de glicose e quilomícrons, respectivamente. A quantidade de fatores de transcrição de elementos de resposta a esterol ligados à proteína 1 (SREBP1) aumenta no estado alimentado, o qual promove a conversão glicolítica de glicose em acetil-CoA e subsequente síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA. Os ácidos graxos são convertidos em triacilglicerídeos e guardados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (KERSTEN et al., 2000a).

Uma situação diferente existe no estado pós-absorção tardio ou de jejum. No fígado, ácidos graxos são oxidados em acetil-CoA e, subsequentemente, em corpos cetônicos. Ambos os processos são estimulados pelo PPAR α , cuja expressão é mais elevada em consequência do jejum (KERSTEN et al., 2000a).

c. Jejum

O estudo do metabolismo de ácidos graxos é necessário para identificar rotas que irão permitir uma modulação nutricional de depósito de lipídios que ajudem a prevenir ou curar desordens relacionadas com dislipidemias (BLAVY et al., 2009). O jejum tem sido usado como metodologia-chave para o estudo do metabolismo de lipídios em diversos órgãos, assim como a expressão de genes nessa etapa.

Os mamíferos têm desenvolvido sistemas de respostas metabólicas que lhes permitem sobreviver por longos períodos de privação de energia (KERSTEN et al., 1999). As respostas ao jejum, em eucariotos superiores, são complexas e são iniciadas, em parte, por meio de mudanças hormonais em resposta à diminuição dos níveis de glicose e aminoácidos no sangue (FINN & DICE, 2006). Uma característica proeminente é a mudança gradual, em todo o organismo, que leva à utilização de carboidratos e gordura da alimentação para, quase que exclusivamente, gordura após um dia de jejum. Essa adaptação é particularmente notável no cérebro, um consumidor obrigatório de glicose em estado de alimentação, o qual é capaz de adquirir energia predominantemente de corpos cetônicos após um jejum prolongado (KERSTEN et al., 1999).

O metabolismo do tecido adiposo é um componente central na mudança de economia de energia durante o jejum. A mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo fornece a maior parte da energia necessária para os tecidos periféricos durante o jejum, poupando glicose para a utilização em tecidos dependentes (CARLSON et al., 1994). A demanda de ácidos graxos livres é também alta durante exercícios, e a oxidação lipídica pode dar conta de mais de 70% da energia total gasta no corpo, durante um jejum noturno (BODEN & SHULMAN, 2002).

Existem diferenças hormonais que contribuem para respostas fisiológicas ao jejum (FINN & DICE, 2006). O jejum prolongado é caracterizado por concentração baixa de glicose e concentração alta de glucagon, glicocorticoides e (nor) epinefrina no plasma (KERSTEN et al., 2000b; KERSTEN et al., 1999). Essa mudança hormonal ativa o catabolismo de lipídios, que promove a hidrólise e consequente liberação de triacilglicerídeos, que fornece energia média de 9,5kcal/g (FINN & DICE, 2006). Essa liberação constitui-se em uma contribuição importante para a homeostase da glicose durante o jejum, possivelmente, reduzindo a exigência de aminoácidos gliconeogênicos e poupando estoques de proteínas vitais (CARLSON et al., 1994).

A lipólise de triacilglicerídeos armazenados no tecido adiposo fornece ácidos graxos não-esterificados (ou livres) (NEFA) para serem usados como uma fonte de energia para outros tecidos. A quebra de triacilglicerídeos é mediada pela lipase hormônio sensível (LHS) e lipase dos triglicerídeos específica dos adipócitos (ATGL), também conhecida como desnutrina. Os ácidos graxos livres são lipossolúveis, e, sendo assim, são levados aos tecidos preferencialmente ligados à albumina (FINN & DICE, 2006).

Embora parte dos ácidos graxos liberados seja oxidada no tecido adiposo, eles são, preferencialmente, conduzidos para o fígado e metabolizados via sistema de enzimas da β -oxidação mitocondrial e peroxissomal (BLAVY et al., 2009; PALOU et al., 2010).

A glicose é produzida por meio da glicogenólise e gliconeogênese no fígado. Os ácidos graxos livres são capazes de aumentar a glicogenogênese hepática. A estimulação de gliconeogênese pelos ácidos graxos livres tem sido atribuída à produção de: 1) acetil-CoA, derivado da oxidação de ácidos graxos livres, 2) NADH, o qual é usado na formação de gliceraldeído 3-fosfato a partir de 1,3-bisfosfoglicerato, e 3) ATP, o qual é usado como fonte de energia (LAM et al., 2003).

Quando o jejum persiste por 24h, um aumento da demanda de produção de energia instaura-se no fígado, com o objetivo de produzir energia suficiente para a sobrevivência. Nessa situação, o fígado precisa manter o ciclo de Krebs intra-hepático para produção de ATP e gliconeogênese para fornecimento de glicose para os tecidos extra-hepáticos. Todavia o ciclo de Krebs e a gliconeogênese começam a lentificar em razão de que os dois processos requerem os mesmos intermediários e a taxa de oxaloacetato torna-se limitante. Como resultado, acumula-se acetil-CoA na mitocôndria, que é transformado por uma série de reações de condensação que produzem corpos cetônicos (FINN & DICE, 2006).

d. *Células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs)*

Segundo Chelly et al. (1989), os genes podem ser classificados em dois grupos: genes tecido-específicos, os quais são expressos exclusivamente em determinado estado de desenvolvimento de certos tecidos, e genes de expressão basal, que são expressos, essencialmente, em todas as células. O primeiro grupo codifica proteínas envolvidas em características funcionais e fenotípicas das células; o segundo grupo codifica proteínas estruturais ou enzimas ubíquas. Deste modo, transcritos de genes de doenças tecido-específicas são considerados existentes somente no tecido correspondente. Os autores sugeriram que qualquer gene pode ser transcrito em baixo nível, em qualquer tipo celular. Esse tipo de transcrição foi, então, chamado de “transcrição ilegítima”. Qualquer que seja o mecanismo da transcrição ilegítima, esse fenômeno fornece uma ferramenta poderosa para investigação de transcritos patológicos por meio do uso de células de fácil acesso (ex. células periféricas do sangue). Até o momento, o acesso a tecidos que possuem potencialmente alguma modificação metabólica ou patológica tem sido limitado pela dificuldade de se obter mRNAs pertinentes, quando esses estão localizados em células de difíceis acessos (ex. cérebro, fígado, pâncreas e coração), algumas vezes, em um baixo nível. A descoberta de que esses mRNAs estão virtualmente presentes em todos os tipos celulares e a possibilidade de amplificação exata de fragmentos de cDNA, pelo fácil acesso de células, ampliam a perspectiva para essa abordagem (CHELLY et al., 1989).

As células brancas do sangue migram por todo o corpo e respondem a vários sinais internos e externos. Um subconjunto de células brancas, conhecido como células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs), tem recebido grande interesse para diagnóstico. Há a vantagem das PBMCs em relação a outras células porque o sangue é o material celular mais acessível em humanos, e PBMCs podem ser isoladas a partir do sangue total, com relativa facilidade (BOUWENS et al., 2007). As mudanças induzidas pela nutrição na expressão gênica de PBMCs são, provavelmente, menores do que os efeitos descritos na observação de várias doenças. Porém a caracterização dos efeitos nutriente-específicos no metabolismo celular e controle homeostático poderão, no final, levar a um aconselhamento dietético baseado na prevenção de doenças, pela intervenção em um estado anterior à doença (LIEW et al., 2006; BOUWENS et al., 2007), ou estudo do processo da doença, incluindo câncer, doença autoimune, doenças genéticas e desordens metabólicas (WHITNEY et al., 2002). O conhecimento do mecanismo envolvido nos efeitos nutricionais na expressão gênica é de considerável importância nesse contexto, especialmente, no caso de PBMCs, uma vez que obter material celular alternativo, através de biopsias invasivas em tecidos, nem sempre é

viável, ou mesmo possível em voluntários saudáveis, por razões éticas (BOUWENS et al., 2007).

Estima-se que aproximadamente 16.400 genes são expressos em células sanguíneas humanas. Considerando que existem 20.000 a 25.000 genes codificadores de proteínas no genoma humano, isso indica que cerca de 66%-82% dos genes codificados no genoma humano são expressos em células sanguíneas humanas (LIEW et al., 2006). Aproximadamente 80% dos genes expressos, em qualquer um dos nove tecidos a seguir (Tabela 1), são, também, expressos em células sanguíneas (LIEW et al., 2006).

Tabela 1. Genes expressos em células periféricas do sangue compartilhado com um dos nove tecidos humanos

<i>Tecido</i>	<i>Cérebro</i>	<i>Cólon</i>	<i>Coração</i>	<i>Rim</i>	<i>Fígado</i>	<i>Pulmão</i>	<i>Próstata</i>	<i>Baço</i>	<i>Estômago</i>
Número de genes expressos	13961	13767	12440	13428	13840	15202	11706	13224	10898
Número de genes coexpressos no sangue	11428	11360	10472	11166	11490	12301	9955	10892	9408
Porcentagem de genes coexpressos no sangue	81,9%	82,5%	84,2%	83,2%	83,3%	80,9%	83,9%	85,0%	86,3%

Fonte: Liew et al. (2006)

A expressão gênica em PBMCs poderá ser utilizada para diagnóstico e desenvolvimento de estratégias terapêuticas na obesidade, bem como poderá ser aplicada a estudos atinentes a uma dieta mais personalizada, baseada em pesquisas de nutrigenômica (CRUJEIRAS et al., 2008).

Estudos recentes de repostas à exposição a dietas, por meio da análise do perfil de expressão gênica em células sanguíneas, sugerem que esse tipo de amostra pode ser aplicado para executar estudos nutrigenômicos (van ERK et al., 2006).

e. Genes de interesse

Recentemente, Bouwens et al. (2007) demonstraram que concentrações elevadas de ácidos graxos livres no plasma, durante o jejum, têm um efeito pronunciado na expressão gênica de células mononucleares periféricas no sangue, em particular, na expressão de genes-

alvo do PPAR α . Os genes *PDK4*, *CPT1A*, *CPT1B*, *SLC25A20*, *ACAA2* e *ACADVL* apresentaram uma maior média de alteração na expressão após 24 horas de jejum. Esses genes estão envolvidos na oxidação mitocondrial de ácidos graxos e na síntese de corpos cetônicos, em diversas etapas no hepatócito humano (RAKHSHANDEHROO et al., 2009) e na oxidação mitocondrial no musculoesquelético.

O complexo de piruvato desidrogenase (PDH) é o maior determinante da oxidação da glicose (BOWKER-KINLEY et al., 1998), catalisando a descarboxilação oxidativa do piruvato (componente E1), a transferência do grupo acetil resultante para CoA (componente E2) e a regeneração da lipoamida oxidada (componente E3). A reação vincula glicólise com metabolismo oxidativo pelo fato do produto acetil-CoA entrar no ciclo do ácido cítrico. A regulação da atividade PDH executa um importante papel na flexibilidade metabólica de órgãos, significando a escolha de quais substratos um órgão irá usar para manter a homeostase energética. Em condições normais, estado alimentado, a glicose é o substrato preferido de escolha para oxidação. Durante o jejum, a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos torna-se a mais importante fonte de energia, como uma alternativa para a glicose. A flexibilidade metabólica orquestrada pelo PDH é controlada através do ciclo de fosforilação/defosforilação, catalisado pelo piruvato desidrogenase quinase (PDK), o qual possui quatro isoformas (WU et al., 2001) que apresentam diferentes propriedades bioquímicas que são expressas de maneira tecido-específicas. Em especial no jejum e inanição, PDK2 e PDK4 possuem papel adaptativo nesse processo. O PDK4 é altamente responsivo em tecidos como coração, musculoesquelético e rins e sua regulação transcricional está vinculada à ativação por meio do PPAR α (HOUTEN et al., 2009).

A atividade do PDK é regulada por mecanismos de curto e longo prazo. A regulação em curto prazo inclui ativação do PDK através de produtos da reação do PDH, por exemplo, acetil-CoA e NADH. Portanto, altas taxas de acetil-CoA/CoA e NADH/NAD⁺ ativam PDK, levando a uma inibição fosforilativa do PDH. A regulação a longo prazo do PDK ocorre, primariamente, em nível transcricional (HOUTEN et al., 2009), e a ativação do PDK muscular em estados de inanição é representada pelo aumento da expressão proteica do PDK4 (WU et al., 1999). Inativação do PDH por fosforilação conserva compostos de carbono que podem ser convertidos em glicose através da gliconeogênese, no estado de jejum, auxiliando a conservação da homeostase dos níveis de glicose no sangue (WU et al., 2001).

O mecanismo, já demonstrado, que controla a fosforilação do PDH é produzido pela oxidação de ácidos graxos que estão abundantemente disponíveis no plasma durante o jejum (WU et al., 2001). Este fato favorece a hipótese de que, na obesidade, em uma condição

na qual há uma elevada oxidação de lipídios, a resistência à insulina pode ser relacionada, de certo modo, com o aumento da expressão do PDK (ROSA et al., 2003). Inanição e diabetes são condições evidentes de altos níveis de ácidos graxos livres, os quais podem alterar a expressão do PDK4 no musculoesquelético, por meio da ativação do PPAR α (ROSA et al., 2003). De modo semelhante, uma dieta rica em gordura é responsável pelo aumento drástico na expressão do PDK4 (FRYER et al., 1995; HOLNESS et al., 2000). A inativação do complexo do PDH devido à sua fosforilação, pelo aumento da atividade do PDK4, pode explicar o metabolismo deficiente da glicose e o estado de resistência à insulina, os quais estão presentes em uma série de doenças como obesidade, diabete tipo 2, hipertireoidismo e hipertensão. São caracterizadas, por níveis anormais de ácidos graxos livres no sangue, condições como jejum, dieta rica em gordura e exercícios (WU et al., 2001; ROSA et al., 2003).

A incorporação de ácidos graxos de cadeia longa, ativados no interior da mitocôndria e catabolizados por meio da β -oxidação, é realizada pelo sistema da carnitina palmitoiltransferase mitocondrial (CPT). CPT1, outro componente da membrana, é o principal passo regulador na via de β -oxidação. CPT1 é codificada pelo menos por dois genes, conhecidos como L-CPT1 (CPT1A ou CPT1- α) e M-CPT1 (CPT1B ou CPT1- β), no fígado (L-) ou músculo (M-). Enquanto a CPT1B é expressa no musculoesquelético, coração, testículo e tecido adiposo branco e marrom, a CPT1A tem uma distribuição mais generalizada (BRANDT et al., 1998; NAPAL et al., 2005).

A carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1) catalisa a reação inicial entre a mitocôndria e ácidos graxos de cadeia longa, um passo crucial na via de utilização de ácidos graxos celulares. A atividade da CPT1 é um determinante importante no fluxo da oxidação de ácidos graxos celular. A CPT1 catalisa a transferência do grupo acil da cadeia longa de ácidos graxos da coenzima A para carnitina. Uma translocase específica é localizada no interior da membrana mitocondrial e entrega acilcarnitina de cadeia longa na matriz mitocondrial, onde será reesterificada para acil-tioester através da CPT2. Acil-tioester na mitocôndria sofre β -oxidação, dessa maneira, gerando redução equivalente usada para produção de ATP via fosforilação oxidativa (BRANDT et al., 1998; MANDARD et al., 2004). Ambos os genes (CPT1 e CPT2) foram identificados como genes regulados positivamente pelo PPAR α através da região PPRE, presente em seus promotores (MANDARD et al., 2004).

A chave molecular que transfere os ésteres acilcarnitina, recém-convertidos, em troca de carnitina livre por toda a membrana mitocondrial na β -oxidação mitocondrial (TACHIBANA et al., 2009), é o Membro 20 do transportador da família 25

carnitina/acilcarnitina translocase (*SLC25A20*). Observa-se que a acetil-coenzima A acetil-transferase 2 (*ACAA2*) participa de processos como a biossíntese de colesterol, metabolismo de ácidos graxos e lipídios; e a Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (*ACADVL*) é uma das cinco acil-CoA desidrogenases (ACADs) que catalisa o passo inicial e limitante da β -oxidação de ácidos graxos (GENE, 2010).

2. Referências

Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11 (9): 351-6.

Blavy P, Gondret F, Guillou H, Lagarrigue S, Mantin PGP, van Milgen J, Radulescu O, Siegel A. A minimal model for hepatic fatty acid balance during fasting: application to PPAR alpha-deficient mice. *J Theor Biol.* 2009; 261(2): 266-278.

Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18(2): 139-43.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Euro J Clin Invest.* 2002; 32 (3): 14-23.

Bouwens M, Afman LA, Müller M. Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increase in fatty acid β -oxidation: functional role of peroxisome proliferator-activated receptor α in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(5): 1515-1523.

Bouwens M, Afman LA, Müller M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells reveals an individual gene expression profile response. *BMC Genomics.* 2008; 9: 262.

Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J.* 1998; 329(1): 191-196.

Brand, JM, Djouadi F, Kelly DP. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem*. 1998; 273(37): 23786-23792.

Carlson MG, Snead WL, Campbell PJ. Fuel and energy metabolism in fasting humans. *Am J Clin Nutr*. 1994; 60 (1): 29-36.

Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86 (8): 2617-2621.

Consitt LA, Bell JA, Houmard, JA. Intramuscular lipid metabolism, insulin action and obesity. *IUBMB Life*. 2009; 61(1): 47-55.

Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, Margareto J, Martínez A. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *OMICS*. 2008; 12(4): 251-261.

Finn PF, Dice JF, Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*. 2006; 22 (7-8): 830-844.

Fryer LG, Orfali KA, Holness MJ, Saggerson ED, Sugden MC. The long-term regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase by dietary lipid is dependent on fatty acid composition. *Eur J Biochem*. 1995; 229(3): 741-748.

Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α): At the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009; 205(1): 1-8.

Gene [Internet]. Acesso em: 13 Janeiro 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Guo L, Fang H, Collins J, Fan XH, Dial S, Wong A, Mehta K, Blann E, Shi L, Tong W, Dragan YP. Differential gene expression in mouse primary hepatocytes exposed to the peroxisome proliferator-activated receptor α agonists. *BMC Bioinformatics*. 2006; 7 (2): S18.

Holness MJ, Kraus A, Harris RA, Sugden MC. Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes*. 2000; 49(5): 775-781.

Houmard JA. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294(4) : 1111-1116.

Houten SM, Chegary M, te Brinke H, Wijnen WJ, Glatz JFC, Luiken JJFP, Wijburg FA, Wanders RJA. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(7): 1283-1294.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Pesquisa de Orçamento Familiar (POF- 2008/2009) - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Acessado em: 12 de Maio de 2011. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.

Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IKB- β . *Diabetes*. 2002; 51(7): 2005-2011.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990; 347(6294): 645-50.

Kelly DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol*. 1999; 277(6): 1130-1141.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999; 103(11): 1489-1498.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature.* 2000a; 405(6785): 421-424.

Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem.* 2000b; 275(37): 28488-28493.

Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002; 440 (2-3): 223-234.

Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohn GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279 (5): 1039-1044.

Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acids-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284 (5): 863-873.

Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006; 147(3): 126-32.

Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(4): 393-416.

Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Müller M, Kersten S. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem.* 2006; 281(2): 934-944.

Napal L, Marrero PF, Haro D. An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acids induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Mol Biol.* 2005; 354 (4): 751-759.

Palou M, Sánchez J, Priego T, Rodríguez AM, Picó C, Palou A. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. *J Nutr Biochem.* 2010; 21(1): 23-33.

Pastsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, März W, Tafuri S, Wahli W, Müller M, Kersten S. PPAR α governs glycerol metabolism. *J Clin Invest.* 2004; 114 (1): 94-102.

Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Müller M, Kersten S. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PLoS One.* 2009; 4(8): e6796.

Randle PJ, Gerland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963; 1(7285): 785-789.

Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 1998; 14 (4): 263-283.

Rosa G, di Rocco P, Manco M, Greco AV, Castagneto M, Vidal H, Mingrone G. Reduced PDK4 expression associates with increased insulin sensitivity in postobese patients. *Obes Res.* 2003; 11(2): 176-182.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Res.* 2007; 95974: 1-10.

Sudgen MC, Zariwala MG, Holness MJ. PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection. *Pharmacol Res.* 2009; 60(3): 141-150.

Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Yamasaki D, Ishimoto K, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. Regulation of the human SLC25A20 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human hepatoblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 389(3): 501-505.

van Erk MJ, Blom WA, van Ommen B, Hendriks HF. High-protein and high-carbohydrate breakfasts differentially change the transcriptome of human blood cells. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84(5): 1233-1241.

Whitney AR, Diehn M, Popper S, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(4): 1896-1901.

Wu P, Inskip K, Bowker-Kinley MM, Popov KM, Harris RA. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes.* 1999; 48(8): 1593-1599.

Wu P, Peters JM, Harris RA. Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287(2): 391-396.

CAPÍTULO II

1. Introdução

Tradicionalmente, a ciência nutricional esteve concentrada, principalmente, nas deficiências nutricionais e nos seus consequentes efeitos à saúde e doenças. Entretanto, ao longo das últimas décadas, gradualmente, as pesquisas têm focado nos estudos da interação entre a nutrição e doenças crônicas, incluindo câncer, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes (BÜNGER et al., 2007).

Em diversas partes do mundo, a prevalência da obesidade tem aumentado rapidamente (PASTOURIS et al., 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em 2015, haja 700 milhões de pessoas obesas (índice de massa corporal $\geq 30\text{kg/m}^2$) ao redor do mundo (CONSITT et al., 2009). No Brasil, aproximadamente, 50% da população acima dos 20 anos apresentam sobrepeso (índice de massa corporal $\geq 25\text{kg/m}^2$) e 16% já demonstram quadro de obesidade (índice de massa corporal $\geq 30\text{kg/m}^2$) (IBGE, 2010).

A obesidade está relacionada como um dos fatores desencadeadores de diversas doenças crônicas, como doenças coronarianas, hipertensão, diabetes tipo 2, síndrome metabólica (HOUMARD, 2008) e câncer (la VECCHIA et al., 2011). Assim, é importante identificar características que predisõem indivíduos à obesidade ou condições negativas que ocorrem durante o desenvolvimento da obesidade as quais alteram o metabolismo e o estado de saúde de maneira negativa (HOUMARD et al., 2008).

As concentrações de ácidos graxos plasmáticos são comumente elevadas em indivíduos obesos, especialmente, pelo fato do aumento da liberação de ácidos graxos para a corrente sanguínea estar associado com a expansão do tecido adiposo (BODEN & SHULMAN, 2002). O musculoesquelético possui um papel importante na oxidação lipídica do organismo. Em condições de jejum, a oxidação lipídica é a atividade metabólica predominante e, essa atividade, contribui significativamente para a homeostase energética desse tecido, pois 90% do requerimento energético do musculoesquelético em repouso são obtidos através da oxidação de ácidos graxos (KIM et al., 2000). Alguns estudos sugerem que a oxidação lipídica muscular é reduzida em indivíduos obesos, como consequência do aumento da concentração intramuscular de triacilglicerídeos (KIM et al., 2000). Os triacilglicerídeos são a forma lipídica pela qual os ácidos graxos, na sua maioria, são armazenados no tecido adiposo (NAPAL, et al., 2005).

Durante o jejum, os ácidos graxos são a fonte de energia primária para o fígado, córtex renal e miocárdio (BODEN & SHULMAN, 2002). O metabolismo hepático dos ácidos

graxos livres é responsável pela homeostase da concentração plasmática de glicose em todo o organismo (CARLSON et al., 1994), através da gliconeogênese. Durante um jejum prolongado, o metabolismo hepático de ácidos graxos começa a lentificar e, então, inicia-se a consequente geração de corpos cetônicos, que podem fornecer a energia necessária para a homeostase das funções cerebrais (FINN & DICE, 2006).

O metabolismo de nutrientes e a homeostase energética são fortemente controlados por numerosos sistemas regulatórios envolvendo fatores específicos de transcrição. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores transcricionais ativados por ligantes e pertencem à superfamília de receptores hormonais nucleares (PATSOURIS et al., 2004; RAKHSHANDEROO et al., 2009). Os PPARs possuem três isótopos: PPAR α , PPAR β e PPAR γ (PATSOURIS et al., 2004), e se ligam a elementos específicos na região promotora de genes-alvo, ativando a transcrição após formar um heterodímero com RXR e em resposta à ligação de ligantes (KERSTEN et al., 2000). Dentre os ligantes do PPAR α , os ácidos graxos livres são os ligantes endógenos preferenciais, especialmente, durante o jejum, período em que os ácidos graxos são lançados para a corrente sanguínea. Contudo dietas ricas em lipídios também têm demonstrado ativar o PPAR α (MANDARD et al., 2004).

O PPAR α possui um papel central no catabolismo de ácidos graxos através da alteração da expressão de inúmeros genes envolvidos na oxidação mitocondrial e peroxissomal de ácidos graxos, gluconeogênese, biotransformação, metabolismo do colesterol (STIENSTRA et al., 2007), regulação do metabolismo de aminoácidos e inflamação (BOUWENS et al., 2008).

Os estudos das alterações de expressão do PPAR α , e consequente mudança de expressão de genes-alvo, têm sido realizados em menor escala em humanos devido às dificuldades de obtenção de amostras biológicas, em especial, em indivíduos saudáveis. O sangue é um dos poucos tecidos de fácil acesso e que não traz qualquer prejuízo ao voluntário. Estima-se que aproximadamente 16.400 genes são expressos em células sanguíneas humanas. Considerando que existem 20.000 a 25.000 genes codificadores de proteínas no genoma humano, isso indica que cerca de 66%-82% dos genes codificados no genoma humano são expressos em células sanguíneas humanas (LIEW et al., 2006).

Segundo Crujeiras et al. (2008), a expressão gênica em células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs) é uma ferramenta importante para o diagnóstico e desenvolvimento de estratégias terapêuticas na obesidade e poderá ser aplicada a estudos para uma dieta mais personalizada, baseada em pesquisas de nutrigenômica. Bouwens et al. (2007)

demonstraram que é possível observar mudanças no perfil de expressão gênica de PBMCs de voluntários saudáveis, após 24 e 48 horas de jejum, quando as concentrações de ácidos graxos estão elevadas. Em indivíduos obesos, a expressão de genes-alvo do PPAR α pode ser diferente de indivíduos não-obesos após 24 horas de jejum, porque os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres em indivíduos obesos são comumente elevados, e esse aumento pode desencadear alterações metabólicas e morfológicas em mitocôndrias.

O objetivo deste estudo foi avaliar diferenças na expressão de genes-alvo do PPAR α e na concentração plasmática de ácidos graxos livres no sangue, entre indivíduos obesos e não-obesos, após 24 horas de jejum.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostra estudada

Foram selecionados quarenta e cinco homens voluntários, com idades entre 21 e 65 anos, recrutados dentre os servidores da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil, para uma primeira avaliação. Os indivíduos foram selecionados e divididos de acordo com o índice de massa corporal (IMC), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011a). Os indivíduos que apresentaram $IMC \geq 18,50 \text{kg/m}^2$ e $\leq 29,99 \text{kg/m}^2$ foram incluídos no grupo controle, não-obesos (n=14), e os que apresentaram $IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$ foram incluídos no grupo de obesos (n=10). Foram excluídos indivíduos que apresentaram concentração de glicose na urina acima da normalidade ou concentração sanguínea de glicose, após jejum, maior ou igual a 100mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Outros critérios de exclusão adotados foram: uso de tabaco, uso crônico de medicamentos para *diabetes mellitus* ou dislipidemias, e indivíduos diagnosticados com condições médicas crônicas (por exemplo, diabetes, hemofilia, doenças cardiovasculares, anemia, doenças gastrointestinais). O Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina aprovou o protocolo do estudo (CAAE N°. 0190.0.268-09), e todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participarem do estudo.

2.2 Delineamento do estudo

Na primeira avaliação, os indivíduos responderam a um questionário padrão para registrar as informações pessoais, hábitos alimentares, história familiar de doenças crônicas, atividade física, uso de medicamentos e hábito de fumar. Nessa avaliação, coletou-se amostra de urina (10 a 20mL) (DATASUS, 2002), de sangue venoso, após jejum de oito horas, e

calculou-se o IMC com base na altura e peso dos indivíduos. Vinte e quatro indivíduos que completaram os critérios de seleção foram incluídos no estudo, realizado com todos durante o mesmo período. Estes indivíduos receberam alimentação idêntica, às 17:00 horas, antes do início do período de 24 horas jejum. Essa alimentação, balanceada por uma nutricionista, continha porções de: arroz, feijão, legumes, salada e carne bovina grelhada. Durante o período de jejum, os indivíduos não comeram nem beberam, exceto água, cujo consumo poderia ser *ad libitum*. A partir das 12 horas de jejum, os indivíduos permaneceram em constante observação. Após as 24 horas de jejum, os indivíduos receberam uma dieta leve, que continha as mesmas porções de alimentos, exceto a carne bovina que foi trocada por filé de frango grelhado. No início e após 24 horas de jejum, 5mL de sangue foram coletados em tubos revestidos com EDTA (BD) e 5mL em tubos com gel separador com ativador de coágulo (BD), utilizando um sistema de coleta a vácuo (Vacutainer[®], BD). Nesses períodos, também se coletou sangue venoso para dosagem da concentração da glicose, aferiu-se a pressão arterial sanguínea e mediu-se a circunferência da cintura dos indivíduos.

2.3 Determinação da concentração de glicose no sangue e na urina, e níveis de ácidos graxos livres no plasma

A concentração de glicose no sangue venoso foi realizada utilizando-se o kit Accu-Check Active (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) e para a determinação da presença de glicose na urina, utilizou-se tiras reagente para análise de urina (Uri-test 11, Alamar Tecno – Científica Ltda). Os níveis de ácidos graxos livres no soro, por meio de espectrofotometria cinética, teste realizado pelo Laboratório Sérgio Franco Medicina Diagnóstica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

2.4 Isolamento das células mononucleares periféricas no sangue (PBMCs)

Imediatamente após a coleta de sangue, as PBMCs foram isoladas por centrifugação, com Histopaque[®] (densidade 1.077 – Sigma-Aldrich, Inc.), coletadas e lavadas com tampão RPMI 1640- HEPES (Alamar Tecno – Científica Ltda), de acordo com Verma & Babu (1995).

2.5 Extração do RNA total

O RNA total das PBMCs foi isolado a partir de todas as amostras com TRIZOL LS[®] (cat. 15596-026, Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor. O RNA isolado foi quantificado em espectrofotômetro (Eppendorf, Alemanha), sendo que a razão A260/280

manteve-se entre 1,9 e 2,1, e a integridade foi confirmada usando eletroforese (80V, 30mA, 30 minutos) em gel de agarose 0,4% (UltraPure™, cat. 15510-019, Invitrogen). As amostras que apresentaram bandas no gel, referente à DNA, foram tratadas com DNase I® (cat. 18068-015, Invitrogen), e a integridade e quantificação foram verificadas novamente.

2.6 Síntese de cDNA

RNA total (500ng/mL, em um volume final de 2µL) foi adicionado a um *mix* contendo: água DEPC (cat. 750023, Invitrogen), OligodT 10pmol/µL (cat. 10297-018, Invitrogen), tampão M-MLV (cat. 28025-013, Invitrogen), RNase Out™ (cat. 10777-019, Invitrogen) e Transcriptase Reversa M-MLV (cat. 28025-013, Invitrogen). Esse *mix* foi então colocado no termociclador (Tchne Duxford, Reino Unido) para dar-se início à transcrição reversa para cDNA a 37°C, por 50 minutos, com uma etapa final de 15 minutos a 70°C. O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro.

2.7 PCR convencional

Após síntese do cDNA, foi realizada uma reação de PCR convencional para avaliar a qualidade do material. Para isso foi escolhido o gene *GAPDH* como um padrão de expressão constitutiva, que, segundo Chege et al. (2010), comportou-se de forma estável em PBMCs. Mori et al. (2008) e Zainuddin et al. (2010), também demonstraram que o *GAPDH* pode ser usado como controle interno em estudos de tecidos de câncer de próstata fixado com formalina e embebidos em parafina e em fibroblastos diplóide humano, respectivamente. Além disso, o *GAPDH* mostrou-se estável em testes realizados no nosso laboratório. Após a quantificação em espectrofotômetro (Eppendorf, Alemanha) e verificação da qualidade do cDNA, por meio de eletroforese (40V, 30mA, 60 minutos) em gel de agarose 2% (UltraPure™, cat. 15510-019, Invitrogen), foi realizada uma nova reação de PCR para verificar as eficiências dos *primers forward* e *reverse* dos genes: Piruvato desidrogenase quinase isoforma 4 (*PDK4*); Carnitina palmitoiltransferase 1A (*CPT1A*); Carnitina palmitoiltransferase 1B (*CPT1B*); Acetil-Coenzima A desidrogenase 2 (*ACAA2*); Transportador da família 25 (carnitina/acilcarnitina translocase), membro 20 (*SLC25A20*) e Acil-Coenzima A desidrogenase, cadeia longa (*ACADVL*). As sequências de *primers* estão disponíveis no PrimerBank (<http://www.pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) e descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos dos *primers* e condições do ciclo usado para amplificação por RT-PCR

Gene	Forward primer (5' para 3')	Reverse primer (5' para 3')	Condições do ciclo
<i>PDK4</i> ¹	TGGAGCATTCTCGCGCTAC	ACAGGCAATTCTTGTCGCAAA	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s
<i>CPT1A</i> ¹	TCCAGTTGGCTTATCGTGGTG	CTAACGAGGGGTCGATCTTGG	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s
<i>CPT1B</i> ¹	TACGGGCAGATAAACCAAA	ACAGCATAACCAACACCAAAGC	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s
<i>ACAA2</i> ¹	CTGCTCCGAGGTGTGTTTGTA	GCAGCAAATTCAGACAAGTCAGT	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s
<i>SLC25A20</i> ¹	GACCAGCCAAAACCCATCAG	GCCCTCTCTAAAAAGAGTCTTCC	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s
<i>ACADVL</i> ¹	GTCTGGTGGTCTCTACCGC	CACGGGTCCCAAGAACTGAT	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s
<i>GAPDH</i> ²	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GGAAGATGGTGATGGGATTT	95°C por 20s 60°C por 15s 72°C por 20s

¹ Bouwens et al. (2007)

² Sugaya et al. (2005)

2.8 PCR em tempo real quantitativo

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada para avaliar os níveis de expressão do mRNA dos genes-alvo.

As qRT-PCR quantitativas (Q-PCR) foram realizadas no termociclador *PTC 200 DNA Engine Cycler*, usando o sistema de detecção *Chromo4* (MJ Research). Foi utilizado na reação *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG* (cat. 11733-038, Invitrogen). Após uma ativação inicial do *Platinum[®] SYBR[®] Green* a 95°C, por 5 minutos, as reações foram realizadas em 40 ciclos de acordo com as condições especificadas na Tabela 1. Para verificar a pureza dos produtos uma curva de *melting* foi produzida ao final de cada reação,

posteriormente à incubação a 95°C, por 10 segundos, e 40°C, por 1 minuto, e, a partir de então, a curva de *melting* foi produzida de 60°C, a 98°C, e lida a cada 0,5°C, por 2s. Cada amostra de cDNA foi analisada em três repetições técnicas para cada gene em estudo. Os dados da Q-PCR foram normalizados por meio da avaliação da razão do Ciclo Threshold (Ct) entre os genes candidatos e o gene constitutivo, que foi amplificado em conjunto com os genes-alvo.

2.9 Análise estatística

Os valores do cálculo da razão foram transformados em $\log(2)$. Os valores apresentados estão como médias. Um teste *t* de Student pareado bicaudal foi utilizado para determinar as diferenças significantes nas concentrações de ácidos graxos livres no plasma, glicose, pressão arterial e para os valores da expressão gênica realizada por Q-PCR, entre o tempo 0 e 24 horas de jejum. Na comparação das variáveis entre os grupos de indivíduos, foi utilizado teste *t* de Student não-pareado bicaudal. Foram considerados valores significantes onde o *p* apresentou-se <0,05 (*), <0,025(**) e <0,001 (***). A análise foi realizada através do *software* de estatística SPSS 17.0.

3. Resultados

3.1 Características dos indivíduos estudados

Todos os voluntários completaram o período de jejum sem apresentarem alterações clínicas. As características da população estudada constam na Tabela 2.

Tabela 2- Características da população estudada de acordo com os grupos obeso e não-obeso

	Obeso (n=10)	Não-obeso (n=14)
	Média ± SD	Média ± SD
Idade (anos)	40,7 ± 7,8	41,1 ± 13,8
Altura (m)	1,73 ± 0,08	1,71 ± 0,08
Peso (kg)	97,17 ± 10,8***	68,21 ± 8,0
IMC (kg/m²)	32,3 ± 2,6***	23,39 ± 2,9
Circunferência da cintura (cm)	104,85 ± 6,0***	85,18 ± 10,1
Pressão arterial sistólica (mm/Hg)	127 ± 14,2	119 ± 14,4
Pressão arterial diastólica (mm/Hg)	81,5 ± 7,5	77 ± 9,1

Glicemia basal^a (mg/dL)	94,8 ± 10,5	86,6 ± 9,2
---	-------------	------------

^a Glicose basal foi determinada após jejum noturno de 8 horas. Os asteriscos indicam mudança estatisticamente significante comparada com o grupo não-obeso (***) $p < 0,001$). As significâncias foram determinadas através do Teste *t* de Student não-pareado bicaudal.

O jejum realizado durante o estudo resultou em uma diminuição da concentração da glicose de uma média de 124,6mg/dL no grupo obeso e 129,1mg/dL no grupo não-obeso, após a alimentação, para uma média de 91mg/dL e 89,2mg/dL, respectivamente, após o jejum de 24 horas. O jejum não alterou, de modo significante, a concentração de glicose basal em comparação com a glicose após 24 horas de jejum (Figura 1). Os valores médios da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) estão apresentados na Figura 2. Em ambos os grupos (obeso e não-obeso), a concentração plasmática de AGL elevou-se de forma significante após as 24 horas de jejum (Figura 2A), em especial, no grupo não-obeso, onde a média da concentração elevou-se 3 vezes se comparada com a média da concentração no tempo 0h. A média da concentração plasmática basal (0h) de AGL apresentou-se 2 vezes maior no grupo obeso quando comparada com a média do grupo não-obeso. No entanto essa diferença não foi observada após as 24h de jejum (Figura 2B). As características da dieta dos indivíduos, assim como a frequência de exercícios físicos, foram também avaliadas. Embora não houvesse diferença significante na frequência de consumo de verduras, legumes, frutas e massas, além do modo como os alimentos proteicos (carnes, aves e peixes) eram preparados (APÊNDICE A), entre os grupos, 71,43% dos indivíduos do grupo não-obeso praticavam atividades físicas, enquanto, no grupo obeso, apenas 40% faziam-no em uma frequência baixa (menos de 3 vezes por semana). Embora o desvio padrão das idades, nos grupos, tenha-se demonstrado elevado, não houve diferença estatisticamente significante quando ajustou-se as variáveis de acordo com a idade.

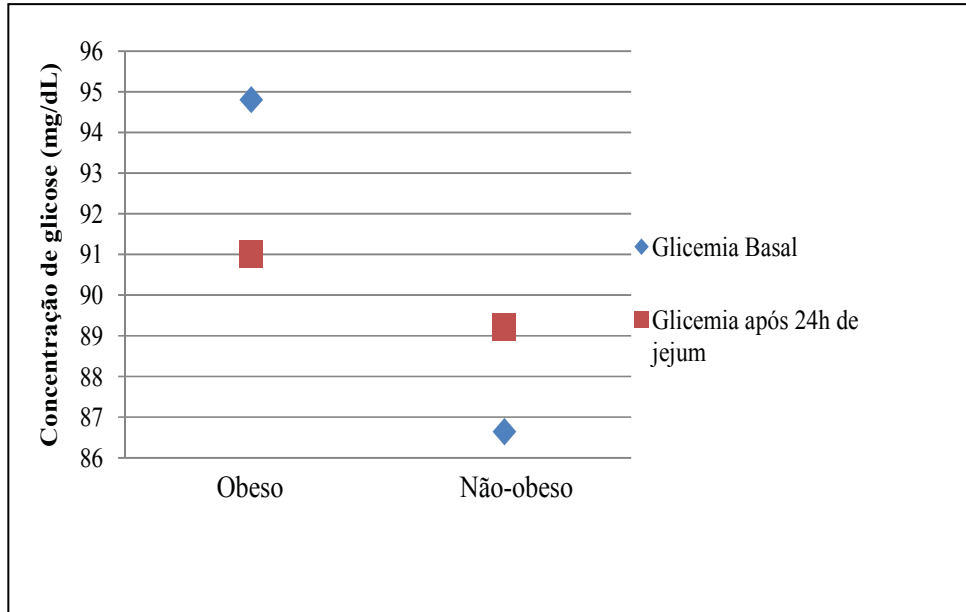
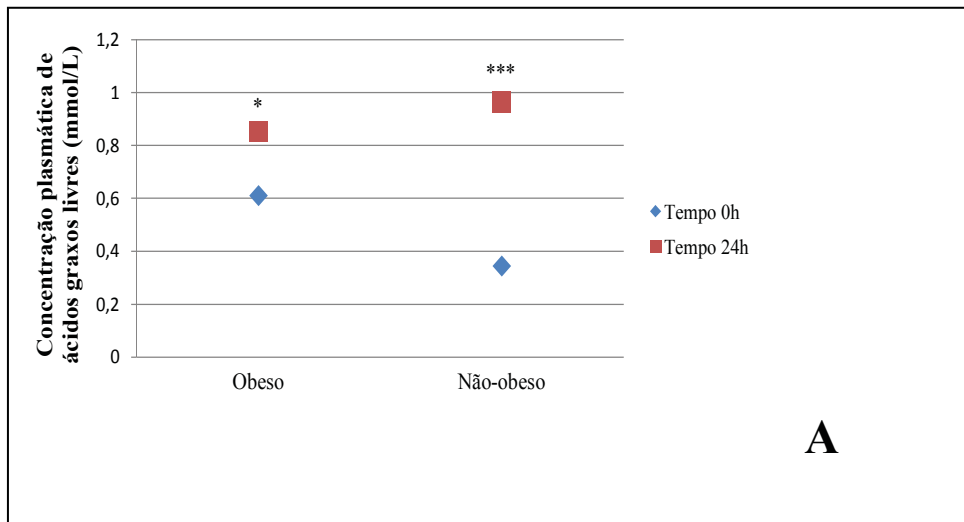


Figura 1- Glicose basal e após 24h de jejum, nos grupos obeso e não-obeso. As significâncias foram determinadas através do Teste *t* de Student pareado bicaudal. Os símbolos representam os valores das médias para T=0h (◆) e T=24h (■).



A

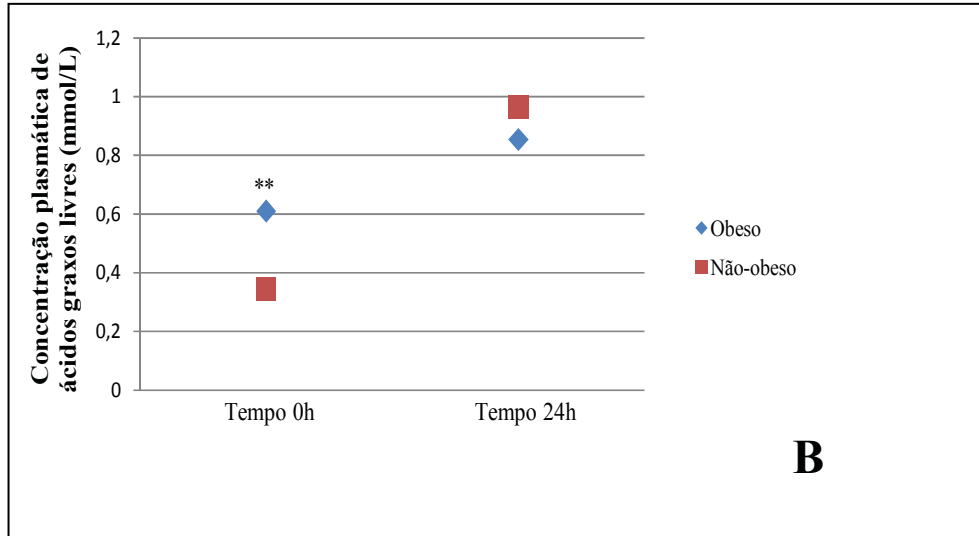


Figura 2- Médias da concentração plasmática de ácidos graxos livres, nos tempos 0h e 24h de jejum, em indivíduos obesos e não-obesos. Os asteriscos indicam mudança estatisticamente significativa quando comparado ao T=0h (A) e ao grupo não-obeso (B) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,001$). As significâncias foram determinadas através do Teste t de Student pareado (A) e não-pareado (B) bicaudal. Símbolos representam valores das médias para T=0h (◆) e T=24h (■) (A), ou obeso (◆) e não-obesos (■) (B).

3.2 Expressão gênica

O gene para a carnitina palmitoiltransferase 1A, CPT1A, foi o que apresentou maior média de mudança de expressão (*fold change*) dentre os genes avaliados, com um aumento de 6,1120 e 4,4243 nos grupos obeso e não-obesos, respectivamente. A Tabela 3 elenca a relação dos genes estudados com suas respectivas médias de mudança de expressão, após o jejum de 24 horas. Esses genes são ativados por PPAR α e estão envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos, no fígado e no musculoesquelético.

Tabela 3- Valores médios da expressão (Média de *fold change*) de diferentes genes, em células mononucleares periféricas do sangue, ativados por PPAR α

Genes	Grupo obeso ^a	Grupo não-obeso ^a
	Média de <i>fold change</i>	Média de <i>fold change</i>
<i>PDK4</i>	3,5959	2,2126
<i>CPT1A</i>	6,1120	4,4243
<i>CPT1B</i>	0,8739	1,1603
<i>SLC25A20</i>	2,7943	1,1479

<i>ACAA2</i>	1,7961	1,4248
<i>ACADVL</i>	2,1846	1,5819

^a Todos os genes apresentaram um aumento na regulação, comparados com o T=0h.

Assim como o gene da CPT1A que apresentou maior média de mudança de expressão, o gene para piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4) além de apresentar significativo valor de *fold change*, também assinalou a segunda maior média de mudança de expressão estatisticamente significativa, com valor de *p* igual a 0,0047 e 0,0033 nos grupos obeso e não-obeso, respectivamente, quando a expressão foi comparada com o tempo 0h. A Figura 3 apresenta os valores médios da expressão gênica (*fold change*) de genes ativados por PPAR α , após 24 horas de jejum, quando comparados ao tempo 0h. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao se comparar a expressão dos diferentes genes após o período de jejum, embora seja visível que os genes tiveram maior mudança na expressão gênica (*fold change*) no grupo obeso, com exceção do gene CPT1B, que apresentou um discreto incremento no grupo não-obeso.

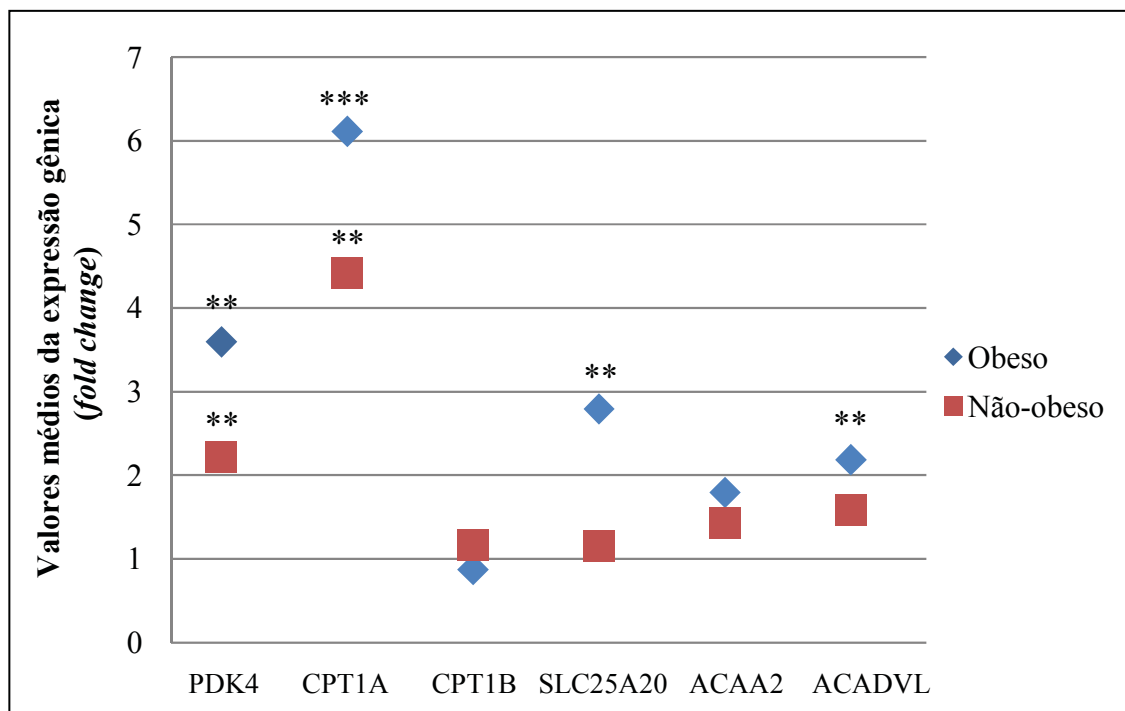


Figura 3- Valores médios da expressão de genes ativados por PPAR α após 24h de jejum, nos grupos obeso e não-obeso. Os valores de *p* foram determinados através do Teste *t* de Student pareado bicaudal. Os asteriscos indicam mudança estatisticamente significativa (** *p* < 0,025; *** *p* < 0,001). Os símbolos representam valores das médias para obesos (◆) e não-obesos (■)

As expressões dos genes CPT1B e CPT1A que participam da β -oxidação no musculoesquelético e no fígado, respectivamente, foram comparadas para determinar que via de β -oxidação foi utilizada, preferencialmente, durante o período de jejum de 24h. A Figura 4

mostra um gráfico onde é possível visualizar que, em ambos os grupos, o gene envolvido na β -oxidação hepática (CPT1A) apontou maior valor médio de expressão, estatisticamente significante, quando comparado com o gene CPT1B. Esse fato é, ainda, mais evidente no grupo obeso (Figura 4).

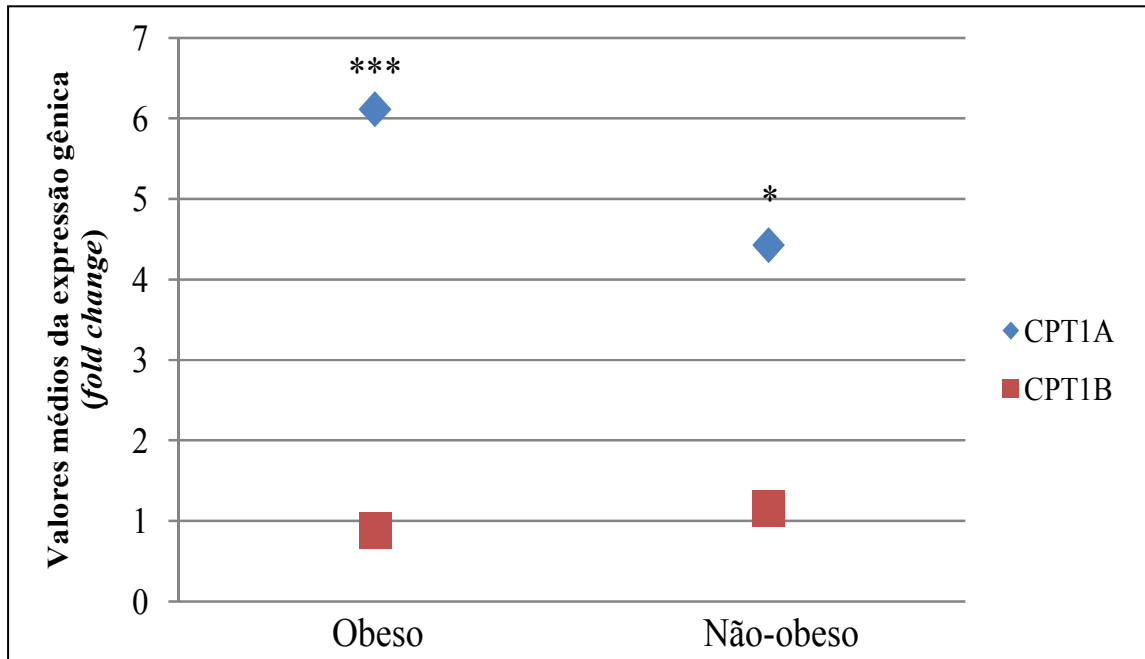


Figura 4- Valores médios da expressão dos genes CPT1A e CPT1B em obesos e não-obesos, após 24h de jejum. Os valores de p foram determinados através do Teste t Student pareado bicaudal. Os asteriscos indicam mudança estatisticamente significante (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Os símbolos representam valores das médias para o gene CPT1A (◆) e para o gene CPT1B (■).

4. Discussão

O PPAR α é o fator-chave na resposta celular metabólica ao jejum. Em resposta ao jejum e a outras condições fisiológicas conhecidas por causarem uma incompatibilidade entre a utilização e absorção lipídica celular, o PPAR α é ativado por um ligante lipídico endógeno, induzindo a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e, assim, aumentando a capacidade de utilização de ácidos graxos livres (AGL) nas células (LEONE et al., 1999; SUGDEN et al., 2009).

No presente estudo, detectou-se que uma concentração plasmática elevada de AGL, durante o jejum, tem um efeito pronunciado na expressão gênica, em células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs), particularmente, na expressão de genes-alvo do PPAR α . Todos os genes avaliados no estudo em foco apresentaram um incremento na regulação da expressão (Tabela 3), nos grupos obeso (n=10) e não-obeso (n=14),

demonstrando que os mesmos são regulados pelo PPAR α , o que é justificado pela presença de elementos de resposta a proliferador de peroxissomo (PPRE) em suas regiões promotoras (BRANDT et al., 1998; MASCARÓ et al., 1998; BARRERO et al., 2003; LEMAY & HWANG, 2006).

Bouwens et al. (2007) já haviam descrito que uma concentração plasmática alta de AGL é capaz de ativar a expressão de genes-alvo do PPAR α após o jejum, em um grupo de indivíduos holandeses (n=4), em PBMCs. No entanto o presente estudo é o primeiro realizado na população brasileira apontando a expressão de genes-alvo do PPAR α após o jejum, em PBMCs. Os resultados obtidos, utilizando-se PBMCs, indicam que este tipo celular pode ser usado para monitorar efeitos sutis na expressão de genes, associados com uma intervenção dietética (BOUWENS et al., 2007).

Durante o jejum, os ácidos graxos livres acumulam-se nos hepatócitos, miócitos cardíacos, células renais tubulares e no tecido musculoesquelético, onde são oxidados (β -oxidação), na mitocôndria em acetil-CoA, para serem usados no ciclo de Krebs ou produção de corpos cetônicos (FINN & DICE, 2006). A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é um sinalizador para níveis baixos de energia. A ativação desta proteína inicia uma sinalização em cascata visando a restabelecer os níveis de energia celular. O evento principal é a fosforilação do acetil-CoA carboxilase (ACC), o qual converte acetil-CoA em malonil-CoA, inibidor da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1) (HOUTEN et al., 2009).

O acúmulo de AGL nos hepatócitos resulta na conversão desses em acil-CoA, através da enzima citosólica acil-CoA sintetase. O acil-CoA não pode ser diretamente transferido para o interior da mitocôndria, o que torna esse passo um ponto importante na regulação da β -oxidação de ácidos graxos. Para o acil-CoA ser transferido ao interior da mitocôndria, o grupo acil deve ser transferido do CoA para a carnitina através da membrana mitocondrial e, depois, transferido novamente de carnitina para CoA. Esse processo é realizado pelas enzimas carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), na membrana externa, e carnitina palmitoiltransferase 2 (CPT2), na membrana interna da mitocôndria (FINN & DICE, 2006). Duas isoformas de CPT1 têm sido descritas, as quais foram designadas como CPT1A (L) e CPT1B (M), pois essas isoformas são preferencialmente expressas no fígado e no músculo, respectivamente. A CPT1B é também expressa no coração e tecido adiposo branco e marrom (MASCARÓ et al., 1998).

O estágio final da β -oxidação na mitocôndria ocorre através de uma variedade de reações enzimáticas que, por fim, conduz à produção de acetil-CoA. A entrada de AGL na mitocôndria é um processo regulado. Como ocorre a diminuição de glicose no sangue, o

mesmo acontece com os níveis de glicólise celular, resultando em uma diminuição da atividade do ACC. Uma vez que a produção de malonil-CoA diminui, a CPT1 torna-se ativa e os AGL podem entrar na mitocôndria (FINN & DICE, 2006; HOUTEN et al., 2009). Desta forma, os ácidos graxos são usados como principal fonte de energia para as células durante o jejum (BOUWENS et al., 2007).

Alguns estudos apontam diferenças na expressão de genes-alvo do PPAR α , entre indivíduos obesos e não-obesos, especialmente em genes envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos no musculoesquelético, tendo a expressão gênica e atividade de CPT1B diminuídas em indivíduos obesos (KELLY et al., 1999; KIM et al., 2000). No presente estudo, embora não se tenha encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos (obesos e não-obesos), a expressão gênica da CPT1B apresentou-se ligeiramente menor no grupo obeso, com um *fold change* de 0,8739 e 1,1603, nos grupos obeso e não-obeso, respectivamente. Kim et al. (2000), examinando a oxidação de ácidos graxos no músculo vasto lateral em mulheres magras (IMC 23,8kg/m²) e obesas (IMC 38kg/m²), detectaram uma redução de, aproximadamente, 100% na oxidação de ácidos graxos. No entanto, de acordo com Hulver et al. (2002), uma característica que deve ser considerada, ao se estudar expressão gênica em grupos de indivíduos obesos, é o grau de obesidade. Hulver et al. (2002), assim como Steinberg et al. (2002), não encontraram uma atividade de β -oxidação muscular diminuída em indivíduos com obesidade leve (IMC 30kg/m² e 33kg/m², respectivamente), característica comum ao grupo de estudo focalizado nesta pesquisa (IMC 32kg/m²).

Outra razão plausível para a não-observância de diferença estatisticamente significativa da CPT1B entre os grupos é o fato de que, nos indivíduos obesos, apenas as médias do índice de massa corporal (IMC) da circunferência da cintura e do peso estivessem aumentadas em relação ao grupo não-obeso (Tabela 2), então, apresentando valores de *p* igual a 1,46E-07, 5,99E-06 e 2,28E-06, respectivamente. Embora os grupos apresentassem associação positiva com alguns dos critérios novos para síndrome metabólica (ALBERTI et al. 2009), esse indivíduos ainda não apresentavam nenhum diagnóstico para anormalidades clínicas resultantes da obesidade. Outro dado importante é que o padrão alimentar não apresentou resultados conflitantes entre os grupos e nem mesmo a diferença da média da altura revelou-se estatisticamente significativa (*p* = 0,50), dessa maneira, fundamentando que o IMC aumentado derivou, exclusivamente, do peso. Ainda em atinência às características inerentes aos grupos, pôde-se aferir que o fator determinante para o desenvolvimento da obesidade foi o baixo número de indivíduos que praticavam atividades físicas no grupo obeso, 40% (n=10) contra 71,43% (n=14) dos indivíduos do grupo não-obeso, conquanto que tais

atividades físicas fossem praticadas em uma frequência baixa, menos de 3 vezes na semana. A OMS preconiza que entre adultos de 18 a 64 anos, seja realizado, por semana, pelo menos, 150 minutos de atividade física com intensidade aeróbica moderada para redução do risco de doenças não-transmissíveis, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (OMS, 2011b)

Ao se identificar qual a via de β -oxidação preferencial durante o jejum, o gene da CPT1A, com *fold change* de 6,1120 e 4,4243 nos grupos obesos e não-obesos, respectivamente, evidenciou um incremento no *fold change* em comparação com a CPT1B (0,8739 e 1,1603, respectivamente), assinalando, assim, que a β -oxidação ocorreu de uma maneira maior no fígado (Figura 4). No entanto, no grupo obeso, foi possível visualizar que esse fato se deu de uma forma muito mais pronunciada, com um valor de p igual a 1,15E-03 contra 2,69E-02 no grupo não-obeso, assim, sinalizando que, de fato, pode haver uma menor expressão da CPT1B, e isso pode estar associado com o início de uma resistência à insulina. Essa a maior liberação de ácidos graxos para o fígado, no grupo obeso, é comumente encontrada em indivíduos com aumento na adiposidade visceral (PALOU et al., 2010). Analisou-se, também, o coeficiente de determinação (R^2), para determinar se a expressão diminuída da CPT1B poderia ser explicada pela circunferência da cintura aumentada, porém não foi encontrada nenhuma associação, haja vista que o valor de R^2 foi de 12,65% e 0,42%, para os grupos obeso e não-obesos, respectivamente, embora, seja possível observar que essa associação está mais ligada ao grupo obeso.

Os genes estudados participam diretamente na β -oxidação mitocodrial hepática e musculoesquelética (MANDARD et al., 2004; RAKHSHANDEHROO et al., 2009). Assim como demonstrado por Bouwens et al. (2007), neste estudo, um dos genes com aumento na regulação de forma mais pronunciada foi o piruvato desidrogenase quinase (PDK4) em ambos os grupos estudados, com *fold change* de 3,5959 e 2,2126 nos grupos obeso e não-obeso, respectivamente. O papel do PDK4, durante o jejum, é de fosforilar e inativar o complexo de piruvato desidrogenase (PDH), dessa forma, diminuindo a oxidação da glicose (BOUWENS et al., 2007; HOUTEN et al. 2009). Os resultados da concentração da glicemia, no estudo em análise, corroboram este fato, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre a glicemia basal e após 24h de jejum (Figura 1). Portanto é possível verificar que o mecanismo de PDK4, além de evitar a oxidação da glicose, pode permitir que a glicólise continue a gerar piruvato e lactato, os quais, posteriormente, podem ser convertidos em glicose no fígado (SUGDEN et al., 2009), por conseguinte, mantendo os níveis de glicose durante um período de jejum.

Apesar do aumento da expressão do PDK4, o gene que apresentou o aumento na expressão, estatisticamente significativa e de forma mais pronunciada, após as 24h de avaliação, foi a carnitina palmitoiltransferase 1A (CPT1A), com valor de p a $1,20E-03$ e $1,08E-02$ nos grupos obeso e não-obeso, respectivamente. A CPT1A, como já citado, é a principal enzima envolvida no catabolismo de ácidos graxos nas mitocôndrias hepáticas (FRUNCHART, 2009). Esse aumento na regulação da expressão da CPT1A, portanto, indica um conseqüente aumento na β -oxidação com o intuito de suprir a demanda energética nos tecidos extra-hepáticos. O aumento na expressão de CPT1A é um dos processos essenciais na resposta metabólica à manutenção do balanço celular lipídico em tecidos como o fígado, que aumentam a absorção e utilização de ácidos graxos no jejum (LEONE et al., 1999).

Por fim, embora não houvesse diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo, quanto à regulação da expressão gênica nos genes estudados, os resultados observados no grupo obeso são ligeiramente mais pronunciados do que no grupo não-obeso (Tabela 3). O fato da concentração plasmática de AGL, no tempo 0h, estar 2 vezes maior no grupo obeso, $0,61\text{mmol/L}$ contra $0,34\text{mmol/L}$ no grupo não-obeso, reforça a expressão gênica aumentada após 24h de jejum, nesse grupo. É comum aos indivíduos obesos que a concentração plasmática de AGL esteja cronicamente elevada (BODEN & SHULMAN, 2002). No entanto, no decorrer do jejum, essa diferença na concentração plasmática de AGL, entre os grupos, diminui e torna-se sem diferença estatística, após as 24h ($p = 0,10$), principalmente pelo aumento, em 3 vezes, na concentração plasmática de AGL no grupo não-obeso ($0,34\text{mol/L}$ para $0,96\text{mmol/L}$). Essa equiparação pode explicar porque não há divergência, estatisticamente significativa, nas médias de *fold change* entre os grupos, após o jejum.

O presente estudo fornece informação importante pertinememente aos efeitos da ativação de genes-alvo do PPAR α , durante o jejum, na expressão gênica em PBMCs de humanos. Os resultados permitiram constatar diferenças na expressão gênica entre os grupos, porém mais estudos são necessários, em especial, com a inclusão de grupos com diferentes graus de obesidade e indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2, haja vista a existência de evidências de que a expressão gênica dos principais genes envolvidos na β -oxidação e manutenção dos níveis de glicose (CPT1A/B e PDK4, respectivamente) são afetados por esses fatores. Em estudos complementares a este, seria importante comparar a expressão gênica de CPT1B em indivíduos com obesidade extrema, em PBMCs e musculoesquelético para a validação do uso de PBMCs em pacientes com obesidade extrema, ao invés de estudo musculoesquelético, desse modo, evitando estudos invasivos. Embora os resultados em foco

não tenham enunciado diferença estatisticamente significativa na expressão gênica da CPT1B, entre os grupos, foi possível visualizar uma tendência de diminuição na β -oxidação musculoesquelética. Os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser importantes para a análise de intervenções dietéticas e diagnóstico precoce ainda em estágio subclínico.

5. Referências

Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WPT, Loria CM, Jr Smith SC. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120(16): 1640-1645.

American Diabetes Association [Internet]. Acesso em: 02 de Maio de 2011.
Disponível em: <<http://www.diabetes.org>>.

Barrero MJ, Camarero N, Marrero PF, Haro D. Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved PPRE. *Biochem J*. 2003; 369(3): 721-729.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Euro J Clin Invest*. 2002; 32 (3): 14-23.

Bouwens M, Afman LA, Müller M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells reveals an individual gene expression profile response. *BMC Genomics*. 2008; 9: 262.

Bouwens M, Afman LA, Müller M. Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increase in fatty acid β -oxidation: functional role of peroxisome proliferator-activated receptor α in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86(5): 1515-1523.

Brand, JM, Djouadi F, Kelly DP. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem*. 1998; 273(37): 23786-23792.

Bünger M, Hooiveld GJEJ, Kersten S, Müller M. Exploration of PPAR functions by microarray technology – A paradigm for nutrigenomics. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771(8): 1046-64.

Carlson MG, Snead WL, Campbell PJ. Fuel and energy metabolism in fasting humans. *Am J Clin Nutr*. 1994; 60 (1): 29-36.

Chege D, Chai Y, Huibner S, Mckinnon L, Wachihi C, Kimani M, Jaoko W, Kimani J, Ball TB, Plummer FA, Kaul R, Rebbapragada A. Evaluation of a Quantitative Real-Time PCR Assay to Measure HIV-Specific Mucosal CD8+ T Cell Responses in the Cervix. *PLoS One*. 2010; 5(10): e13077.

Consitt LA, Bell JA, Houmard, JA. Intramuscular lipid metabolism, insulin action and obesity. *IUBMB Life*. 2009; 61(1): 47-55.

Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, Margareto J, Martínez A. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *OMICS*. 2008; 12(4): 251-261.

Datasus: Portaria nº 788 de 25 de Outubro de 2002 [Internet]. Acesso em: 18 Junho 2009. Disponível em: < <http://pnass.datasus.gov.br/documentos/normas/54.pdf>>.

Finn PF, Dice JF, Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*. 2006; 22 (7-8): 830-844.

Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α): At the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009; 205(1): 1-8.

Houmard JA. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294(4): 1111-1116.

Houten SM, Chegary M, te Brinke H, Wijnen WJ, Glatz JFC, Luiken JJFP, Wijburg FA, Wanders RJA. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(7): 1283-1294.

Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, MacDonald KG, Cline GW, Shulman GI, Dohm GL, Houmard JA. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284(4): E741-747.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Pesquisa de Orçamento Familiar (POF- 2008/2009) - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Acessado em: 12 de Maio de 2011. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.

Kelly DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol.* 1999; 277(6): 1130-1141.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature.* 2000; 405(6785): 421-424.

Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohn GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279 (5): 1039-1044.

la Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *Oncologist.* 2011; 16(6): 726-729.

Lemay DG, Hwang DH. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *J Lipid Res.* 2006; 47(7): 1583-1587.

Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the cellular fasting response: the PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(13):7473-7478.

Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006; 147(3): 126-32.

Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(4): 393-416.

Mascaró C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 1998; 273(15): 8560-8563.

Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV. Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate.* 2008; 68(14): 1555-1560.

OMS – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization) [Internet]. Global Database on Body Mass Index - Body Mass Index (BMI) classification. Acesso em: 02 de Maio de 2011a. Disponível em: <<http://www.who.int>>.

OMS – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization) [Internet]. Global Recommendations on Physical activity for Health. Acesso em: 01 de Agosto de 2011b. Disponível em: <<http://www.who.int>>.

Palou M, Sánchez J, Priego T, Rodríguez AM, Picó C, Palou A. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in

response to short- and medium-term fasting and refeeding. *J Nutr Biochem.* 2010; 21(1): 23-33.

Pastsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, März W, Tafuri S, Wahli W, Müller M, Kersten S. PPAR α governs glycerol metabolism. *J Clin Invest.* 2004; 114 (1): 94-102.

Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Müller M, Kersten S. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PLoS One.* 2009; 4(8): e6796.

Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283(1): E187-192.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Res.* 2007; 95974: 1-10.

Sudgen MC, Zariwala MG, Holness MJ. PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection. *Pharmacol Res.* 2009; 60(3): 141-150.

Sugaya S, Nakanishi H, Tanzawa H, Sugita K, Kita K, Suzuki N. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutat Res.* 2005; 578(1-2): 327-332.

Verma RS, Babu A. Human Chromosomes – principles and techniques. International Edition, 2nd Edition, 1995.

Zainuddin A, Chua KH, Abdul Rahim N, Makpol S. Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Mol Biol.* 2010; 11: 59.

CONCLUSÃO FINAL

O objetivo do estudo, como descrito, foi avaliar as diferenças na expressão de genes-alvo do PPAR α e na concentração plasmática de ácidos graxos livres no sangue, entre indivíduos obesos e não-obesos, após 24 horas de jejum.

Os resultados permitiram confirmar que os genes estudados, ativados por PPAR α , são passíveis de análise através da expressão gênica em células mononucleares periféricas do sangue, na população brasileira. Ademais, confirmou-se que a ativação dos genes através do PPAR α é susceptível ao aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL).

Todos os genes estudados apresentaram incremento na expressão (*fold change*) quando comparados com o tempo 0h, em ambos os grupos (obesos e não-obesos). O resultado observado, em relação ao gene PDK4, justifica-se em razão da manutenção da glicose após o período de intervenção, 24 horas; e o aumento da CPT1A indica que o mecanismo da β -oxidação foi utilizado para o fornecimento de energia para tecidos e órgãos extra-hepáticos. Além disso, foi possível observar uma diminuição discreta na expressão (*fold change*) do CPT1B, no grupo obeso em relação ao grupo não-obeso, assinalando que é possível ter ocorrido uma resistência à insulina aumentada no musculoesquelético.

O presente estudo, portanto, evidencia dados de interesse clínico na área de nutrição e fisiopatologia da obesidade. Os dados corroboram os achados da literatura, distinguindo que, em indivíduos obesos, os níveis de AGL estão aumentados. Conquanto não tenha sido foco do presente estudo, sabe-se que esse evento, associado a uma diminuição na β -oxidação musculoesquelética, pode conduzir ao início do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Mais estudos devem ser realizados, em especial, com indivíduos com DM2 e diferentes graus de obesidade, para confirmar essa hipótese na população brasileira. No entanto infere-se que o estudo em PBMCs para avaliação da expressão gênica e a avaliação de genes ativados por PPAR α são de extrema importância para o entendimento de anormalidades clínicas desencadeadas pela associação entre a obesidade e alterações no perfil lipídico e glicolítico.

APÊNDICE A – Dieta dos indivíduos

Grupo obeso, dados apresentados em porcentagem.

Consumo de carne, aves e peixes			
<i>Fritos e Assados</i>	<i>Fritos e cozidos</i>	<i>Fritos, Assados e Cozidos</i>	<i>Fritos, Grelhados, Assados e Cozidos</i>
20	30	10	40

Consumo legumes/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
30	50	10	10

Consumo massas/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
60	30	10	0

Consumo frutas/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
40	40	20	0

Consumo verduras/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
0	60	30	10

Grupo não-obeso, dados apresentados em porcentagem.

Consumo de carne, aves e peixe				
<i>Fritos</i>	<i>Cozidos</i>	<i>Fritos e Assados</i>	<i>Fritos e cozidos</i>	<i>Fritos, Grelhados, Assados e Cozidos</i>
28,57	7,14	35,71	14,29	14,29

Consumo legumes/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
7,14	42,86	35,71	14,29

Consumo massas/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
35,71	50,00	7,14	7,14

Consumo frutas/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
21,43	50,00	14,29	14,29

Consumo verduras/semana			
<i>Ix</i>	<i>3x</i>	<i>5x</i>	<i>Mais de 5x</i>
14,29	35,71	28,57	21,43

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Gostaríamos de convidá-lo a participar de um grupo de pessoas que passarão por um período de jejum de 24 horas, para o desenvolvimento de uma pesquisa. Esse trabalho visa comparar a expressão de genes relacionados com lipídios e a quantidade de ácidos graxos livres no sangue de indivíduos obesos e não-obesos. Se você aceitar participar dessa pesquisa não terá nenhum tipo de custo. Você passará por uma pré-avaliação, onde obteremos seu peso e altura para calcular o índice de massa corporal (IMC) e também realizaremos um exame rápido de glicose, após jejum de 8 horas (noturno), exame de urina e você responderá a um questionário. Necessitamos de informações que estão em seu prontuário médico, que possam nos informar sobre seu estado de saúde, como exames de sangue prévios e uso contínuo de medicamentos. Após análise dos exames e do questionário, entraremos em contato com você e o informaremos sobre sua participação no estudo, 26 indivíduos farão parte do estudo. Todo esse procedimento acontecerá no próprio Campus da UEL, não tendo nenhum custo extra para você com o transporte e os resultados do teste rápido de sangue e de urina serão entregues à você sem custo algum. Os questionários e os resultados dos exames de pré-avaliação serão armazenados até a conclusão da pesquisa. Caso o grupo de pesquisa decida dar continuidade ao estudo você será informado, e dará um novo consentimento para utilizarmos novamente seus dados. Os indivíduos selecionados, após a pré-avaliação, receberão duas refeições balanceadas antes e após o período de jejum, serão acompanhados por uma nutricionista, uma biomédica (pesquisadora responsável) e um enfermeiro. Esse trabalho não trará risco à sua saúde, mas apenas o desconforto de retirar sangue, antes e após o período de 24 horas de jejum. Qualquer queixa de saúde durante o período de 24 horas poderá ser feita a pesquisadora responsável, à nutricionista ou ao enfermeiro, eles darão o suporte necessário. Caso isso ocorra o enfermeiro avaliará os sinais vitais e dosará sua glicemia para avaliar se o mal-estar é devido ao jejum ou ao estresse e/ou cansaço. Nesse período de 24 horas de jejum é possível que você apresente crise hipoglicêmica, os sintomas mais comuns são: confusão mental, irritabilidade, agressividade ou lentidão; incapacidade para realizar coisas comuns, como somar $2 + 2$; distúrbios visuais, como visão dupla ou turva; tontura; palpitação; tremores; suor excessivo. Será constatada crise hipoglicêmica caso apresente esses sintomas e o resultado de sua glicemia esteja abaixo de 50mg/dL, então você

receberá um copo (150mL) de suco de laranja e após 10 minutos sua glicemia será medida novamente. Em caso de crise hipoglicêmica moderada à severa (glicemia abaixo de 36mg/dL), será administrado glucagon via subcutânea e/ou soro glicosilado, de acordo com a necessidade.

Caso se verifique que é necessário a presença de um médico, esse será solicitado, ou conduziremos você ao hospital. Você poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos, nutricionais ou pessoais. Os dados obtidos no estudo e no questionário serão mantidos em total sigilo. Você será dispensado de sua atividade profissional diária durante o período do estudo, sem qualquer prejuízo. Porém, será necessário seu comparecimento ao Campus da UEL, onde permanecerá o dia todo em observação, para garantir que não ocorrerá nenhum prejuízo médico, nutricional e pessoal.

Os resultados obtidos nesse estudo poderão ser armazenados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses e etc, porém em nenhum momento serão divulgados nomes, mantendo-se sempre o sigilo. Como no caso dos questionários e dos resultados de pré-avaliação, caso seja necessário utilizar novamente seus dados, entraremos em contato para obtermos nova autorização.

I. Identificação dos Sujeitos:

Nome do voluntário		
Endereço:		
Cidade:		
Bairro:	CEP:	Estado:
Telefone:		

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão de genes alvos do receptor ativado por proliferadores do peroxissoma alfa (RAPP α) em indivíduos obesos e não-obesos, em estado de jejum.

Consentimento Pós-informado.

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o presente estudo e concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido projeto de pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

Londrina, _____ de _____ de _____.

Voluntário

Ingrid Felicidade – pesquisadora responsável

Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Contato do pesquisador

Ingrid Felicidade – Biomédica; Tel. (43) 3343 - 3226 ou (43) 9126 -2491

E-mail: Ingrid_felicidade@hotmail.com

R: Frederico Balan, 130, Apt. 207, Bl. 03.

Comitê de Ética e pesquisa em seres humanos da UEL: 3371-2490

APÊNDICE C – Questionário

II. Informações pessoais:

Nome do voluntário		Idade
Endereço:		
Cidade:		
Bairro:	CEP:	Estado:
Telefone:	Escolaridade:	

III. Hábitos alimentares (assinale com um x):

1. Normalmente você come carnes /peixes:

a) Fritos	b) Grelhados	c) Assados	d) Cozidos
-----------	--------------	------------	------------

2. Com qual frequência você come legumes:

a) 1 vez por semana	b) 3 vezes por semana	c) 5 vezes por semana
d) Mais de 5 vezes por semana		

3. Com qual frequência você come frutas:

a) 1 vez por semana	b) 3 vezes por semana	c) 5 vezes por semana
d) Mais de 5 vezes por semana		

4. Com qual frequência você come verduras:

a) 1 vez por semana	b) 3 vezes por semana	c) 5 vezes por semana
d) Mais de 5 vezes por semana		

5. Com qual frequência você come massas:

a) 1 vez por semana	b) 3 vezes por semana	c) 5 vezes por semana
d) Mais de 5 vezes por semana		

IV. Histórico de doenças crônicas (assinale com um X, caso haja uma resposta, e especifique o tipo da doença):

- a) Diabetes
 - b) Hemofilia
 - c) Doença cardiovascular
- Qual? _____

- d) Anemia
e) Doenças gastrointestinais

Qual? _____

- f) Doenças da Tireóide

Qual? _____

- g) Câncer

Qual? _____

V. Histórico familiar de doenças crônicas (assinale com um X, caso alguém de sua família possua esse tipo de doença, e especifique o tipo da doença e o parentesco):

- a) Diabetes. Quem? _____

- b) Hemofilia. Quem? _____

- c) Doença cardiovascular

Qual? _____

Quem? _____

- d) Anemia. Quem? _____

- e) Doenças gastrointestinais

Qual? _____

Quem? _____

- f) Doenças da Tireóide

Qual? _____

Quem? _____

- g) Câncer

Qual? _____

Quem? _____

VI. Atividade física

- a) Com qual frequência você pratica atividade física?

- b) Qual atividade física você pratica?

VII. Uso de medicamentos

- a) Faz uso de medicamento?

- b) Qual (is)?

VIII. Hábito de fumar

- a) Você é fumante? _____

- b) Há quanto tempo? _____

c) Quantos cigarros você fuma por dia? _____

Eu, _____ abaixo assinado, declaro serem verdadeiras todas as informações aqui contidas.

Londrina, ____ de _____ de _____.

Voluntário

**Ingrid Felicidade
Pesquisadora responsável**

Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

ANEXO 1



Universidade
Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
Registro CONEP 268

Parecer PF Nº. 243/09 CAAE Nº. 0190.0.268.268-09 FOLHA DE ROSTO Nº. 293072	Londrina, 03 de maio de 2010.
PESQUISADORA: INGRID FELICIDADE	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p style="text-align: center;">"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ALVOS DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PERIXISSOMA ALFA (RAPP+) EM INDIVÍDUOS OBESOS E NÃO-OBESOS, EM SITUAÇÃO DE JEJUM"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p style="text-align: center;">Atenciosamente,</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">Prof.ª. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	