

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

Determinação de ácidos graxos *trans* e modulação da expressão de receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) em tecido adiposo de obesos e não obesos

Josiane Woutheres Bortolotto

Orientadora: Prof^ª Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

Co-orientador: Prof Rogério Margis

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre

2007

"Se eu pudesse deixar algum presente à você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída."

--*Mahatma Gandhi*

AGRADECIMENTOS

A professora Regina Guaragna, pela orientação, pelo carinho, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao professor Rogério Margis, pela orientação e pelos ensinamentos de biologia molecular.

A professora Fátima pelas dicas, pelos auxílios e pelo interesse.

Ao professor André Souto por abrir as portas da pesquisa, por todos os ensinamentos, pelos vários incentivos e pelo exemplo.

Aos colegas de laboratório (21 e 23) pela convivência, cafezinhos, chimas, empréstimos, bate-papos e auxílio. Agradecimento especial à Ângela, iniciação cinetífica e amiga, que sempre incansável me auxiliava nas coletas e extrações. A Cláudia por estar sempre disposta a ajudar, auxiliar e ensinar tudo que sabe. A Silvia pelos cafezinhos, bate papo e ajuda na bibliografia. Obrigada pela amizade.

A dona Lia, cujo trabalho é essencial para que o nosso ande bem. Obrigada por todas as autoclavagens e pelo constante bom humor.

A todos os amigos que fiz neste PPG, em especial a Carol (27) e a Vanessa (22), companheiras de disciplinas, amigas para desabafos. Obrigada por tudo.

Aos meus pais pelo suporte emocional e financeiro, por todas as coletas de tecidos que realizaram, pelo interesse, pelo incentivo e pelo amor.

Ao Dr. Pedro Furian que sempre lembrava de guardar tecido adiposo dos magrinhos.

Ao Dr. Mottin e sua equipe pelos tecidos dos obesos mórbidos.

A minha irmã por suportar meu humor quando os experimentos não davam certos, pelo interesse desprendido mesmo sem entender bem o que eram AG *trans* e PPARs, pelas caronas e pelo amor.

Ao Pablo, por ouvir meus desabafos, pelo suporte emocional, pelos diversos empréstimos do seu notebook e acessória de informática, pelos incentivos e acima de tudo por suportar minhas ausências.

As Cruzgirls pelo carinho, pelo companheirismo, pelo interesse e por sempre entenderem minhas ausências nas nossas junções.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada no formato de artigos científicos e organizada da seguinte forma:

PARTE I

Introdução, contendo uma revisão da literatura sobre os aspectos que fundamentam este trabalho.

Objetivos gerais e específicos do trabalho.

PARTE II

Capítulo 1, contendo artigo científico publicado em periódico internacional

Capítulo 2, contendo manuscrito com aceite para publicação em periódico internacional.

PARTE III

Discussão, contendo interpretação geral dos resultados apresentados nos dois capítulos.

Conclusões finais.

Perspectivas originadas a partir deste trabalho

REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas citadas nas Partes I e III

ANEXOS

Anexo 1, contendo lista de figuras.

Anexo 2, contendo lista de tabelas.

Anexo 3, contendo Termos de Consentimento informado apresentado aos pacientes.

SUMÁRIO

PARTE I.....	05
RESUMO	06
ABSTRACT	07
LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
1 INTRODUÇÃO	09
1.1 Obesidade	09
1.1.1 Obesidade Mórbida	10
1.2 Tecido adiposo	12
1.3 Ácidos graxos <i>trans</i>	16
1.4 PPAR.....	21
1.4.1 PPAR α	22
1.4.2 PPAR β/δ	23
1.4.3 PPAR γ	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos específicos	26
PARTE II.....	28
CAPÍTULO I.....	29
CAPÍTULO II.....	36
PARTE III	55
3 DISCUSSÃO	56
4 CONCLUSÕES	68
5 PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS.....	89

PARTE I

RESUMO

A obesidade é uma síndrome metabólica complexa de etiologia multifatorial, que afeta um número progressivo de indivíduos. Estudos epidemiológicos confirmam que a síndrome metabólica está relacionada com obesidade abdominal, resistência à insulina, diabetes e outros fatores de risco metabólicos para doenças cardíacas. O tipo de alimentação, em especial os ácidos graxos (AG) consumidos, podem estar relacionados com os distúrbios da obesidade. Os ácidos graxos *trans* (AG *trans*) são obtidos pela dieta, em produtos contendo gorduras hidrogenadas e derivados dos animais ruminantes. Estes AG são bem absorvidos pelo organismo, e a composição destes no tecido adiposo (TA) reflete o consumo a longo prazo. Na obesidade, o metabolismo do TA é alterado e o restabelecimento da homeostase energética requer a identificação e regulação de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos. Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) estão envolvidos na modulação do metabolismo e são ativados por AG. Os objetivos deste trabalho foram determinar o conteúdo total de AG *trans* no TA subcutâneo (TAS), retroperitoneal (TAR) e visceral (TAV) de obesos e não obesos submetidos à cirurgia bariátrica ou cirurgia abdominal; analisar o padrão de expressão do PPAR β/δ e PPAR γ 1-3 nos diferentes depósitos destes TA; e comparar a expressão destes receptores em obesos e não obesos. Os TA foram obtidos por cirurgia. Para quantificar os AG *trans*, os lipídeos foram extraídos, saponificados e esterificados. Os níveis de AG *trans* foram medidos por FTIR-ATR. Para quantificar o mRNA, o RNA total foi extraído com TRIzol, foi reverso transcrito e determinado quantitativamente pela reação em cadeia da polimerase (qRT-PR). A média de AG *trans* em pacientes obesos foi de 6.3% no TAR e 8.7% no TAV. Nos pacientes não obesos, os resultados foram 6.9% no TAS e 9.3% no TAV. Não houve diferença estatística entre os grupos. No entanto, o depósito de AG *trans* no TAV foi maior nos pacientes obesos mórbidos ($P < 0.001$) e nos não obesos ($P < 0.05$). Por outro lado, a quantidade de mRNA do PPAR β/δ nos diferentes depósitos de TA de obesos mórbidos mostrou uma diminuição significativa no TAV ($p < 0.05$). No grupo de não obesos, os níveis de PPAR β/δ foram mais altos no TAS ($p < 0.05$). Os níveis de PPAR γ 1-3 não diferiram estatisticamente entre os depósitos de TA tanto de obesos quanto não obesos. Quando obesos e não obesos foram comparados, os resultados revelaram uma diminuída expressão de PPAR β/δ no TAS ($p = 0.058$) e TAV ($p = 0.094$) de obesos mórbidos. A expressão de PPAR γ 1-3 foi significativamente aumentada no TAS ($p = 0.022$) e diminuída no TAR ($p = 0.034$) nos obesos mórbidos. A expressão de PPAR β/δ no TAS e TAV correlacionou negativamente com a medida do quadril e com os níveis de insulina, respectivamente. Os níveis de mRNA PPAR γ 1-3 no TAR correlacionaram negativamente com a medida da cintura e do quadril e no TAV correlacionou positivamente com a medida da cintura. Os valores encontrados de AG *trans* em todos os TA analisados são maiores do que os reportados em outros países. Nós encontramos maior depósito destes AG no TAV do que nos outros estoques. Os níveis elevados no TAV preocupam devido à alta taxa de lipólise deste tecido e sua forte associação com alterações metabólicas. Os altos níveis de AG *trans* encontrados refletem, ainda, o alto consumo destes na dieta dos brasileiros. Os resultados da expressão de PPARs demonstram que PPAR β/δ e PPAR γ 1-3 são quantitativamente diferentes nos depósitos de TA de obesos mórbidos comparados a não obesos e que o padrão de expressão do PPAR β/δ é característico de cada depósito de TA. Os dados de correlação reforçam a relação destes receptores com a obesidade.

ABSTRACT

Obesity is a complex metabolic syndrome of multifactorial etiology affecting a progressively increasing number of individuals globally. Epidemiological studies have confirmed that this metabolic syndrome is related to abdominal obesity and insulin resistance, diabetes and other metabolic risk factors for coronary heart disease. The dietary intake, in special intake of specific fatty acids, could be related with the disturbance of obesity. *Trans* fatty acids (TFAs) are present in solid fats produced by partial hydrogenation of oils, and are naturally found in products originating from ruminants. They are well-absorbed by the body, and long-term intake is reflected in the fatty acid composition of adipose tissue (AT). In obesity, the AT metabolism is altered in obese subjects and the reestablishment of energy homeostasis requires the identification and regulation of genes with altered in lipid and glucose metabolism. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), are involved in metabolism modulation and presented FA like ligand. The purpose of this study was to determine the total content of TFAs in subcutaneous (SAT), retroperitoneal (RAT) and visceral (VAT) adipose tissue of morbidly obese and non-obese patients submitted to bariatric surgery or abdominal surgery; analysed the expression pattern of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 in different depots of AT; and, compare mRNA expression of these receptors in morbidly obese and non-obese patients. The ATs were obtained surgery. To quantify the TFAs, lipids were extracted, saponified and esterified. TFA were measured by FTIR-ATR spectroscopy. To measure the mRNA, total RNAs were extracted using TRIzol, and PPARs reverse transcripts were determined by quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The TFA average in obese patients was 6.3% for RAT and 8.7% for VAT. For non-obese patients, the figures were 6.9% SAT and 9.3% VAT. There was no difference between the groups. However, the TFA depot in VAT was higher than other fatty tissues for morbidly obese ($P<0.001$) and non-obese ($P<0.05$) patients. The amounts of PPAR β/δ mRNA in different depots of morbidly obese AT showed a significant decrease in VAT ($p<0.05$). In the non-obese group, the level of PPAR β/δ was higher in SAT ($p<0.05$). The levels of PPAR γ 1-3 was not differentially expressed in obese and non-obese depots. When comparing obese and non-obese, the results revealed a decrease in PPAR β/δ expression in SAT ($p=0.058$) and VAT ($p=0.094$) of the morbidly obese. PPAR γ 1-3 mRNA expression was increased significantly in SAT ($p=0.022$) and decreased in RAT ($p=0.034$) in morbidly obese subjects. PPAR β/δ expression in SAT and VAT correlated negatively with hip size and insulin serum respectively. PPAR γ 1-3 expression in RAT correlated negatively with waist and hip size and in VAT correlated positively with waist size. Our values for TFA content in all adipose tissues analyzed are higher than reported in other countries. We showed more TFA in VAT than in other abdominal fat. The VAT level is worrisome because the higher rate of lipolysis in this tissue appears to be an important indicator of metabolic alterations. The levels of TFA found in AT presumably reflect the higher dietary intake of TFA by Brazilians. In PPARs expression the results demonstrates that PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs are quantitatively different in AT of morbidly obese individuals compared to non-obese and that PPAR β/δ mRNA levels are characteristic for each AT depot. Correlation data strengthen the relationship with this receptors and obesity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG, ácidos graxos

AG *trans*, ácidos graxos *trans*

DM2, *diabetes mellitus* tipo II

FDA, Food and Drug Administration

FTIR-ATR, Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance

PPARs, receptores ativadores da proliferação de peroxissomos

qRT-PCR, Real-Time Quantitative PCR

SBCB, Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica

TA, tecido adiposo

TAS, tecido adiposo subcutâneo

TAR, tecido adiposo retroperitoneal

TAV, tecido adiposo visceral

TZD, tiazolidinediona

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é definida como um estado de aumento de peso corporal, mais especificamente, tecido adiposo (TA) (Kuczmarski *et al*, 1994). É uma doença crônica, de difícil tratamento, cuja prevalência vem aumentando em proporções epidêmicas nas últimas décadas (Deitel, 2005; Manson *et al*, 2004). No Brasil, Monteiro e colaboradores (1998) realizaram um estudo comparando três avaliações transversais de base populacional nos anos de 1975, 1989 e 1996. Estes autores descreveram um aumento na velocidade de crescimento da obesidade no nosso país. Dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2003, revelaram que o excesso de peso afetava 41,1% dos homens e 40% das mulheres, sendo que a obesidade afetava 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres adultas do país. Sendo assim, os obesos representavam 20% do total de homens e um terço das mulheres com excesso de peso. Atualmente, estima-se que existam no mundo cerca de 300 milhões de obesos, e esse número tende a dobrar até 2025, se medidas eficazes não forem tomadas (Formiguera & Canton, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve a obesidade como um problema de saúde pública, de proporções alarmantes, que está no mesmo patamar que a hipertensão e a aterosclerose (WHO, 2000). Estudos recentes caracterizam a obesidade como uma desordem multifatorial, pois seu início e progressão têm sido atribuídos a: 1-fatores genéticos ainda não bem conhecidos; 2-fatores ambientais como o aumento da ingestão de alimentos e dieta rica em gordura; 3-fatores de conduta como o sedentarismo, doenças subjacentes e 4-situação socioeconômica (Hausman *et al*, 2001).

Estudos mostram que a etiologia da obesidade está ligada a um desequilíbrio entre energia consumida e energia gasta (Grundy, 2000; Lean, 2000; Bray 2004). O excesso de energia, proveniente deste desequilíbrio, é estocado nas células adiposas que aumentam no tamanho (hipertrofia) e/ou aumentam no número (hiperplasia). Os adipócitos hipertróficos que acomodam a massa extra de gordura aumentam a secreção de AG livres e numerosos peptídeos. Como consequência desses dois mecanismos, têm-se alterações no perfil lipídico, no metabolismo da glicose, nos níveis da pressão arterial e, em alguns casos, na função renal e nas doenças cardiovasculares. O conjunto dessas alterações é hoje conhecido como síndrome metabólica (Kopelman, 2000; Bray, 2004), também denominada síndrome X ou síndrome de resistência à insulina (DeFronzo & Ferrannini, 1991; Reaven, 1993; Einhorn 2003).

Em 1998, a OMS propôs critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica baseado na resistência à insulina (Alberti & Zimmet, 1998). Em 2001, o “Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III [NCEP/ATPIII])” simplificou os critérios da OMS requerendo três dos cinco parâmetros clínicos citados a seguir para diagnóstico da síndrome: aumento da circunferência da cintura (102 cm para homens e 88 cm para mulheres), triglicerídeos elevados (≥ 150 mg/dl), reduzido HDL (< 40 mg/dl em homens e < 50 mg/dl em mulheres), elevada pressão sanguínea (130/85 mmHg), elevada glicose (≥ 100 mg/dl). Atualmente a Associação Cardíaca Americana (Grundy *et al*, 2005) assim como a Federação Internacional de Diabetes (Alberti *et al*, 2005) utilizam estes critérios para diagnóstico da Síndrome Metabólica.

1.1.1 Obesidade Mórbida

A obesidade mórbida ou severa é uma desordem crônica, multifatorial e congênita, com excessiva deposição de gordura e associada a problemas médicos, fisiológicos, físicos e sociais (Martin *et al*, 1995). O termo obesidade severa ou mórbida se aplica aos pacientes que estejam

100% ou mais acima do peso ideal, ou pelo menos, 45,5 Kg acima do seu peso ideal, ou tenham um IMC maior ou igual a 40 Kg/m² (Clivingston, 2005; Pavelka *et al*, 2004).

As formas extremas da obesidade dificilmente respondem às terapias convencionais como dieta e medicamentos (Martin *et al*, 1995). A quase totalidade dos pacientes recupera o peso perdido em um período de cinco anos, ocasionando uma flutuação do peso corpóreo, com aumento da mortalidade por complicações cardiovasculares. O mais eficaz tratamento em longo prazo tem sido a cirurgia bariátrica. Nos EUA, o número de cirurgias bariátricas tem aumentado drasticamente: de 16.000 no início da década de 1990 para cerca de 103.000 em 2003 (Steinbrook, 2004). No Brasil, não seria diferente, dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica (SBCB) mostram um aumento destas cirurgias no nosso país (25.000 cirurgias/ano).

Doenças de ordem psicológica, como depressão, são comuns em obesos mórbidos. Além disso, o extremo excesso de peso causa agravo na qualidade de vida (Duval *et al*, 2006). Indivíduos com IMC \geq 40 Kg/m², em comparação àqueles com peso normal, têm risco de morte pelo menos duas vezes maior (Bender *et al*, 2006; Folsom *et al*, 1993). Tal achado se justifica pela elevada prevalência de diversas condições graves em obesos mórbidos, tais como hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), hiperlipidemia, problemas cardíacos (doença coronariana, fibrilação atrial, insuficiência cardíaca, morte súbita, etc.), apnéia do sono, hipertensão pulmonar, osteoartrite degenerativa, cirrose e esteatose não alcoólica, infecções de pele, incontinência urinária, refluxo gastroesofágico, desequilíbrio dos hormônios sexuais, acompanhados por dismenorréia, hirsutismo e infertilidade. Nesses pacientes, há ainda o aumento da incidência de certos tipos de câncer como mama, fígado, cólon, colo uterino, próstata, entre outros (Proietto & Bauer, 2004; Rosen *et al*, 2004; Wang *et al*, 2004).

É provável que muitas das co-morbidades da obesidade severa estejam relacionadas ao aumento da pressão intra-abdominal secundário à distribuição da gordura central (Surgeman *et al* 1997). Schein e colaboradores (1995) demonstraram que a elevação da pressão intra-abdominal na obesidade está fortemente relacionada com o aumento da pressão venosa central, a

diminuição da pressão dos capilares pulmonares, a resistência vascular sistêmica, a fraca pressão de ar, a pressão intrapleural e da veia renal, diminuído retorno venoso, entre outros (Schein *et al*, 1995). Além disso, com o aumento progressivo da obesidade, ocorre acúmulo de lipídeos em outros órgãos, além do TA. A deposição de gordura no fígado, no músculo esquelético, nas células β pancreáticas e no tecido cardíaco pode levar à resistência à insulina, piora da secreção deste hormônio culminando em DM2 e possivelmente agravo da função cardíaca em obesos mórbidos (Molavi *et al*, 2006).

1.2 Tecido adiposo

A visão tradicional do TA como uma reserva passiva de energia não é mais válida. Já em 1987, o TA foi identificado como o maior sítio para o metabolismo dos hormônios esteróides sexuais (Siiteri, 1987) e como produtor de adiposina, um fator endócrino que é regulado negativamente em roedores obesos (Flier *et al*, 1987). A subsequente identificação e caracterização da leptina, responsável pela regulação do apetite e gasto energético, em 1994, estabeleceu firmemente o TA como órgão endócrino (Zhang *et al*, 1994). O TA é atualmente conhecido por expressar e secretar uma variedade de peptídeos bioativos conhecidos como adipocitocinas (Kershaw & Flier, 2004). Entre eles estão: angiotensinogênio, proteína que estimula acilação, adiponectina, proteína ligadora de retinol, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), inibidor da ativação de plasminogênio 1 (PAI-1), resistina, fator tecidual (Trayhurn & Beattie, 2001). Algumas dessas proteínas são citocinas inflamatórias, algumas, ainda, exercem papel no metabolismo de lipídeos, enquanto outras estão envolvidas na homeostase vascular ou sistema do complemento. Em 2005, Fukuhara e colaboradores clonaram do tecido adiposo a visfatina, um fator de crescimento que mimetiza a ação da insulina e também mostraram que tanto em camundongos quanto em humanos os níveis de visfatina aumentam em paralelo com a expansão do TA (Fukuhara *et al*, 2005).

A importante função endócrina do TA é enfatizada pelas conseqüências metabólicas adversas causadas pelo excesso e distribuição deste tecido no corpo (Grundy *et al*, 2004; Nielsen *et al*, 2004). Originalmente, Vague em 1947 formulou o conceito da contribuição regional do tecido adiposo com complicações metabólicas. Ele descreveu dois padrões de distribuição de gordura baseado no tipo corporal, isto é, andróide, ou padrão masculino e ginecóide, ou padrão feminino (Vague, 1947). Subseqüentemente Vague, em 1956, analisando pacientes obesos, associou o risco de complicações metabólicas com diferentes padrões de distribuição de gordura corporal. Em comparação com a obesidade ginecóide, a obesidade andróide foi mais freqüentemente associada com o DM2, doenças coronarianas, pedra nos rins, gota e hiperlipidemia (Vague, 1956). Atualmente o padrão andróide vem sendo referenciado como distribuição de gordura superior, obesidade central ou abdominal, e o padrão ginecóide vem sendo descrito como distribuição de gordura inferior, glúteo-femoral ou obesidade periférica. Estudos prospectivos realizados posteriormente aos estudos de Vague confirmaram seus achados relacionando fortemente o excesso de gordura abdominal com as desordens metabólicas da obesidade central (Larsson *et al*, 1984; Björntorp, 1989; Kissebah & Krakower, 1994).

A gordura abdominal é composta de distintos depósitos anatômicos: tecido adiposo subcutâneo (TAS) que pode ser dividido em anterior e posterior ou camada superficial e profunda; tecido adiposo intra-abdominal que pode ser subdividido nos sítios visceral (TAV) e retroperitoneal (TAR). A gordura visceral, também conhecida como gordura intraperitoneal, é composta da gordura mesentérica (intestino delgado, cólon e reto) e omental (conhecida antigamente por epiplon, é subdivida em omento maior e menor) (Klein, 2004; Tchernof *et al*, 2006).

O exato mecanismo pelo qual o excesso de TA abdominal é responsável por alterações metabólicas ainda não está claro. Sabe-se que o aumento da gordura corporal eleva a taxa de lipólise, acarretando um aumento da mobilização de AG e dos níveis de AG livres circulantes (Frayn *et al*, 1996). Nielsen e colaboradores (2004) revelaram que mulheres obesas têm

aproximadamente 20% mais AG livres na circulação quando comparadas com mulheres não obesas (Nielsen *et al*, 2004). O excesso de AG livres na circulação é um determinante crítico da resistência à insulina devido a seu efeito “lipotóxico” (Unger, 1995).

Sabe-se que a captura de AG é regulada diferentemente, dependendo da região do TA e da obesidade. Um estudo do metabolismo de AG provenientes da alimentação demonstrou uma maior captura de AG da refeição no TA mesentérico e omental (TAV) do que na gordura subcutânea abdominal de indivíduos obesos (IMC 45,9 Kg/m²) e não obesos (IMC 22.6 Kg/m²) (Jensen *et al*, 2003). Arner (2001), estudando diferenças regionais na produção de proteínas pelo tecido adiposo, concluiu que existem diferenças na função endócrina entre os vários depósitos deste tecido, e que esta variação tem um papel importante nas alterações metabólicas em pacientes com obesidade abdominal (Arner, 2001). Ainda, estudos *in vitro* mostraram que os adipócitos viscerais são lipoliticamente mais ativos do que adipócitos subcutâneos (Mauriege *et al*, 1987; Rebuffe-Scrive *et al*, 1989). Outros autores sugerem que a associação entre o excesso de gordura visceral e as complicações metabólicas da obesidade ocorra em função dos AG livres originados da lipólise do TAV (Kissebah & Peiris, 1989). Li e colaboradores (2003) analisaram mudanças na distribuição da gordura, por medidas de ultrasonografia, após 14 dias de restrição calórica em pacientes obesos, e encontraram uma diminuição da massa de TAV, enquanto que o TAS não variou nesses pacientes (Li *et al*, 2003).

No entanto, existem discussões crescentes a respeito de outros sítios do TA abdominal, como por exemplo, o TAS (Goodpaster *et al*, 1997; Tai *et al*, 2000; Garg, 2004), por contribuírem significativamente com a resistência à insulina e demais complicações metabólicas da obesidade. É claramente determinado que o TAS e TAR liberam AG para a circulação sistêmica, diferentemente do TAV que o faz para a circulação porta, diretamente para o fígado. A hipótese portal da lipotoxicidade dos AG livres foi baseada na atividade lipolítica do TAV, liberação destes para o fígado bem como liberação sistêmica. A Hipótese de Randle discute que o aumento de AG livres sistêmicos pode causar resistência à insulina por inibir a captura de

glicose pelo músculo esquelético (Randle *et al*, 1963). De fato, o TAV contribui com somente 15% do influxo de AG livres; a maioria, cerca de 75%, é resultado da liberação pelo TA da região abdominal, como por exemplo, TAS e TAR (Jensen & Johson, 1996). Abate e colaboradores (1994; 1995), após validação da Imagem de Ressonância Magnética para medida dos depósitos de TA abdominal, concluíram que o TAS exerce um papel maior na obesidade relacionada à resistência à insulina, enquanto os depósitos TAV e TAR são menos importantes (Abate *et al*, 1994; Abate *et al*, 1995). Outros autores, como Tai e colaboradores (2000), encontraram também uma forte associação do TAS com os níveis de insulina em obesos (Tai *et al*, 2000). Curiosamente, Goodpaster e colaboradores (1997) realizaram um estudo “cross-sectional” em obesos e não obesos e concluíram que tanto o TAV como o TAS possuem associação similar à resistência à insulina (Goodpaster *et al*, 1997). Em 2000, Kelley e colaboradores também encontraram relação da insulina com TAS e TAV tanto em obesos quanto não obesos e, ainda, diferente correlação da insulina com o TAS profundo e o TAS abdominal (Kelley *et al*, 2000). Um estudo recente demonstrou que, em mulheres, os adipócitos subcutâneos são maiores, possuem maior atividade da lipase lipoprotéica (LPL), e são mais lipolíticos que os adipócitos provenientes da gordura omental (Tchernof *et al*, 2006).

Na literatura, o TAR é pouco estudado. Alguns trabalhos reportam à gordura abdominal total sem distinguir o compartimento retroperitoneal do visceral. Mårin e colaboradores (1992) encontraram uma fraca correlação deste depósito de lipídeos com as variáveis sistêmicas envolvidas na obesidade (Mårin *et al*, 1992). Abate e colaboradores (1994) analisaram a gordura intra-abdominal e notaram que indivíduos magros apresentaram 58% de massa visceral e 42% de massa retroperitoneal, enquanto pacientes obesos apresentaram 69% e 31%, respectivamente. É possível que fatores anatômicos, assim como a reduzida atividade metabólica do TAR, possam limitar seu aumento de tamanho (Abate *et al*, 1994).

1.3 Ácidos graxos *trans*

Evidências do último século revelaram mudanças comportamentais da humanidade em relação à alimentação, caracterizadas por um aumento no consumo de alimentos, diminuição na ingestão de AG polinsaturados da série ômega-3, aumento no consumo de alimentos industrializados, ricos em gordura *trans*, que provocaram um aumento nas taxas de obesidade em 36 países (Popkin & Gordon-Larsen, 2004; Simopoulos, 1999).

Os lipídeos da dieta têm recebido muita atenção dos profissionais da saúde e do público em geral, mais do que qualquer outro suprimento energético. Não somente a quantidade, mas também a qualidade da gordura vêm sendo estudadas em relação ao desenvolvimento de doenças coronarianas (Semma, 2002). Além disso, estudos populacionais sugerem que os lipídeos da dieta têm um papel chave na obesidade (Bray & Popkin, 1998; Astrup *et al*, 2000). Dentre os tipos de gorduras consumidas, estão os ácidos graxos *trans* (AG *trans*), que ocorrem naturalmente em derivados do leite e gorduras animais, através da hidrogenação biológica no estômago de ruminantes, ou pelo processo de hidrogenação catalítica de óleos vegetais e marinhos, e desodorização de óleos, formas comumente mais consumidas (Larqué *et al*, 2001; Craig-Schmidt, 2006).

A hidrogenação de óleos vegetais e marinhos teve início em 1919, quando um químico francês descobriu que o óleo líquido poderia ser convertido em gordura sólida adicionando átomos de hidrogênio sobre pressão no óleo previamente aquecido (Bailey, 1951). Inicialmente, a gordura hidrogenada era utilizada em baixa escala. Com o passar do tempo, a utilização pela indústria de alimentos e pelas padarias aumentou o consumo desse tipo de gordura que chegou a 6,27g/percapita/dia em 1990 nos Estados Unidos (EUA). Em 2003, o FDA (Food and Drug Administration) estimou que o consumo de AG *trans* nos EUA seria de 6,86g/percapita/dia para homem e 4,77g/percapita/dia para mulheres (Dietary references intakes). Ratnayake e Chen (1995) estimaram que a população canadense em geral consumia de 0,5 a 26,1g de AG *trans* com uma média de 8,4g/percapita/dia (Ratnayake & Chen, 1995). No norte da Europa, o

consumo foi estimado em 4,5-17g/percapita/dia; no sul da Europa, em 1,34-9g/percapita/dia e em Israel, 6,5g/percapita/dia (Stender & Dyeberg, 2003). Os países em desenvolvimento também apresentaram um alto consumo de AG *trans*. Foi estimado que na Argentina, no Chile, no Peru, no Equador e no Brasil, o consumo variou de 3 a 19g/percapita/dia (Roger *et al*, 1998).

Os AG *trans* são AG insaturados com pelo menos uma ligação dupla na configuração *trans*, isto é, os dois átomos de hidrogênio dos carbonos adjacentes à ligação dupla apontam para direções opostas, diferentemente da configuração *cis*, na qual onde os átomos de hidrogênio permanecem do mesmo lado da molécula (Bailey, 1951). Em adição, a ligação dupla pode se distribuir ao longo da cadeia carbônica, assim surgindo diferentes isômeros de posição. O ângulo da ligação dupla dos AG *trans* é menor do que a configuração isomérica *cis*, a cadeia acil é mais linear, resultando em uma molécula mais rígida com diferentes propriedades físicas como um ponto de fusão mais alto e melhor estabilidade termodinâmica (Martin & Synge, 1941). Os maiores isômeros *trans* na dieta são os AG com dezoito carbonos monoinsaturados (C18:1) encontrados na gordura vegetal hidrogenada e gordura de ruminantes, enquanto os AG polinsaturados *trans* aparecem apenas em traços. O isômero *trans* presente na gordura derivada do ruminante é o AG vaccênico (C18:1 t11), que possui a ligação dupla no carbono 11. Por outro lado, o AG elaídico (C18:1 t9), predominante, mas não exclusivo isômero *trans* da gordura hidrogenada, possui a ligação dupla no carbono nove (Meijer *et al*, 2001).

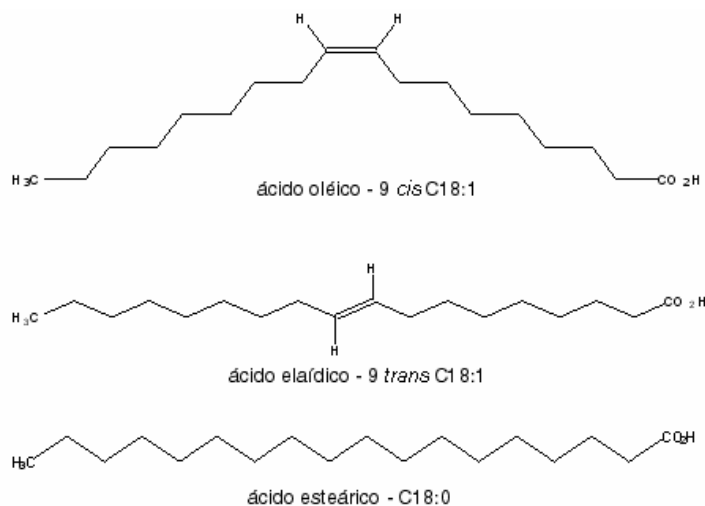


Figura 1: Representação do ácido graxo oléico, elaídico e esteárico; destaque para os isômeros *cis* e *trans*. Adaptado de Costa e colaboradores (2006).

A atenção dos pesquisadores para os efeitos adversos dos AG *trans* começou em 1990 quando Mensink e Katan mostraram que a ingestão elevada destes aumentava os níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL), de maneira similar aos AG saturados. Entretanto, foi observado que os AG *trans* reduziam os níveis da HDL, alterando significativamente a razão entre LDL/HDL (Mensink & Katan, 1990). Judd e colaboradores (1994) comprovaram estes resultados utilizando, em homens e mulheres, uma dieta com 6,6% de AG *trans*. Observaram aumento dos níveis de LDL em 9% e diminuição dos níveis de HDL em 2,8% (Judd *et al*, 1994). Aro e colaboradores (1997) dosaram as lipoproteínas no soro de indivíduos recebendo dieta com AG esteárico ou AG *trans* durante cinco semanas. Eles notaram uma diminuição similar no colesterol total com as duas dietas, porém a dieta contendo AG *trans* diminuiu HDL (17%) e apolipoproteína (apo) A-I (15%) mais significativamente do que a dieta de AG esteárico (11% e 12%, respectivamente) (Aro *et al*, 1997). Sundam e colaboradores (1997) alimentaram pacientes com ácido elaídico (5,5%) por cinco semanas e observaram um aumento de LDL e lipoproteína a (Lp(a)) e redução de HDL (Sundram *et al*, 1997). Uma recente meta-análise confirmou que os AG *trans* afetam os níveis de lipídeos de uma forma mais negativa que os AG saturados, por aumentar LDL e diminuir HDL colesterol (Mensink, 2003). Desta forma, esses dados colocam os AG *trans* entre os fatores dietéticos de risco para doenças cardiovasculares.

Outras pesquisas têm associado os AG *trans* à presença de marcadores sistêmicos inflamatórios, ou seja, estes AG têm sido considerados pró-inflamatórios. Alta ingestão de AG *trans* está associada com o aumento nos níveis sistêmicos de TNF- α , IL-6 e proteína C reativa (CRP). Mozaffarian e colaboradores (2004) sugeriram que o efeito pró-inflamatório pode ser parcialmente mediado pelo TA. Foi observado que a relação entre a ingestão de AG *trans* e os níveis circulatórios de IL-6 e CRP pode ser modificada pelo índice de massa corporal (IMC). Os AG *trans* podem ainda influenciar a função endotelial (Mozaffarian *et al*, 2004). Uma análise com 730 mulheres associou o alto consumo de AG *trans* com elevados níveis de moléculas de adesão solúveis (ICAM-1 e VCAM-1) e concentrações plasmáticas de E-selectina, que são marcadores da disfunção endotelial (Lopez-Garcia *et al*, 2005).

Além de o consumo de AG *trans* estar fortemente associado ao risco de doenças cardiovasculares e inflamatórias, dados epidemiológicos do “Nurses Health Study” reportaram que estes AG aumentam o risco de desenvolver DM2 (Salmeron *et al*, 2001). Bray e colaboradores (2002), revisando a influência de diferentes AG sobre a obesidade, resistência à insulina e inflamação, constataram que o AG elaídico pode aumentar a razão insulina/glicose (Bray *et al*, 2002). Lefevre e colaboradores (1999) sugerem que este AG *trans* pode induzir à resistência à insulina (Lefevre *et al*, 1999). Além disso, Storlien e colaboradores (2000) mostraram que os AG da dieta têm um papel importante na indução da resistência à insulina, possivelmente devido às alterações na composição de AG dos lipídeos estruturais, das células do músculo esquelético e TA (Storlien *et al*, 2000). Christiansen e colaboradores (1997) reportaram que AG saturados e AG *trans* induziram resistência à insulina em pacientes obesos (Christiansen *et al*, 1997). Um estudo recente, realizado em ratos, demonstrou que dietas contendo AG saturados ou AG *trans*, provenientes de gordura vegetal hidrogenada, aumentaram os níveis de insulina e triglicerídeos de jejum. Além disso, estas duas dietas diminuíram os níveis de AG araquidônico nos fosfolipídeos da membrana plasmática dos adipócitos. No entanto, somente nos

ratos alimentados com AG *trans*, houve diminuição de fluidez da membrana plasmática (Ibrahim *et al*, 2005).

Mahfouz e colaboradores (1984) alimentaram ratos com gordura hidrogenada e notaram uma diminuição na conversão de ácido linoléico para araquidônico devido ao efeito inibitório nas enzimas delta 5 e 6 desaturases. Estes resultados se devem à ação do ácido elaídico (C18:1t9) quando comparado aos lipídeos provenientes da gordura de ruminantes que contém somente isômero *trans* na posição 11 (C18:1t11- ácido vaccênico) (Mahfouz *et al*, 1984). Mais tarde, realizando um estudo *in vitro*, estes mesmos autores confirmaram a inibição da delta 5 e 6 desaturases por isômeros *trans* C18:1, excluindo o isômero C18:1t11 (Mahfouz *et al*, 1999). Um trabalho mais recente realizado por Kummerow e colaboradores (2004) demonstraram que os fosfolipídeos da aorta de porcos alimentados com gordura hidrogenada como fonte de lipídeos, apresentaram maior concentração de ácido linoléico, menor de ácido araquidônico e AG polinsaturados de cadeia longa (PUFA) quando comparados com os porcos alimentados com manteiga ou dieta controle. Essa mudança na composição da aorta indica que a gordura *trans* inibe a conversão metabólica do ácido linoléico para araquidônico e demais PUFA da série n-6 e n-3 (Kummerow *et al*, 2004).

Os mecanismos pelos quais os AG *trans* exercem seus efeitos deletérios à saúde não estão esclarecidos. Possivelmente diversos componentes estão envolvidos, como alteração das propriedades físico-química das membranas, controle da expressão de genes e conseqüente modificação do metabolismo de lipídeos e carboidratos (Risérus, 2006). Trabalhos recentes mostram que AG provenientes da dieta podem regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo, principalmente de lipídeos e da glicose (Clarke, 2001; Pegorier *et al*, 2004). Entre os receptores nucleares regulados por AG, estão os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs).

Recentemente, um estudo em animais revelou que a ingestão de AG *trans* altera a expressão gênica do receptor ativador da proliferação de peroxissomas- γ (PPAR- γ), resistina e

LPL no tecido adiposo (Saravanan *et al*, 2005) e influencia o metabolismo dos AG nos adipócitos (Matthan *et al*, 2001). Análogos a outros AG, os *trans* podem atuar como ligantes de receptores nucleares (PPARs, LXR e SREBP-1) regulando genes que afetam o metabolismo em adipócitos e outros tecidos.

1.4 PPAR

Os peroxissomos são organelas subcelulares primordialmente envolvidas na remoção do oxigênio molecular. Mais tarde no processo evolutivo, foram envolvidos na metabolização do peróxido de hidrogênio e em diversas vias anabólicas e catabólicas de lipídeos, incluindo síntese de glicerolipídeos, metabolismo do colesterol e oxidação de AG (Vamecq & Latruffe, 1999). Em 1990, Isseman & Green descobriram o mecanismo pelo qual a proliferação de peroxissomos é induzida no fígado de roedores por drogas hipolipidêmicas e plastificadoras (Isseman & Green, 1990). A proliferação de peroxissomos ocorre somente em roedores como consequência da ativação de alguns receptores nucleares por moléculas específicas, assim denominadas de proliferadores de peroxissomos. Mais tarde, verificou-se que os, então, PPARs (receptores ativadores da proliferação de peroxissomos) estão presentes também em humanos, no entanto com funções distintas, caracterizadas por ligar as seqüências específicas de DNA e regular a expressão de genes (Neve *et al*, 2000).

Desde sua descoberta, os PPARs receberam grande atenção por serem alvo e terem elevado potencial farmacológico para o combate da obesidade e do diabetes (Auwerx *et al*, 1996). Os PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares e, em humanos, vem sendo descritas três isoformas: PPAR α , PPAR δ (também conhecido como PPAR β) e PPAR γ (Auboeuf *et al*, 1997; Escher *et al*, 2001). Os PPARs são ativados por ligantes endógenos ou exógenos, sendo que, após ativação, sofrem uma mudança conformacional, que permite a heterodimerização com o receptor retinóico (RXR), e a subsequente heterodimerização com o elemento responsivo ao PPAR (PPRE) induzindo o desligamento do correpressor, e recrutando

um ou mais coativadores. (Kota *et al*, 2005). Este processo de ativação resulta no aumento da atividade transcricional de genes envolvidos em diferentes processos biológicos (Kahn e Flier, 2000) (Figura 2).

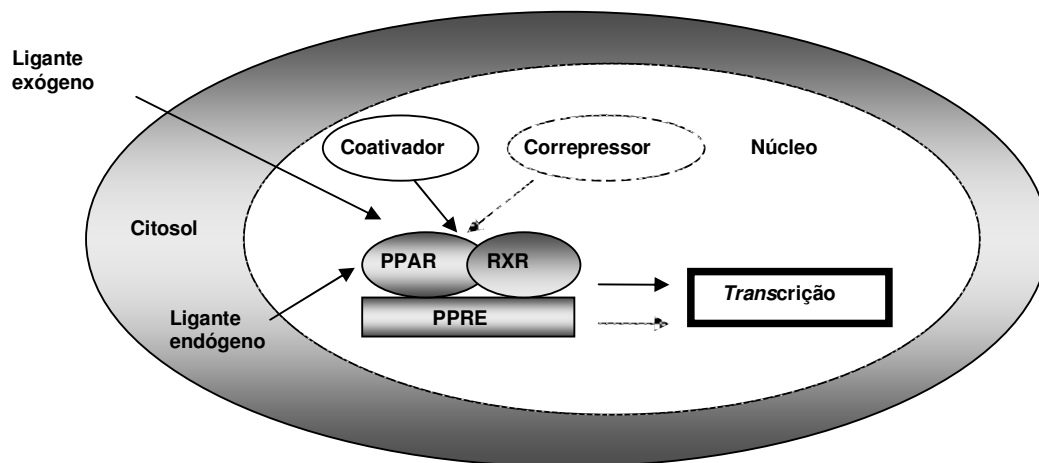


Figura 2: Mecanismo de transcrição gênica de PPARs. No estado não ligado, PPARs vão interagir com co-repressor. No estado ligado (agonista como TZD ou AG), PPARs heterodimeriza com RXR, liga ao PPRE, recruta coativador facilitando transcrição de vários genes. Adaptado de Kota e colaboradores (2005).

Os PPARs estão presentes em diferentes órgãos, mas encontram-se fortemente concentrados em áreas metabólicas chaves, incluindo TA, músculo esquelético, fígado, pâncreas e células imunes (Desvergne & Wahli, 1999). Esta família de receptores nucleares tem um papel chave na regulação da adipogênese, no metabolismo de lipídeos e carboidratos, na sensibilidade à insulina e na inflamação. Evidências apontam para uma relação entre a atividade de PPARs e a síndrome metabólica incluindo resistência à insulina, intolerância à glicose, obesidade, dislipidemia, hipertensão e aterosclerose (Guri *et al*, 2006).

1.4.1 PPAR α

O PPAR α é principalmente expresso no fígado, no TA marrom, no intestino delgado, no músculo esquelético e cardíaco (Grimaldi, 2001) e nas células vasculares (Diep *et al*, 2000). Esta isoforma de receptor tem um papel chave na regulação da β -oxidação no fígado (Wahli *et al*,

1995) e também estimula a captura de AG, pois aumenta a expressão da proteína de transporte de AG (FATP) e translocase de AG (FAT) (Motojima *et al*, 1998). Mais recentemente tem-se associado a ativação do PPAR α aos efeitos antiinflamatórios e de melhora na aterosclerose (Chinetti *et al*, 2001; Goya *et al*, 2004). Os fibratos, fármacos hipolipidêmicos, usados na clínica são agonistas de PPAR α (Wahli *et al*, 1995).

1.4.2 PPAR β/δ

O PPAR β/δ é expresso em diversos tecidos do corpo, em altos níveis, como por exemplo, no músculo cardíaco e esquelético e no TA branco (Grimaldi, 2001). Esse subtipo de receptor nuclear inicialmente recebeu menos atenção que outros PPARs devido ao seu largo padrão de expressão e a não disponibilidade de um ligante seletivo. Recentemente, estudos em TA e músculo começaram a descobrir as funções metabólicas deste receptor nuclear. A expressão transgênica de uma forma ativada do PPAR β/δ no TA de camundongos produz camundongos magros resistentes à obesidade, à hiperlipidemia e à esteatose, induzidas geneticamente ou por uma dieta rica em gordura (Wang *et al*, 2003). No entanto, estudos moleculares que desenvolveram um agonista sintético do PPAR β/δ têm ajudado a revelar o seu papel como poderoso regulador do catabolismo de AG e homeostase energética. Oliver e colaboradores (2001) demonstraram que a ativação por 4 semanas por um novo, potente e específico agonista (GW501516) induz à correção dos níveis de triglicérides, diminui a hiperinsulinemia e aumenta HDL em macacos obesos (Oliver *et al*, 2001), justificando a iniciação de ensaios clínicos para verificar sua eficácia em pacientes hiperlipidêmicos e obesos (Gross *et al*, 2005).

Vários AG saturados e insaturados são ligantes de PPAR β/δ , sendo que eicosanóides, prostaciclina e ácido retinóico são ativadores deste receptor (Xu *et al*, 1999; Shaw *et al*, 2003). Holst e colaboradores (2003), estudando a regulação nutricional do PPAR β/δ em camundongos, observaram que, após 24 horas de inanição, os níveis de mRNA do PPAR β/δ foram drasticamente regulados positivamente no músculo gastrocnêmico e retornando a níveis de

mRNA normais após realimentação (Holst *et al*, 2003). Jehl-Pietri e colaboradores (2000) e Bastie e colaboradores (2000), após investigarem o papel do PPAR β/δ no controle da proliferação de fibroblastos e pré-adipócitos por AG, sugerem que a modulação da atividade deste receptor pode afetar respostas adaptativas do tecido adiposo branco diante de mudanças nutricionais (Bastie *et al*, 2000; Jehl-Pietri *et al*, 2000).

1.4.3 PPAR γ

O PPAR γ é expresso no TA branco, TA marrom, placenta, intestino e macrófagos (Grimaldi, 2001). O gene deste receptor nuclear contém três promotores distintos denominados PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. A transcrição do PPAR γ 1 e PPAR γ 3 geram uma proteína idêntica (Kota *et al*, 2005), enquanto que a transcrição do PPAR γ 2 forma uma proteína que contém 28 aminoácidos adicionais (Meirhaeghe & Amouyel, 2004). O PPAR γ é o maior regulador da diferenciação de adipócitos (Spiegelman, 1998). Além disso, promove apoptose de adipócitos maduros, estimula a adipogênese e aumenta o número de adipócitos menores sensíveis à insulina (Okuno *et al*, 1998; Hallakou *et al*, 1997). Investigações *in vivo* também mostraram que a ativação de PPAR γ provoca efeito oposto à expressão de TNF- α , afeta diversos genes envolvidos na ação da insulina (Shibasaki *et al*, 2003), como por exemplo, aumento da expressão de GLUT 4 (Shimaya *et al*, 1997), inibição da secreção de resistina (Shojima *et al*, 2002) e modulação de adiponectina (Berger *et al*, 2001; Rangwala *et al*, 2003). Outras pesquisas também mostraram um aumento na expressão do PPAR γ 1 em macrófagos e células tumorais, revelando possíveis funções adicionais deste receptor na aterosclerose, na inflamação e no câncer (Desvergne & Wahli, 1999; Ricote *et al*, 1999).

A maioria dos genes alvo do PPAR γ está envolvida no metabolismo da glicose e dos lipídeos. Muitos ligantes sintéticos do PPAR γ , como tiazolidinedionas (TZD), medeiam ações antidiabéticas por aumentar a sensibilidade à insulina. No entanto, a precisa natureza de ligantes endógenos ainda não é clara, vários AG e seus metabólitos são capazes de ativar PPAR γ (Wilson

et al, 2001). Forman e colaboradores (1995) mostraram que prostaglandinas da série J como, por exemplo, 15-deoxi-delta12-14-PGJ2 (15d-PGJ2) são ativadores de PPAR γ (Forman *et al*, 1995). Assim como Nagy e colaboradores (1998) determinaram que lipídeos oxidados como o ácido 9-hidróxi-ocatadecadienóico (9-HODE) e o ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE) são também ativadores efetivos deste receptor nuclear (Nagy *et al*, 1998). Um estudo mais recente, realizado por Chambrier e colaboradores (2002), verificou que AG, particularmente os polinsaturados, regulam diretamente a expressão do gene PPAR γ em tecido adiposo humano de obesos. Eles notaram um aumento significativo da expressão do mRNA PPAR γ 1 na presença de ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3) sugerindo que este AG pode participar na regulação da expressão de PPAR γ em tecido humano (Chambrier *et al*, 2002). Bastard e colaboradores (1999) e também Vidal Puig e colaboradores (1997) relataram anteriormente uma diminuição na expressão de PPAR γ no TAS de obesos após restrição calórica (Bastard *et al*, 1999; Vidal-Puig *et al*, 1997). Em adição, Vidal-Puig e colaboradores (1996), analisando expressão de PPAR γ em roedores, notaram que tanto o jejum quanto a realimentação afetam a expressão deste receptor em TA diminuindo e aumentando a expressão, respectivamente (Vidal-Puig *et al*, 1996). Enquanto que Nisole e colaboradores (2000) mostraram que a infusão na região glúteo-femoral de uma mistura de triglicérides por 5 horas foi capaz de promover o aumento da expressão de PPAR γ em TA de humanos (Nisole *et al*, 2000). Esses resultados sugerem que a expressão de PPAR γ pode ser controlada, pelo menos em parte, pela regulação nutricional. No entanto, a natureza dos AG que poderiam participar na regulação transcricional do gene PPAR γ não é totalmente conhecida (Chambrier *et al*, 2002).

2 OBJETIVOS

O mecanismo pelo qual AG *trans* causam os efeitos deletérios à saúde não está completamente entendido e tampouco sua relação com os diferentes depósitos de TA e com a obesidade. Com isso, nosso trabalho pretende analisar e quantificar a concentração total de AG *trans*, depositados no tecido adiposo (TAS, TAR e TAV), numa amostra constituída de pacientes obesos mórbidos e não obesos. Em vista da ação direta de nutrientes, entre eles os AG, sobre a modulação da expressão de alguns genes envolvidos no metabolismo de lipídeo e da glicose, procuramos determinar a expressão de mRNA dos PPARs no TA. Os PPARs estão associados à síndrome metabólica incluindo resistência à insulina, intolerância à glicose, obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão e aterosclerose. Desta forma, procuramos analisar e quantificar a expressão dos PPARs nos diferentes depósitos de tecido adiposo (TAS, TAR e TAV) em obesos mórbidos e não obesos e verificar sua relação com a obesidade.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Quantificar o conteúdo de AG *trans* no TAS, TAR e TAV de indivíduos obesos mórbidos e não obesos;
- 2- Comparar o conteúdo de AG *trans* entre os diferentes depósitos de TA;
- 3- Inferir o consumo de AG *trans* através do depósito destes no TA de indivíduos obesos mórbidos e não obesos;
- 4- Analisar o perfil de expressão do PPAR β/δ nos diferentes depósitos de TA (TAS, TAR e TAV) em pacientes obesos mórbidos e não obesos;

- 5- Analisar o perfil de expressão do PPAR γ 1-3 nos diferentes depósitos de TA (TAS, TAR e TAV) em pacientes obesos mórbidos e não obesos;
- 6- Comparar a expressão de mRNA de PPAR β/δ e PPAR γ 1-3 entre os diferentes depósitos de TA (TAS, TAR e TAV);
- 7- Verificar se a obesidade modula a expressão destes receptores em TAS, TAR e TAV comparando pacientes obesos com pacientes não obesos;
- 8- Correlacionar as variáveis antropométricas e bioquímicas dos indivíduos obesos com a expressão dos PPAR β/δ e PPAR γ 1-3.

CAPÍTULO I

Higher content of *Trans* Fatty Acids in abdominal visceral fat of morbidly obese individuals undergoing bariatric surgery compared to non-obese subjects

(artigo publicado)

Referência: Obesity Surgery, v.15, p. 1265-1270, 2005.

Higher Content of *Trans* Fatty Acids in Abdominal Visceral Fat of Morbidly Obese Individuals undergoing Bariatric Surgery compared to Non-Obese Subjects

Josiane W. Bortolotto¹; Cíntia Reis¹; Ângela Ferreira¹; Sirlei Costa, MD²; Cláudio Cora Mottin, PhD³; André A. Souto, PhD⁴; Regina Maria Guaragna, PhD¹

¹Departamento de Bioquímica – UFRGS, ²Centro de Cirurgia Reconstructiva – RS, ³Centro de Obesidade Mórbida – PUCRS, ⁴Faculdade de Química – PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Background: The purpose of this study was to determine the total content of *trans* fatty acids (TFA) in subcutaneous, retroperitoneal and visceral fat of morbidly obese and non-obese patients submitted to bariatric surgery or plastic and abdominal surgery.

Methods: The adipose tissues were obtained by surgery; lipids were extracted, saponified and esterified. TFA were measured by FTIR-ATR spectroscopy.

Results: The TFA average in obese patients was 6.3% for retroperitoneal and 8.7% for visceral fat. For non-obese patients, the figures were 6.9% (subcutaneous) and 9.3% (visceral). There was no difference between the groups. However, the TFA depot in visceral fat was higher than other fatty tissues for morbidly obese ($P<0.001$) and non-obese ($P<0.05$) patients.

Conclusions: Our values for TFA content in all adipose tissues analyzed are higher than reported in other countries (3-6%). We showed more TFA in visceral adipose tissue than in other abdominal fat (subcutaneous and retroperitoneal) stores. The visceral adipose tissue level is worrisome because the higher rate of lipolysis in this tissue appears to be an important indicator of metabolic alterations and the levels of TFA found in adipose tissue presumably reflect the higher dietary intake of TFA by Brazilians.

Key words: *Trans* fatty acids, subcutaneous adipose tissue, retroperitoneal adipose tissue, visceral adipose

Reprint requests to: Regina Maria Guaragna, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600 - anexo, 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: 55-51-3316-5540; e-mail: rguaragna@terra.com.br

tissue, morbid obesity, non-obese

Introduction

Obesity is a complex metabolic syndrome of multifactorial etiology affecting a progressively increasing number of individuals globally.^{1,2} Epidemiological studies have confirmed that this metabolic syndrome is related to abdominal obesity and insulin resistance, diabetes and other metabolic risk factors for coronary heart disease (CHD).² Abdominal fat is composed of several distinct anatomic depots: subcutaneous fat and intrabdominal fat, which can be divided into visceral and retroperitoneal.³

In obese individuals, there are several abnormalities in free fatty acid (FFA) metabolism. It has been suggested that excess visceral fat is more harmful than excess subcutaneous fat, because lipolysis of visceral adipose tissue triglycerides releases FFAs into the portal vein, which are then delivered directly to the liver.³ The rate of lipolysis in obese individuals is accelerated in visceral adipose tissue, and the increase in circulating FFAs results in dyslipidemia, hyperinsulinemia and hyperglycemia.²

There is a substantial interest in the relationship between dietary intake of specific fatty acids and

chronic diseases.⁴ *Trans* fatty acids (TFAs) are mainly present in solid fats produced by partial hydrogenation of oils, and are naturally found in products originating from ruminants.⁵ They are well-absorbed by the body, and long-term intake is reflected in the fatty acid composition of adipose tissue.⁶

Several studies have shown that a high intake of TFA raises low density lipoprotein (LDL) cholesterol and lowers high density lipoprotein (HDL) cholesterol, affecting the LDL/HDL cholesterol ratio in an unfavourable manner compared to other fatty acids.⁷⁻¹¹ The dietary *trans* fat can perturb essential fatty acid (EFA) metabolism, leading to changes in the phospholipid fatty acid composition in the aorta, the target tissue of atherogenesis.¹²

Measurements of individual fatty acids and saturated and unsaturated fats suggested that insulin sensitivity might be altered acutely in humans.¹³ Lovejoy et al¹⁴ observed that humans fed with 10% elaidic acid had raised insulin levels, resulting in a higher insulin-to-glucose ratio, which suggests that TFA may induce insulin resistance acutely.

Depots of individual fatty acids in adipose tissue reflect their presence in the diet and their differential oxidation in humans. The subtypes of adipose tissue also differ in uptake, storage and mobilization of lipids.^{15,16}

The purpose of our study was to describe the total content of TFA in abdominal subcutaneous, retroperitoneal and visceral fat of obese and non-obese patients, as an indicator of dietary exposure in a sample of the Brazilian population.

Materials and Methods

Two groups of patients were studied: Group A consisted of morbidly obese patients (BMI>40) and Group B of non-obese patients (BMI<30). The obese and non-obese patients provided subcutaneous, retroperitoneal and/or visceral adipose tissue. The morbidly obese Group A yielded 31 samples of retroperitoneal fat (eight men, 23 women) and 32 samples of visceral fat (seven men, 25 women). Group B, non-obese, gave 18 samples of subcutaneous fat (two men, 16 women) and nine samples of visceral fat (three men, six women).

Morbidly obese adipose tissue was obtained from

patients submitted to bariatric surgery at the São Lucas Hospital - PUCRS Center of Morbid Obesity. Non-obese tissues were obtained by lipoaspiration surgery at the Divina Providencia Hospital and Moinho de Ventos Hospital (Center of Reconstitutive Plastic Surgery) and by abdominal surgery at the Nossa Senhora de Fátima Hospital - RS. Experiments were approved by the ethical committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (n° 2003224), and all subjects were informed about the aim of the study and signed the informed consent form.

During surgery, a sample of subcutaneous, retroperitoneal and visceral fat (approximately 15 g) was taken from all patients to enable triplicate analyses.

Lipids were extracted according to Folch et al,¹⁷ and were further saponified and esterified in the presence of diazomethane. Two mL of KOH solution (1:1; v/v methanol/water) were added to the saponification, and placed in a steam bath at 80°C. After the sample had reached the temperature, it was acidified with H₂SO₄ 1M to pH 3, extracted with diethyl ether, dried with anhydrous sodium sulfate and esterified with diazomethane.¹⁸ Reagents were purchased from Merck Co.

A Fourier transform infrared spectrometer with attenuated total reflection (FTIR-ATR Perkin-Elmer Spectrum One spectrometer) was used to measure total TFA in the samples. ATR quantification was based on the measurement of the integrated area under 966 cm⁻¹. A calibration curve of area vs *trans* fatty acids methyl acids (FAMES) "percentage" was generated for reference mixtures in the range of 1-60% elaidic acid methyl ester standard in oleic acid methyl ester standard¹⁹ purchased from Sigma Chemical Co. The correlation coefficient was 0.9994. The measurement parameters were 1050-900 cm⁻¹ spectral range, 50-scans and 4 cm⁻¹ resolution.²⁰

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed with SPSS version 8, using the non-parametric Exact test. To quantify the sample size (*n*) the MTT0-one test (n Query Advisor 30) was used. The samples were analyzed, one by one, in triplicate, and the results were expressed as means ± SD, and a *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

The method used to quantify the TFA, FTIR-ATR spectroscopy is widely used for the determination of total fatty acids with isolated *trans* double bonds. The FTIR-ATR determination is based on the C-H out-of-plan deformation band at 966 cm^{-1} which is the unique characteristic of isolated double bonds with *trans* configuration.^{21,22} Fritsche et al²⁰ determined the levels of TFAs in human adipose tissue by FTIR-ATR, and concluded that levels found by ATR were usually higher than those determined by Gas Chromatography (GC), partly because the GC method underestimates *trans* C18:1 isomers in favor of *cis* C18:1 isomers.

The total TFA content in the adipose tissue (subcutaneous, retroperitoneal and/or visceral) of both groups is shown in Figure 1 (A, B), and the mean values are found in Table 1. For obese patients, mean TFA values were 6.40% (SD= 0.50%) in retroperitoneal adipose tissue and 8.74% (SD= 0.29%) in visceral adipose tissue (Figure 1B). Non-obese patients had a mean of approximately 6.94% (SD= 0.72%) in subcutaneous adipose tissue and 9.29% (SD= 0.59%) in visceral adipose tissue (Figure 1A).

The total TFA of retroperitoneal and subcutaneous adipose tissue was not significantly different between obese and non-obese patients. Nor was there any significant difference in the total stored TFAs of the visceral adipose tissue in the two experimental groups. In obese patients, there was no difference in concentration of total TFAs in subcutaneous (6.52%, SD=0.69%, n=3) and retroperitoneal adipose tissue (data not shown in the table and figure).

There is a higher concentration of total TFAs in visceral adipose tissues than in subcutaneous fat in non-obese patients ($P<0.05$). This level of significance is lower because of the reduced number of samples; removal of visceral adipose tissue is not always part of the surgical procedure in these patients. A similar situation was seen for retroperitoneal and visceral adipose tissue in obese patients; the total concentration of TFAs was greater in visceral tissue ($P<0.001$).

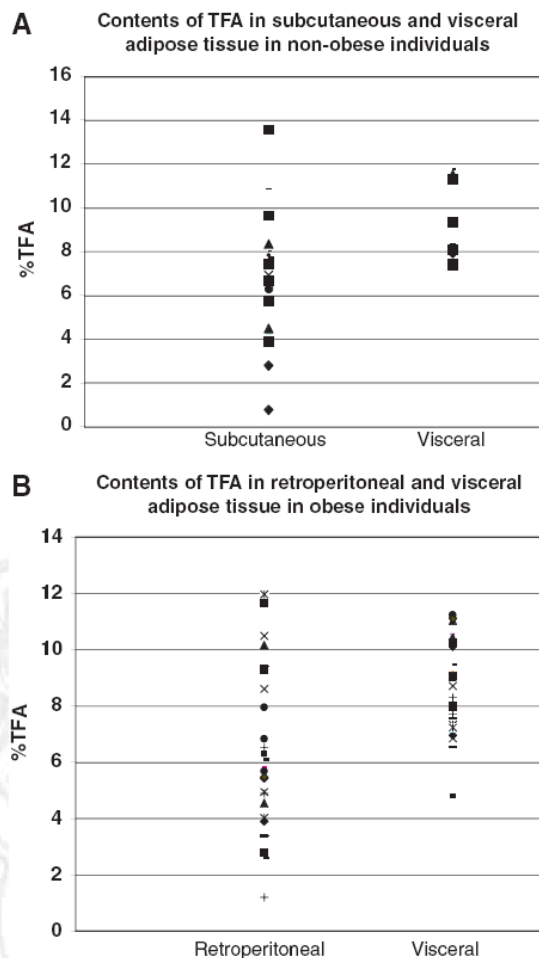


Figure 1. Individual distribution of total TFA in different tissues of obese and non-obese patients. **A)** Individual distribution of total TFA in subcutaneous and visceral adipose tissue of non-obese patients $P<0.05$. **B)** Individual distribution of total TFA in retroperitoneal and visceral adipose tissue of obese patients $P<0.001$.

Discussion

Dietary fats have received much attention from health professionals. Not only the quantity, but also the quality of dietary fat has been studied in relation to the epidemic of obesity, insulin resistance and development of CHD in European countries and USA.^{13,23} The fatty acid composition of adipose tissue is an appropriate biomarker for dietary intake for those fatty acids that are not synthesised by

Table 1. Content of *trans* fatty acids in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of obese and non-obese individuals

Group	n	Mean %	SD %	P
Obese				
Retroperitoneal	31	6.40	0.50	0.001
Visceral	32	8.74	0.29	
Non-obese				
Subcutaneous	18	6.94	0.72	0.05
Visceral	9	9.29	0.59	

$P < 0.001$ when comparing visceral with retroperitoneal adipose tissue of obese group.

$P < 0.05$ when comparing visceral with subcutaneous adipose tissue of non-obese group.

human beings (linoleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids and isomeric *trans* fatty acids). Thus, the fatty acid composition of adipose tissue may provide a particularly useful marker of long-term fatty acid intake over months or years.⁴

We determined the concentration of total TFA in the different adipose tissues of obese patients submitted to bariatric surgery and non-obese patients submitted to different surgery. Our results show that the concentration of total TFAs in subcutaneous or retroperitoneal adipose tissue is greater in both obese and non-obese patients, when compared with other studies. The total TFA content in visceral adipose tissue was statistically significantly higher when compared with subcutaneous and retroperitoneal, in both groups.

The higher values of total TFAs found in all adipose tissue analyzed might be due to the technology of edible fat production in our country and the indiscriminate utilization of hydrogenated vegetable fat.^{24,25} Some foods analyzed in Brazil showed higher levels of TFAs, for instance, margarines,^{24,26} biscuits,¹¹ potato chips, pasta, ice-cream, cakes and other foods.²⁷ Consequently, the consumption of *trans* fatty acids in Brazilian people is higher than in others.²⁸

In Brazil there has been recent legislation which will become valid in 2006, compelling manufacturers to include TFA content on the food label.²⁹ The US FDA intends to proceed with legislation on *trans* fatty acids and concludes that *trans* fat intake increases the risk of coronary heart disease. They recommend that *trans* fat consumption be kept as

low as possible.³⁰ In European countries and the USA, the *trans* fatty acid content has declined to an average 1-2%.⁵ The FAO and WHO have also published a guideline "Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases", in which the consumption of TFA is recommended to be <1%.³¹

There have been many publications identifying total TFA in subcutaneous fat samples from persons with atherosclerosis,³² men with acute myocardial infarction,^{33,34} cardiac patients,³⁵⁻³⁷ French women³⁸ and US female nurses.⁴ Nevertheless, the total TFA content in visceral adipose tissue has not previously been measured.

Visceral obesity in particular is an important risk factor for the metabolic complications that accompany obesity. Only visceral adipose tissue is drained by the portal venous system and has a direct connection with the liver. Mobilization of FFAs is more rapid from visceral than from subcutaneous fat cells, because of the higher lipolytic activity in visceral adipocytes, in both non-obese and obese individuals. It is particularly high in the latter, and this probably contributes significantly to the FFA levels in the systemic circulation. The higher lipolytic activity in visceral fat in comparison to subcutaneous adipose tissue can be attributed to regional variation in the action of the major lipolysis-regulating hormones, catecholamines and insulin, the lipolytic effect of catecholamines being more pronounced and the antilipolytic effect of insulin being weaker in visceral than in subcutaneous adipose tissue.³⁹

Our results indicated a higher TFA load than in previous publications. These data show a higher consumption of these fatty acids in the Brazilian diet.

In conclusion, our study has shown higher levels of TFA in visceral adipose tissue than the other abdominal fats (subcutaneous and retroperitoneal). The major concentration of TFA in visceral adipose tissue is worrisome, because the higher rate of lipolysis in this specific tissue appears to be an important indicator for metabolic alterations. Dietary TFA may act as a signaling molecule in lipid metabolism, but further work is necessary to confirm this.

The authors thank Doctors José F. Bortolotto and Pedro Furian for non-obese adipose tissues for the analyses. Thanks too for the Nurses' time in all the hospitals cited above and to Doctor Alexandre Padoin for help with storing the tissues. This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

1. Buchwald H, Williams SE. Bariatric surgery worldwide. *Obes Surg* 2004; 14: 1157-64.
2. Martins IJ, Redgrave TG. Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine. *J Nutr Biochem* 2004;15: 130-41.
3. Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest* 2004; 113: 1530-2.
4. Garland M, Sacks FM, Colditz GA et al. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 25-30.
5. Oomen CM, Ocké MC, Feskens EJM et al. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *Lancet* 2001; 357: 746-51.
6. Seppanen-Laakso T, Laakso I, Backlund P et al. Elaidic and trans-vaccenic acids in plasma phospholipids as indicators of dietary intake of 18:1 trans-fatty acids. *J Chromatogr B* 1996; 687: 371-8.
7. Zock PL, Katan MB. Hydrogenation alternatives: effects of trans fatty acids and stearic acids versus linoleic acids on serum lipids and lipoproteins in humans. *J Lipids Res* 1992; 33: 399-410.
8. Judd JT, Clevidence BA, Muesing RA et al. Dietary trans fatty acids: effects of plasma lipids and lipoproteins on healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 861-8.
9. Aro A, Jauhiainen M, Partanen R et al. Stearic acid trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoproteins, lipids and lipoproteins, lipoprotein (a), and lipid transfer proteins in health subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1419-26.
10. Ascherio A, Katan MB, Zock PL et al. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1994-8.
11. Martin CA, Carapelli R, Visantainer JV et al. Trans fatty acids content of Brazilian biscuits. *Food Chem* 2005; 93: 445-8.
12. Kummerow FA, Zhou Q, Mahfouz MM et al. Trans fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells. *Life Sci* 2004; 74: 2707-23.
13. Bray AG, Lovejoy JC, Smith SR et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr* 2002; 132: 2488-91.
14. Lefevre M, Lovejoy J, Smith S et al. Acute effects of dietary trans fatty acids on postprandial insulin, glucose and triglyceride levels. *FASEB J* 1999 13: A54 (abst).
15. Summers LKM, Barnes SC, Fielding BA et al. Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1470-7.
16. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM et al. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 905-11.
17. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
18. Bailey AL, Southon S. Determination of total long-chain fatty acids in human plasma and lipoproteins, before and during copper-stimulated oxidation, by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chem* 1998; 70: 415-9.
19. AOAC Official and Recommended Practices, 5th Edn. Method 2000.10. Champaign, IL: AOCS press, 2000.
20. Fritsche J, Steinhart H, Mossoba MM et al. Rapid determination of trans-fatty acids in human adipose tissue. Comparison of attenuated total reflection infrared spectroscopy and gas chromatography. *J Chromatogr B* 1998; 705: 177-82.
21. Adam M, Mossoba MM, Lee T. Rapid determination of total trans fat content by attenuated total reflection infrared spectroscopy: An international collaborative study. *J Am Oil Chem Soc* 2000; 77: 457-62.
22. Mossoba MM, Yurawecz MP, Delmonte P et al. Overview of infrared methodologies for trans fat determination. *J AOAC Int* 2004;87: 540-4.
23. Semma M. Trans fatty acids: properties, benefits and risks. *J Health Sci* 2002; 48: 7-13.
24. Soares LMV, Franco M.R.B. Níveis de trans isômeros e composição de ácidos graxos de margarinas e produtos hidrogenados semelhantes. *Cien Tecnol Aliment* 1990; 10: 57-71.
25. Basso R, Almeida IG, Mancini JF. Avaliação qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos trans em gorduras vegetais hidrogenadas. *Bol SBCTA* 1999; 33: 57-63.
26. Block JM, Barrera-Arellano D. Hydrogenated products in Brazil: trans isomers, physico-chemical characteristics and fatty acid composition. *Arch Latinoam Nutr* 1994; 44: 281-5.
27. Azevedo CH. Teores de isômeros trans em gorduras vegetais hidrogenadas avaliadas por diferentes técnicas instrumentais [dissertation]. Unicamp; 1999.

28. Martin CA, Matshushita M, Souza NE. Ácidos graxos trans: implicações nutricionais e fontes na dieta. *Rev Nutr* 2004; 17: 361-8.
29. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional 2003. Pub. L. n° 360 RDC.
30. Brandt MB, LeGault LA. What's new on nutrition labeling at the United States Food and Drug Administration. *J Food Comp and Anal* 2003; 16: 383-93.
31. FAO/OMS – Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916 Geneva, 2003.
32. Dlouhy P, Tvrzická E, Stanková B et al. Higher content of 18:1 trans fatty acids in subcutaneous fat of persons with coronarographically documented atherosclerosis of coronary arteries. *Ann Nutr Metab* 2003; 47: 302-5.
33. Aro A, Kardinaal AFM, Salminen I et al. Adipose tissue isomeric trans fatty acids and risk of myocardial infarction in nine countries: the EURAMIC study. *Lancet* 1995; 345: 273-8.
34. Roberts TL, Wood DA, Riemersma RA et al. Trans isomers of oleic and linoleic acids in adipose tissue and sudden cardiac death. *Lancet* 1995; 345: 278-82.
35. Van Staveren WA, Deurenberg P, Katan MB et al. Validity of the fatty acids compositions of subcutaneous fat tissue microbiopsies as an estimate of the long term average fatty acid composition of the diet of separate individuals. *Am J Epidemiol* 1986; 123: 455-63.
36. Hudgins LC, Hirsch J, Emken EA. Correlation of isomeric fatty acids in human adipose tissue with clinical risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 474-82.
37. London SJ, Sacks FM, Caesar J et al. Fatty acids composition of subcutaneous adipose tissue and diet in post menopausal US women. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 340-5.
38. Boue C, Combe N, Billeaud C et al. Trans fatty acids in adipose tissue of French women in relation to their dietary sources. *Lipidis* 2000; 35: 561-6.
39. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21: 697-738.

(Received June 20, 2005; accepted August 16, 2005)

CAPÍTULO II

**Adipose Tissue distribution and Quantification of PPAR β / δ and PPAR γ 1-3 mRNAs:
discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of
morbidly obese patients**

(manuscrito aceito para publicação)

Referência: Obesity Surgery

**Adipose Tissue distribution and Quantification of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs:
discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of
morbidly obese patients**

Josiane Woutheres Bortolotto¹, Rogério Margis¹ PhD, Ângela Cristina Ferreira¹, Alexandre Vontobel Padoin² MB, Cláudio Cora Mottin² PhD, Regina Maria Guaragna¹ PhD,

¹ Departamento de Bioquímica – UFRGS. ² Centro de Obesidade Mórbida – PUCRS.

Regina Maria Guaragna

Address: Departamento de Bioquímica. ICBS. UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo

CEP 90.035-003. Porto Alegre. RS.

Brazil.

e-mail: rguaragna@terra.com.br

Tel: 55 51 3316 5546 or 55 51 3316 5539

FAX number : 55 51 3316 5540

Adipose Tissue Distribution and Quantification of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs

Abstract

Background: Adipose tissue (AT) metabolism is altered in obese subjects and the reestablishment of energy homeostasis requires the identification and regulation of genes with altered patterns. The aim of this study was to compare mRNA expression of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 in morbidly obese and non-obese patients. The expression pattern of these receptors in various abdominal tissues (AT), subcutaneous (SAT), retroperitoneal (RAT) and visceral (VAT), was also evaluated.

Methods: The AT depots were obtained by surgery; total RNAs were extracted using TRIzol, and PPARs reverse *transcripts* were determined by quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Results: The amounts of PPAR β/δ mRNA in different depots of morbidly obese AT showed a significant decrease in VAT ($p < 0.05$). In the non-obese group, the level of PPAR β/δ was higher in SAT ($p < 0.05$), but PPAR γ 1-3 was not differentially expressed in obese and non-obese depots. When comparing obese and non-obese, the results revealed a decrease in PPAR β/δ expression in SAT ($p = 0.058$) and VAT ($p = 0.094$) of the morbidly obese. PPAR γ 1-3 mRNA expression was increased significantly in SAT ($p = 0.022$) and decreased in RAT ($p = 0.034$) in morbidly obese subjects. PPAR β/δ expression in SAT and VAT correlated negatively with hip size and insulin serum respectively. PPAR γ 1-3 expression in RAT correlated negatively with waist and hip size and in VAT correlated positively with waist size.

Conclusions: The present study demonstrates that PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs are quantitatively different in AT of morbidly obese individuals compared to non-obese and that PPAR β/δ mRNA levels are characteristic for each AT depot.

Key words: adipose tissue depots, PPAR β/δ , PPAR γ 1-3, morbid obese, non-obese.

Introduction

Obesity is defined as a state of pathologically excessive adipose tissue (AT) mass, conferring a higher risk of cardiovascular and metabolic disorders¹. Morbid obesity is an important public health problem²⁻⁴, and is associated with serious co-morbid effects, including hypertension, diabetes, peripheral resistance insulin and dyslipidemia².

There is growing evidence that the distribution of body fat influences the metabolic consequences of obesity. Abdominal adipose tissue depots – intra-abdominal adipose tissue (visceral or intraperitoneal and retroperitoneal) and subcutaneous adipose tissue - are metabolically active and appear to be important for the pathogenesis of insulin resistance, dyslipidemia, glucose intolerance, hypertension, hypercoagulable state and cardiovascular risk⁵. These depots are metabolically different and have profound differences in their gene expression profile⁶.

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor superfamily⁷ and there are three related PPAR isoforms: PPAR α , PPAR γ , and PPAR β/δ , with different ligand specificities and tissue distribution⁸. PPAR α is mainly expressed in liver, brown AT, small intestine, skeletal muscle and heart. PPAR γ is expressed in white and brown AT, placenta, large intestine and macrophages. PPAR β/δ is the most widely expressed gene but has higher levels in skeletal and cardiac muscle and white AT⁹.

The PPAR γ gene contains three promoters that yield three isoforms, namely, PPAR γ 1, PPAR γ 2, and PPAR γ 3. PPAR γ 1 and PPAR γ 3 *transcripts translate* into the identical PPAR γ 1 protein¹⁰ while PPAR γ 2 protein contains an additional N-terminal 28 amino acid exon¹¹. PPAR γ 1 is found in a broad range of tissues, whereas PPAR γ 2 is restricted to AT. PPAR γ 3 is abundant in macrophages, large intestine and white AT¹⁰. PPAR γ regulates the formation and function of fat cells. The effect of PPAR γ activation is seen in all aspects of the mature cell phenotype, including morphological changes, lipid accumulation and acquisition of insulin

sensitivity¹². Their ligands include dietary fatty acids, prostaglandins of the J series, including 15d-PGJ₂¹³, and antidiabetic compounds of the thiazolidinedione (TZD) class⁹.

PPAR β/δ initially received much less attention than the other PPARs. However genetic studies and the recent development of synthetic PPAR β/δ agonist have helped to reveal its role as a powerful regulator of fatty acid catabolism and energy homeostasis. The PPAR β/δ agonist GW501516 was shown to lower plasma triglyceride levels in obese monkeys while raising high-density lipoprotein levels (HDL), prompting the initiation of clinical trials to assess its efficacy in hyperlipidemic patients¹⁴. *Transgenic* expression of an activated form of PPAR β/δ in AT produces lean mice that are resistant to obesity, hyperlipidemia and tissue steatosis induced genetically or by a high fat diet¹⁵. The activated receptor induces genes required for fatty acid catabolism and adaptive thermogenesis¹⁴.

Morbidly obesity is associated with disturbances in lipid and glucose metabolism. We investigated whether the expression of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 was modulated in morbidly obesity. The aim of this work was thus to evaluate the mRNA levels of these receptors in morbid obese patients and compare them with normal weight subjects. As AT depots have metabolic variables and play a yet unknown role in obesity, we compared PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 in different abdominal AT: subcutaneous, retroperitoneal and visceral.

Materials and Methods

Samples

Samples of VAT (omentum), RAT and SAT were obtained from 10 morbidly obese patients who underwent bariatric surgery. The extensive clinical and laboratory data routinely collected for each patient is shown in Table 1. Apart from obesity, all subjects were in good health and were not taking any medication affecting adipocyte metabolism. Similar samples of

VAT, RAT and SAT were obtained from 10 non-obese patients who underwent elective surgery. The age range was from 23 to 52 years, and the body mass index (BMI) from 17.9 to 29.0 Kg/m². Samples were collected during surgery and were immediately immersed in TRIzol reagent. The study was approved by the Ethics Committee of the University Federal of Rio Grande do Sul. All subjects gave written informed consent.

Analysis of human PPARs gene expression

Approximately 2 µg of total RNA were added to each cDNA synthesis reaction using the SuperScript-II RT preamplification system (Invitrogen). Reactions were performed at 42°C for 1 h using the primer T23V (5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV). Quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification was carried out using specific primer pairs designed with Oligo Calculator version 3.02 (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) and synthesized by RW-Genes (RJ, Brazil). The sequences of the primers used are listed in Table 2. qRT-PCRs were carried out in an Applied-Biosystem 7500 real-time cycler. Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 10 s at 94°C, 15 s at 60°C, 15 s at 72°C and 35 s at 60°C; samples were held for 2 min at 40°C for annealing and then heated from 55 to 99°C with a ramp of 0.1°C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were carried out in 20 µl final volume composed of 10 µl of each reverse *transcription* sample diluted 50 to 100 times, 2 µl of 10 times PCR buffer, 1.2 µl of 50 mM MgCl₂, 0.1 µl of 5 mM dNTPs, 0.4 µl of 10 µM primer pairs, 4.25 µl of water, 2.0 µl of SYBR green (1:10.000 Molecular Probe), and 0.05 µl of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Invitrogen).

Data analysis

We quantified gene expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (threshold cycle) method¹⁶. For each sample, analyzed in triplicate, a ΔC_T value was obtained by subtracting the β -actin C_T value from the C_T of the gene of interest. Relative PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA intra-tissue expression levels were normalized to PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mean expression of VAT. To compare morbidly obese and non-obese expression, PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 levels were normalized to the average expression values of non-obese AT for each tissue depot.

Statistical analysis

Data is shown as mean \pm SE. Mean values for PPARs expression in SAT, RAT and VAT in obese or non-obese group were compared by the non-parametric Friedman test. PPARs expression in obese and non-obese patients in the same AT depot was assessed using the Mann-Whitney U and correlation coefficients determined using the Spearman statistical package. Differences between groups were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

The expression of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA in SAT, RAT and VAT of morbidly obese and non-obese subjects was assessed by qRT-PCR. Table 3 reflects the expression profile of three distinct AT depots (SAT, RAT and VAT) in morbidly obese and non-obese tissues. The morbidly obese group showed significant differences in the pattern of PPAR β/δ mRNA expression in AT depots. We observed a decreased expression of this receptor in the VAT of obese subjects ($p= 0.025$). The PPAR γ 1-3 mRNA distribution in various AT depots in this group showed no differences in mRNA expression.

The non-obese group presented a different expression profile of PPAR β/δ mRNA in the AT depots analyzed. In this group, SAT revealed a more pronounced expression ($p= 0.021$) of

the receptor than RAT and VAT. However, the PPAR γ 1-3 mRNA expression profile in non-obese subjects did not differ in three AT depots.

Table 4 represents the mRNA expression of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 in different depots of AT in morbidly obese compared to non-obese patients. There was a PPAR β/δ decrease in SAT of morbidly obese subjects ($p= 0.058$) and a tendency for decreased expression of this receptor in the VAT of the obese group ($p=0.094$). However, no significant differential expression of this nuclear receptor was observed when RAT from morbidly obese was compared to non-obese subjects.

We also compared PPAR γ 1-3 in the same depots of AT from morbidly obese and non-obese patients. PPAR γ 1-3 mRNA expression was significantly increased ($p= 0.022$) in SAT of morbidly obese compared to non-obese subjects. In contrast, RAT presented a significant decrease of PPAR γ 1-3 mRNA levels in the morbidly obese ($p= 0.034$). The expression was not different in VAT from both groups of patients.

In obese AT depots with anthropometric and biochemical variables there was a significant negative correlation between PPAR β/δ SAT expression with hip size ($r =-0.886$, $p= 0.019$), and a tendency for negative correlation with waist size ($r =-0.771$, $p= 0.072$). There was also a significant negative correlation between PPAR β/δ VAT expression with insulin serum level ($r =-0.900$, $p= 0.037$). No correlation was found with PPAR β/δ RAT expression. PPAR γ 1-3 expression correlated with anthropometric variables. A negative correlation was found between PPAR γ 1-3 RAT expression and waist ($r = -1.000$, $p< 0.0001$) and hip size ($r = -0.900$, $p= 0.037$). However, a positive correlation was found between PPAR γ 1-3 VAT expression and waist size ($r =0.900$, $p= 0.037$).

Discussion

Obesity is a heterogeneous disorder and a knowledge of the regional distribution of AT is important to understand the relationship between obesity and disturbances in glucose and lipid metabolism¹⁷. PPARs *transcriptional* factors are nuclear receptors and the major gene regulators of lipid and glucose metabolism, allowing adaptation to the prevailing nutritional environment¹⁸. Information on site-related gene expression of PPARs in different human AT depots is limited¹⁹

PPAR β/δ enhances fatty acid catabolism and energy uncoupling in AT and muscle and may potentially be used to control weight gain²⁰. Surprisingly, no studies have examined PPAR β/δ mRNA expression in different depots of human AT. Our results showed that morbidly obese subjects had difference in PPAR β/δ mRNA expression pattern when analyzed in three different depots. VAT of individuals from this group showed a minor expression of PPAR β/δ and there was no difference between SAT and RAT. These could be contributing to the visceral obesity typical of the morbidly obese. Non-obese patients had a higher expression of PPAR β/δ mRNA in SAT. The SAT of normal weight subjects may have a more pronounced up-regulation of genes involved in fatty acid oxidation and energy dissipation, but further investigations are needed to clarify this.

PPAR γ is an adipocyte master *transcription* factor that, when activated by natural or synthetic agonists¹³, triggers expression of terminal differentiation-related genes and adipogenesis²¹. Unlike PPAR β/δ expression, PPAR γ 1-3 receptor *transcripts* did not differ significantly between the three AT of morbidly obese, or of non-obese, patients. These results agree with a previous study of total PPAR γ expression in SAT and VAT of nondiabetic subjects. Normolipidemic morbidly obese men revealed a similar intensity of this receptor²². Lefebvre *et al*²³ and Montague *et al*²⁴ also found no difference between total PPAR γ expression in omental and SAT.

A different scenario appeared when the two groups of individuals, normal weight and morbidly obese, were compared for amounts of PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA isoforms in the same depot-specific AT. For the first time, PPARs expression in RAT has been analyzed and no significant difference in PPAR β/δ expression found between obese and non-obese subjects. However, PPAR γ 1-3 expression was down-regulated in obese subjects in this tissue. In corroboration, correlation analysis revealed a negative coefficient between PPAR γ 1-3 RAT and waist and hip size. Studies in men with a wide range of adiposity showed that intra-abdominal AT mass was changed in obesity. Lean subjects had 58% visceral mass and 42% retroperitoneal mass, while these tissues in obese subjects were 69% and 31%, respectively²⁵. This could be explained by down-regulation of PPAR γ 1-3, adipogenic *transcriptional* factor, and the lack of difference in PPAR β/δ in RAT found in our obese study group.

Our results revealed reduced PPAR β/δ expression in SAT and a tendency for decreased expression in VAT of morbidly obese patients compared to non-obese. Activation of PPAR β/δ in AT specifically induces expression of genes required for FA oxidation and energy dissipation, which reduces adiposity¹⁵. Down-regulation of PPAR β/δ SAT could be implicated in obesity, as it was correlated negatively with hip and waist size in morbidly obese patients. PPAR β/δ expression in VAT could be associated with visceral obesity and metabolic syndrome since it was correlated negatively with serum insulin levels.

PPAR γ 1-3 expression was increased in obese SAT but no difference was found in VAT for either group. Previous studies compared nuclear receptor expression in obese and non-obese humans and results are still controversial^{21,22,26}. These studies used semi-quantitative RT-PCR or Northern blots to measure mRNAs, and there was a large individual variation in PPAR γ expression. In the present study, PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA levels were quantified using a highly sensitive quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) assay.

The increase of PPAR γ 1-3 mRNA expression found in SAT of the morbidly obese group is in agreement with the paradox of TZD²⁷. TZD are agonists of PPAR γ , commonly used in the treatment of diabetes mellitus, improving insulin sensitivity while simultaneously causing weight gain. This effect is markedly enhanced in subcutaneous fat, with less effect in visceral fat^{28,29}. However, there is relationship between this receptor expression in VAT and anthropometric data, waist size. It is important to remember that we used PPAR γ 1-3 to understand its relationship with obesity. In view of this, we examined the assembly of PPAR γ 1 and PPAR γ 3 expressions (PPAR γ 1-3) that differ in their 5' non-translated region but encode the same protein sequence¹⁰.

Our correlation data suggests an effective participation of SAT, VAT and PPAR β/δ expression in obesity. At this time, GW501516, a selective activator of PPAR β/δ , has been proposed as a pharmacological target for the treatment of dyslipidemia, obesity, insulin resistance and vascular inflammation, and is now in clinical development³⁰. Connecting the possible function of this agonist with the low level of PPAR β/δ mRNA found in our research in the obese group, it is possible to suggest that this pharmacological target could be effective in the treatment of obesity.

Obesity could be a result of imbalance of many genes related to metabolism. Microarray studies have shown a deregulated expression of genes in human obesity³¹⁻³³. A study in morbidly obese subjects revealed that 85.5% of genes were up-regulated and 14.5% down-regulated³¹. Our data suggest a probable imbalance in PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 expression regulating adipocyte development: down regulated genes involved in fatty acid oxidation and energy dissipation and increased genes related to adipogenesis.

In conclusion, the present study demonstrates that PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 are differentially expressed in the AT of morbidly obese individuals compared to non-obese. These patterns of gene expression will contribute to the understanding of the pathogenesis of obesity-related disorders and provide potential targets for future therapy. A knowledge of the distribution

of the nuclear receptors in different AT depots may be important to implement therapeutic researches in a specific manner.

Acknowledgements

The authors thank Doctors José F. Bortolotto and Pedro Furian for non-obese AT for the analyses. Thanks too for the Nurses' time in all the hospitals cited above and Dr. Maria Luisa Pereira for lending Real-time PCR apparatus. This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Dr. R. Margis is the recipient of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

References

1. Campos MG. Cañete RR. Gil A. Adiponectin. The missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 2004; 23: 963-974.
2. Adami GF. Camerini GG. Ravera NS *et al.* Metabolic syndrome in severely obese patients. *Obes Surg* 2001; 11: 543-545.
3. Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people (Editorial). *Obes Surg* 2003; 13: 329-30.
4. Lee WJ. Wang W. Bariatric surgery: Asia-Pacific perspective. *Obes Surg* 2005; 15: 751-757.
5. Misra A. Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition* 2003; 19: 457-466.
6. Vohl MC. Sladek R. Robitaille J *et al.* A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 2004; 12: 1217-1222.

7. Takahashi S. Tanaka T. Kodama T *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ). A novel target site for drug discovery in metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 2006; 53: 501-507.
8. Tanaka T. Yamamoto J. Iwasaki S *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *PNAS* 2003; 100: 15924-15929.
9. Grimaldi. PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Prog Lipid Res* 2001; 40: 269-281.
10. Kota BP. Huang THW. Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; 51: 85-94.
11. Meirhaeghe A. Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. *Mol Genet and Metab* 2004; 83: 93-102.
12. Panunti B. Fonseca V. Effects of PPAR gamma agonists on cardiovascular function in obese non-diabetic patients. *Vasc Pharmacol* 2006; 45: 29-35.
13. Mehrabi MR. Haslmayer P. Humpeler S *et al.* Quantitative analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression in arteries and hearts of patients with ischaemic or dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2003; 5: 733-739.
14. Evans RM. Barish GD. Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004; 10: 1-7.
15. Wang YX. Lee CH. Timp S *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003; 113: 159-170.
16. Livak KJ. Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
17. Rattarasarn C. Physiological and pathophysiological regulation of regional adipose tissue in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. *Acta Physiol* 2006; 186: 87-101.

18. Ferré P. The biology of Peroxisome proliferator-activated receptors: Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2004; 53: S43-S50.
19. Montague CT. Prins JB. Sanders L *et al.* Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 1998; 47: 1384-1391.
20. Barish GD. Narkar VA and Evans RM. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 590-597.
21. Krempler F. Breban D. Oberkofler H *et al.* Leptin. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . and CAAAT/Enhancer Binding Protein- α mRNA Expression in Adipose Tissue of Humans and Their Relation to Cardiovascular Risk Factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:443-449.
22. Auboeuf D. Riuesset J. Fajas J *et al.* Tissue distribution and Quantification of the expression of mRNAs of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Liver X Receptor-alpha in humans: No alterations in Adipose tissue of Obese and NIDDM Patients. *Diabetes* 1997; 46: 1319-1327.
23. Lefebvre AM. Laville M. Vega N *et al.* Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 1998; 47: 98-103.
24. Yanase T. Yashiro T. Takitani K *et al.* Differential expression of PPAR γ 1 and γ 2 isoforms in human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 320-324.
25. Bouchard C. Despres J-P. Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev* 1993; 14:72-93.
26. Vidal-Puig AJ. Considine RV. Jimenez-Liñan M *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene Expression in Human Tissues: Effects of Obesity. Weight Loss and Regulation by Insulin and Glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99: 2416-2422.
27. Fonseca V. Effect of Thiazolidinediones on Body Weight in Patients with Diabetes Mellitus. *Am J Medic* 2003; 115: 42S-48S.

28. Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burris TP. PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:456–458.
29. Albrektsen T, Frederiksen KS, Holmes WE. *et al.* Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. *Diabetes* 2002; 51: 1042–1051.
30. Gross BS, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ : A novel target for the reduction of atherosclerosis. *Drug Discovery today : Therapeutical Strategies* 2005; 2: 237-243.
31. Baranova A, Collantes R, Gowder SJ *et al.* Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes Surg* 2005; 15: 758-765.
32. Lee YH, Nair S, Rousseau E. *et al.* Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia* 2005; 48: 1776–1783.
33. Von Eyben FE, Kroustrup JP, Larsen JF *et al.* Comparison of gene expression in intra-abdominal and subcutaneous fat: a study of men with morbid obesity and nonobese men using microarray and proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1030:508-36

Tables:**Table 1:** Anthropometric and biological parameters of morbidly obese patients (n=10)

	Mean (\pmSE)	Range
Age (years)	33.9 (\pm 1.6)	(24-39)
BMI (Kg/m ²)	50.3 (\pm 2.3)	(40.7-63.6)
Waist (cm)	132.4 (\pm 4.6)	(108-149)
Hip (cm)	144.7 (\pm 4.4)	(125-170)
Glicemia (mg/dL)	104.2 (\pm 7.6)	(77-153)
Total cholesterol (mg/dL)	199.3 (\pm 12.0)	(141-273)
HDL cholesterol (mg/dL)	50.0 (\pm 5.0)	(22-82)
LDL cholesterol (mg/dL)	115.2 (\pm 6.8)	(70-151)
Triglycerides (mg/dL)	195.2 (\pm 20.6)	(104-289)
Insulin (mcU/mL)	26.2 (\pm 3.2)	(14.0-43.4)
ALT (U/L)	32.9 (\pm 2.7)	(21-43)
AST (U/L)	27.4 (\pm 6.2)	(13-79)

Table 2: Oligonucleotides used in qRT-PCR reactions, 5' to 3'

Gene	Forward primer	Reverse primer
PPAR β/δ	AATGCCTACCTGAAAACTT CAAC	GTGCACGCTGATTCCTTGT
PPAR γ 1-3	AGGCCATTTTCTCAAAC	AGAAATGCTGGAGAAGTCAAC A
β -actin	CCACGAAACTACCTTCAACT CC	TCATACTCCTGCTGCTGCTTGC TGATCC

Table 3: Expression of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA in various abdominal AT in obese and non-obese subjects

Adipose tissue	SAT	RAT	VAT	p
PPARβ/δ (Mean\pmSE)				
Obese	5.21 \pm 1.58	5.24 \pm 1.80	1.85 \pm 0.80	0.025
Non-obese	7.60 \pm 2.97	1.58 \pm 0.66	0.72 \pm 0.18	0.021
PPARγ1-3(Mean\pmSE)				
Obese	6.48 \pm 2.93	4.07 \pm 0.97	3.36 \pm 1.25	NS
Non-obese	2.58 \pm 1.23	4.90 \pm 1.76	2.02 \pm 0.66	NS

To compare the expression pattern of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA in different abdominal AT: subcutaneous (SAT), retroperitoneal (RAT) and visceral (VAT) tissues of morbidly obese or non-obese subjects, relative expressions were normalized against β -actin (Δ Ct) and the mean of visceral adipose tissue ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}). NS = Not Significant

Table 4: PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 expression in morbidly obese compared to non-obese subjects in different depots of AT .

	Obese	Non-obese	p
PPARβ/δ	(Mean\pmSE)	(Mean\pmSE)	
SAT	0.61 \pm 0.20	3.60 \pm 2.03	0.058
RAT	4.37 \pm 1.43	3.58 \pm 1.62	NS
VAT	1.27 \pm 0.50	8.68 \pm 4.18	0.094
PPARγ1-3	(Mean\pmSE)	(Mean\pmSE)	
SAT	5.60 \pm 2.45	1.19 \pm 0.27	0.022
RAT	0.34 \pm 0.08	2.59 \pm 1.03	0.034
VAT	1.31 \pm 0.51	1.62 \pm 0.57	NS

To obtain the relative quantity of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA in different abdominal AT: subcutaneous (SAT), retroperitoneal (RAT) and visceral (VAT) of morbidly obese compared to non-obese, relative expressions were normalized against β -actin (Δ Ct) and the mean of each respective non-obese adipose tissue ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}). NS = Not Significant

3 DISCUSSÃO

A função de óleos e gorduras na nutrição humana tem sido intensamente pesquisada nas últimas décadas. Não somente a quantidade, mas também a qualidade da gordura da dieta vêm sendo discutidas em relação à obesidade, resistência à insulina e desenvolvimento de doenças cardíacas (Semma, 2002; Bray *et al* 2002; Martin *et al*, 2004).

Os AG *trans* sempre estiveram presentes na alimentação humana, através do consumo de alimentos provenientes de animais ruminantes. Entretanto, a substituição da gordura animal pela gordura vegetal hidrogenada, aumentou significativamente a presença destes isômeros na dieta humana (Feldman *et al*, 1996). No Brasil, a hidrogenação de óleos vegetais começou por volta de 1960. Nos últimos anos, a indústria nacional de gordura hidrogenada esteve mais voltada para o desenvolvimento de produtos que atendessem às necessidades da indústria de alimentos (textura, estabilidade à oxidação e menor custo), sem se preocupar com os níveis de isômeros *trans* (Basso *et al*, 1999).

Os isômeros *trans* podem ser incorporados aos tecidos e metabolizados de maneira semelhante aos AG de configuração *cis*, competindo inclusive pelos mesmos sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de AG polinsaturados e eicosanóides (Mahfouz & Kummerow, 1999). O TA é considerado um biomarcador apropriado para se determinar o consumo de AG não sintetizados pelo organismo, como por exemplo, os AG *trans*. A composição de AG, neste tecido, representa o consumo a longo prazo, refletindo a ingestão destes durante meses e até anos (Garland *et al*, 1998).

Neste trabalho, nós utilizamos diferentes depósitos do TA: subcutâneo, retroperitoneal e visceral de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica e pacientes não obesos submetidos a cirurgias eletivas abdominais. O conteúdo total de AG *trans* foi medido através da Espectroscopia de Infravermelho acoplado ao Acessório de Refletância Total Atenuada (Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance FTIR-ATR). A determinação dos isômeros *trans* através de espectroscopia de infravermelho está baseada na vibração da deformação C-H fora do plano característico da ligação *trans* que é absorvida na banda de 966 cm^{-1} (Adam *et al*, 2000; Mossoba *et al*, 2004).

Os resultados da nossa pesquisa revelaram, em pacientes obesos, um maior depósito de AG *trans* no TAV ($8,74\% \pm 0,29$) do que no TAR ($6,40\% \pm 0,50$), com uma diferença significativa para $p=0,001$. No grupo de pacientes não obesos, também foi encontrada uma diferença significativa no conteúdo de AG *trans*, comparando TAV ($9,29\% \pm 0,59$) e TAS ($6,94\% \pm 0,72$; $p=0,05$). O TAR de pacientes não obesos não foi analisado, visto que a retirada deste tecido não é protocolo das cirurgias abdominais eletivas. Ao se comparar obesos e não obesos, não observamos diferença estatística na quantidade de AG *trans* depositada entre os TAV, bem como entre TAR e TAS dos respectivos grupos.

No grupo de pacientes obesos, também foi analisada a concentração de AG *trans* no TAS ($6,52\% \pm 0,69\%$, $n=3$). Entretanto, devido ao método cirúrgico aplicado (inúmeras vezes por vídeolaparoscopia e por questões plásticas) o TAS não foi retirado, ocasionando um menor número de amostras. Comparando-se o conteúdo de AG *trans* encontrado neste tecido com o TAR, observamos quantidades similares, o que nos permite sugerir que o TAR se comporta de forma semelhante ao TAS quanto ao depósito de AG *trans*.

O conteúdo de AG *trans* depositado nos diferentes TA dos pacientes obesos e não obesos estudados foi elevado quando comparado com outros países. Na década de 80, na Suécia, Katan e colaboradores (1986) e Van Staveren e colaboradores (1986) revelaram uma média de 4,9% de AG *trans* total depositados no TAS (Katan *et al*, 1986; Van Staveren *et al*, 1986). Na antiga

União Soviética, Thomas e colaboradores (1983), analisando TAS de pacientes com óbito por doença cardíaca isquêmica, encontraram 3,1% de AG *trans* total nestes indivíduos contra 3,3% no grupo controle (Thomas *et al*, 1983). Nos EUA, em 1991, Hudgins e colaboradores encontraram 4,1% de AG *trans* total no TAS de pacientes com risco para doença cardiovascular (Hudgins *et al*, 1991). Também nos EUA, London e colaboradores (1991), analisando o TAS de mulheres pós-menopausa, encontraram 4,3% de AG *trans* (London *et al*, 1991). Mamalakis e colaboradores (2002), analisando TA abdominal (subcutâneo) e TA da região gluteal de crianças, encontraram concentrações de AG *trans* de $1,8\% \pm 0,6\%$ e $1,5\% \pm 0,4\%$, respectivamente (Mamalakis *et al*, 2002). Também Dlouhý e colaboradores (2003), analisando TAS de pacientes com aterosclerose na artéria coronária encontraram um total de $2,88 \pm 1,19\%$ de AG *trans* neste grupo de pacientes e $2,56 \pm 0,89\%$ no grupo controle (Dlouhý *et al*, 2003).

Fritsche e colaboradores (1998) constataram que os níveis de AG *trans*, no TA de humanos, são usualmente maiores quando determinados por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR-ATR) do que por Cromatografia Gasosa. Eles encontraram, em TAS, $2,59 \pm 0,20\%$ de AG *trans* total por cromatografia e $3,07 \pm 0,27\%$ por FTIR-ATR (Fritsche *et al*, 1998). O método cromatográfico subestima o isômero *trans* C18:1 a favor do isômero *cis* C18:1 uma vez que as bandas podem se justapor por essa metodologia. Apesar de a Cromatografia Gasosa subestimar os valores deste AG, Garland e colaboradores (1998), utilizando este método, encontraram no TAS de mulheres americanas níveis de AG *trans* total de $6,1\% \pm 1,3\%$ (Garland *et al*, 1998). Resultado que se aproxima aos valores encontrados neste trabalho para o tecido subcutâneo, mesmo utilizando a técnica de FTIR-ATR. Observa-se que, na década de 90, em outros países, os resultados ainda eram mais elevados, pois não existia uma política de redução deste AG na indústria de alimentos. Acredita-se que, no futuro, tenhamos também este índice reduzido.

O tecido adiposo retroperitoneal é ainda pouco estudado e não se tem relato da análise de conteúdo de AG *trans* neste tecido. Abate e colaboradores (1994 e 1997) sugeriram que existem

diferenças metabólicas entre TAV e TAR e encontraram uma diminuição do TAR na obesidade (Abate *et al*, 1994 e 1997). Dados da literatura mostram que o TAR se distingue do TAV por suas conexões vasculares. Enquanto o TAV drena os AG para a veia porta, o TAR libera para a veia cava, disponibilizando seus AG para a circulação sistêmica, como o TAS (Garg, 2004). Os resultados encontrados neste trabalho nos permitem sugerir que o depósito de AG *trans* no TAR dos pacientes obesos, comporta-se de maneira semelhante ao depósito destes AG no TAS, possivelmente por questões vasculares.

Igualmente, revisando a literatura, não foi encontrada nenhuma pesquisa que determinasse o conteúdo de AG *trans* no TAV, apesar de ser um tecido envolvido com a síndrome metabólica. Nosso trabalho registrou níveis elevados de AG *trans* no TAV tanto de pacientes obesos quanto não obesos. Estudos *in vitro* revelaram que os adipócitos viscerais são lipoliticamente mais ativos do que os adipócitos subcutâneos (Mauriege *et al*, 1987; Rebuffe-Scrive *et al*, 1989) e que *in vivo* liberam AG direto para a veia porta (Garg, 2004). Nielsen e colaboradores (2004), avaliando o efeito da lipólise do TAV em obesos e não obesos, concluíram que obesos contribuem com um maior aporte de AG para a circulação porta, provavelmente pelo aumento da massa de tecido adiposo e subsequente lipólise (Nielsen *et al*, 2004).

O acúmulo de TA dentro da cavidade abdominal, ou obesidade visceral, tem sido associado a uma série de alterações metabólicas como resistência à insulina, hiperinsulinemia, elevado níveis de triglicérides, baixo HDL e hipertensão como principais características (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults; Arner, 1995). Como os AG *trans* estão envolvidos na modulação do perfil lipídico, na resistência a insulina (Ibrahim *et al*, 2005; Risérus, 2006) e na hipertensão (Mozaffarian, 2006), pode-se sugerir que um maior depósito destes AG graxos na cavidade abdominal dos pacientes obesos pode estar relacionado às complicações metabólicas da obesidade. Para confirmar esta sugestão, mais estudos devem ser realizados.

Visto que os *AG trans* não são sintetizados pelo organismo humano, ou seja, são provenientes da dieta, nossos resultados também apontam para um alto consumo de produtos alimentícios ricos nestes *AG* na população estudada. Trabalhos mostram que, com o desenvolvimento das técnicas de hidrogenação, a gordura vegetal hidrogenada desbancou rapidamente o consumo de gordura animal na dieta do povo Brasileiro (Martin *et al*, 2005). Segundo Larqué e colaboradores (2001), os alimentos contendo gordura vegetal hidrogenada contribuem, atualmente, com cerca de 80% a 90% da ingestão diária de *AG trans*. Nos alimentos provenientes de animais ruminantes, esta contribuição é bem menor, sendo estimada em torno de 2% a 8% (Larqué *et al*, 2001). Os óleos refinados apresentam níveis razoavelmente pequenos (1,0-1,5%) de *AG trans*, mas a reutilização, principalmente no preparo de alimentos fritos, pode tornar significativa a sua contribuição na ingestão de *AG trans* (Aro *et al*, 1998).

Estudos conduzidos no Brasil mostram que alimentos como margarinas (Soares & Franco, 1990), biscoitos (Martin *et al*, 2005), batata frita, massa, sorvete, bolos e outros alimentos que utilizam gordura vegetal hidrogenada para sua manufatura (Azevedo, 1999) apresentam altos níveis de *AG trans*. Basso e colaboradores (1999) e Azevedo (1999) mostraram ainda que o conteúdo de *AG trans* em gordura vegetal hidrogena manufaturada no nosso país apresenta altos níveis desses *AG*, variando de 30 a 50% de *AG trans*. Analisando esses dados, pode-se sugerir que o consumo de *AG trans* pela população brasileira é elevado (Martin *et al*, 2004).

Recentemente, em países da Europa e da América do Norte, vem sendo observada uma diminuição do percentual de *AG trans* na dieta, provavelmente por modificações no processamento industrial das gorduras ou por mudanças comportamentais dos consumidores na escolha de alimentos. Produtos alimentícios desses países estão sendo reformulados para que fiquem livres ou com baixo teor de gordura *trans* (Craig-Schmidt, 2006). No Brasil, como medida de redução na dieta, está sendo exigida a rotulagem dos níveis de *trans* em todos os

alimentos industrializados (Brasil, RDC n° 360). Entretanto, não existe ação efetiva na redução destes isômeros nos alimentos.

Os mecanismos pelos quais os AG *trans* exercem seus efeitos deletérios à saúde ainda não estão elucidados. Acredita-se que estes AG influenciam na alteração das propriedades físico-química das membranas, controle da expressão de genes e conseqüente modificação do metabolismo de lipídeos e carboidratos (Risérus, 2006). Trabalhos utilizando AG provenientes da dieta, como por exemplo, AG *trans*, podem regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo, principalmente de lipídeos e da glicose (Clarke, 2001; Pegorier *et al*, 2004).

Saravanan e colaboradores (2005) mostraram que a ingestão de AG *trans* em ratos altera negativamente a expressão gênica do PPAR- γ no TA (Saravanan *et al*, 2005). Além disso, trabalhos mostram que diferentes AG como saturados, PUFA, alguns eicosanóides análogos aos AG *trans* (15-deoxi- Δ -prostaglandina J2, leucotrieno B4), são ligantes potentes dos PPARs (Pegorier *et al*, 2004; Desvergne & Wahli, 1999).

Na segunda fase deste trabalho, analisamos a expressão de PPAR β/δ e PPAR γ 1-3 nos diferentes depósitos de TA (TAS, TAR e TAV) tanto em obesos mórbidos e não obesos. Avaliamos se estes receptores nucleares são modulados na obesidade mórbida, comparando com a expressão destes em indivíduos não obesos.

Os receptores nucleares (PPARs) controlam a expressão de vários genes que são cruciais no metabolismo de lipídeos e da glicose (Wahli *et al*, 1995; Kota *et al*, 2005). Na última década, pesquisas envolvendo estes receptores têm proposto novos mecanismos para a regulação do metabolismo de lipídeos e seu papel como possível determinante molecular de desordens metabólicas como DM2 e obesidade (Kota *et al*, 2005).

A obesidade e suas complicações, além de estarem associadas a distúrbios do metabolismo de lipídeos e da glicose, sofrem a influência do tipo e distribuição de tecido adiposo (Shen *et al*, 2003). Este tecido possui depósitos regionais específicos com distintas funções

fisiológicas (Ross *et al*, 1996) e por esse motivo, existe um intenso e crescente interesse em entender estes compartimentos regionais (Shen *et al*, 2003).

Poucas informações estão disponíveis a respeito da expressão de PPARs nos diferentes depósitos de tecido adiposo humano (Giusti *et al*, 2003). Revisando a literatura, foi possível constatar que não existem dados referentes à expressão PPAR β/δ nesses depósitos. Os resultados encontrados neste trabalho, demonstram uma variação no padrão de expressão do PPAR β/δ em TAS, TAR e TAV tanto em pacientes obesos quanto não obesos. Analisando o grupo de obesos, observamos uma diminuída expressão deste receptor nuclear no TAV (1.85 ± 0.80 ; $p=0.025$) comparado ao TAS (5.21 ± 1.58) e TAR (5.24 ± 1.80). Avaliando o grupo de não obesos, também, encontramos uma variação nos níveis de mRNA do PPAR β/δ , sendo o TAS, o que apresentou uma pronunciada expressão deste receptor (7.60 ± 2.97 ; $p=0.021$), sem haver diferença estatística na expressão no TAR (1.58 ± 0.66) e TAV (0.72 ± 0.18).

Levando em consideração que o PPAR β/δ é um fator de transcrição, que modula genes envolvidos na oxidação de AG e dissipação energética no TA, pode-se sugerir que os pacientes não obesos apresentam uma série de genes oxidativos aumentados no TAS, e, com isso, controlando o depósito de lipídeo neste tecido. Nos indivíduos obesos, a menor expressão de mRNA observada no TAV pode estar relacionada com o acúmulo de lipídeos neste tecido, resultando nas co-morbidades associadas à obesidade. Estas conclusões se baseiam nos estudos que utilizam agonista específico de PPAR β/δ em modelos experimentais, o GW501516. Estudos que utilizam este agonista revelam poderosas funções deste receptor sobre o metabolismo do TA e controle de peso (Evans *et al*, 2004; Barish *et al*, 2006; Luquet *et al*, 2005; Wang *et al*, 2003). Em modelo celular e animal, o GW501516 apresentou eficiência terapêutica na síndrome metabólica, pois aumentou o consumo de AG no músculo esquelético e no tecido adiposo (Luquet *et al*, 2005; Tanaka *et al*, 2003). Este agonista está, atualmente, sendo testado para uso em humanos no tratamento da dislipidemia e, futuramente, no da obesidade, da resistência à insulina e da inflamação vascular (Gross *et al*, 2005). No entanto, apesar de nossos resultados

revelarem uma diferença na expressão deste receptor nuclear nos diferentes TA, outras investigações serão necessárias para esclarecer sua ação no controle da lipólise.

Além da expressão de PPAR β/δ , nós analisamos o padrão de expressão do PPAR γ 1-3 nos diferentes depósitos de tecido adiposo em obesos mórbidos e não obesos. O PPAR γ é um fator de transcrição encontrado principalmente nos adipócitos e está ligado à adipogênese, à regulação da homeostase de lipídeos e da glicose (Rangwala & Lazar, 2004). A transcrição do PPAR γ pode ser induzida no tecido adiposo em resposta à hiperinsulinemia ou à dieta rica em gordura (Grimaldi, 2001). Nossos resultados demonstram que o padrão de expressão de PPAR γ 1-3, nos TAS, TAR e TAV de indivíduos obesos e não obesos, não variam estatisticamente, ou seja, a expressão deste receptor nuclear é similar entre os depósitos de tecido adiposo estudado nesses dois grupos de pacientes.

Ao contrário do PPAR β/δ , já existem dados na literatura referentes ao padrão de expressão do PPAR γ e suas isoformas no tecido adiposo. Estudos prévios, realizados por outros autores, revelam intensidade similar na quantificação da expressão de PPAR γ total nos TAS e TAV (Vohl *et al*, 2004). Lefevre e colaboradores (1998) e Montague e colaboradores (1998) não encontraram diferenças entre a expressão de PPAR γ total em TA omental (visceral) e subcutâneo em pacientes obesos (Lefevre *et al*, 1998; Montague *et al*, 1998).

Dados a respeito da expressão das isoformas de PPAR γ (γ 1 e γ 2) no TAS e TAV apresentam resultados conflitantes. Muitos autores concluem que o PPAR γ 1 é expresso em níveis mais altos do que o PPAR γ 2 no TAS e TAV (Auboeuf *et al*, 1997; Sewter *et al*, 2002, Yanase *et al*, 1997). Em contraste, Giusti e colaboradores (2003) encontraram que o PPAR γ 2 é mais abundante que o PPAR γ 1 na gordura subcutânea e visceral. Em adição, o nível de PPAR γ 1, nestes dois depósitos, está implicado na variabilidade da medida da cintura, e esta isoforma pode ainda estar associada aos níveis plasmáticos de insulina (Giustie *et al*, 2003). O PPAR γ 3, uma terceira isoforma identificada, é também expressa no tecido adiposo (Kota, 2005). Porém, dados sobre a distribuição desta isoforma nos diferentes depósitos de tecido adiposo e sua associação

com a obesidade, ainda, não estão disponíveis. Salientamos que, em nossa pesquisa, foi determinado o padrão de expressão do PPAR γ 1 e PPAR γ 3 (PPAR γ 1-3) que encodam a mesma proteína (Kota, 2005). Desta forma, podemos sugerir que os TAS, TAR e TAV apresentam a mesma capacidade adipogênica no que depender destas isoformas de PPAR γ (1-3) tanto nos tecidos dos pacientes obesos mórbidos quanto não obesos. Porém, outras abordagens experimentais precisam ser realizadas para constatar esta hipótese.

Para investigar se a obesidade modula a expressão de PPARs, nós analisamos a expressão PPAR γ 1-3 e PPAR β/δ em pacientes obesos mórbidos comparados a pacientes não obesos nos distintos depósitos de TA (TAS, TAR, e TAV). Pela primeira vez, foi analisada a expressão de PPAR γ 1-3 e PPAR β/δ no tecido adiposo retroperitoneal. A gordura retroperitoneal representa de 18 a 33% do volume de tecido intra-abdominal e parece envolver com o desenvolvimento da obesidade (Abate *et al*, 1995; Abate *et al*, 1994).

Nossos resultados mostraram que a expressão do PPAR β/δ não varia estatisticamente entre obesos e não obesos no TAR. No entanto, a expressão do PPAR γ 1-3 mostrou-se diminuída nos pacientes obesos mórbidos neste tecido. Dados de correlação revelaram que a expressão de PPAR γ 1-3 em TAR de obesos mórbidos correlaciona negativamente com a medida da cintura ($r=-1.000$, $p< 0.001$) e do quadril ($r=-0.900$, $p=0.037$). Esses dados indicam que a diminuída expressão de PPAR γ 1-3 no TAR está relacionada fortemente com a obesidade. Além disso, estudos de adiposidade encontraram que a gordura intra-abdominal é regulada pela obesidade. Indivíduos magros apresentaram 58% da massa de gordura visceral e 42% da massa de gordura retroperitoneal, enquanto que indivíduos obesos apresentaram 69% e 31% respectivamente. Essa variabilidade parece ser principalmente devido a fatores anatômicos, assim como à reduzida atividade metabólica do TAR (Abate *et al*, 1994). Levando em consideração que o PPAR γ regula a adipogênese, os dados citados acima corroboram com a diminuída expressão de PPAR γ 1-3 encontrada no grupo de obesos mórbidos.

Nossos resultados apresentaram ainda uma reduzida expressão de PPAR β/δ no TAS (p=0.058) de pacientes obesos mórbidos comparados a não obesos, e uma tendência à diminuição da expressão deste receptor nuclear no TAV (p= 0.094) do grupo de obesos. Diferentemente, a expressão de PPAR γ 1-3 mostrou-se aumentada no TAS (p=0.022) de pacientes obesos mórbidos e não houve diferença estatística na expressão deste receptor entre TAV de pacientes obesos mórbidos comparados a não obesos. Assim, no TAS dos obesos mórbidos, o aumento da expressão de PPAR γ 1-3 contra a diminuição de PPAR β/δ pode justificar o aumento de massa adiposa subcutânea nestes indivíduos. Por outro lado, a não diferença na expressão do PPAR γ 1-3 no TAV, entre obesos ou não obesos, sugere que ambos os grupos estão suscetíveis ao aumento deste tecido. Este fato é observado na clínica, pois o aumento de gordura visceral pode existir independente do grau de obesidade. Entretanto, no caso do obeso mórbido, a tendência em diminuir a expressão do receptor PPAR β/δ no TAV pode agravar esta patologia.

Dados da literatura a respeito da expressão de PPARs comparando obesos e não obesos não relatam diferença estatística na expressão destes (Auboeuf *et al*, 1997; Vidal *et al*, 1997; Krempler *et al*, 2000). Entretanto, esses estudos utilizaram (RT-PCR e Northern Blots) técnicas semiquantitativas para medir mRNA. No nosso trabalho utilizamos o PCR em tempo real, técnica quantitativa, bem mais sensível, para analisar a expressão dos receptores nucleares, o que pode justificar as diferenças encontradas com dados prévios da literatura.

Além disso, nossos cálculos de correlação reforçam que a modulação destes receptores nucleares está associada à obesidade. A expressão de PPAR γ 1-3 no TAV está relacionada fortemente com a medida da cintura (r=0.900, p=0.037). Também a expressão diminuída de PPAR β/δ no TAS correlacionou negativamente com a medida do quadril (r=-0.886, p=0.019), e possui uma forte tendência de correlacionar, também negativamente, com a medida da cintura (r=-0.771, p=0.072). Interessantemente, nossos dados revelam que a expressão de PPAR β/δ no TAV de obesos está relacionado negativamente com os níveis de insulina encontrado nestes

pacientes ($r=-0.900$, $p=0.037$). Observando-se os dados de correlação e a diminuída expressão de PPAR β/δ , pode-se sugerir, futuramente, o uso do agonistas, como por exemplo GW501516, no tratamento da obesidade e da resistência à insulina.

O aumento da expressão de PPAR γ 1-3 encontrada no TAS de obesos mórbidos está de acordo com o paradoxo das TZD (Fonseca, 2003). As TZD são ligantes de PPAR γ e o efeito benéfico deste fármaco parece estar ligado à ativação deste receptor nuclear e estímulo da adipogênese (Spiegelman, 1998). Em humanos, as TZD mostraram aumentar a massa de tecido adiposo subcutâneo e com efeito reduzido no visceral, resultando em ganho de peso (Albrektsen *et al*, 2002; Akazawa *et al*, 2000; Nakamura *et al*, 2001). Diversos estudos têm tentado elucidar o mecanismo do aparente paradoxo da TZD que, enquanto melhora a resistência à insulina, causa simultaneamente ganho de peso (Fonseca, 2003). Buch e colaboradores (2002) mostraram que, em obesos mórbidos, além do aumento de peso, ainda ocorre edema periférico (Buch *et al*, 2002).

Como já foi relatado, os AG podem modular a transcrição de genes. Desta forma, podemos inferir que a elevada concentração de AG *trans* no TAV dos indivíduos estudados, esteja modulado negativamente a expressão de PPAR β/δ . Além disso, este AG depositado no TA pode estar ativando a transcrição do PPAR γ 1-3, motivo pelo qual não observamos diferença significativa de expressão entre os tecidos estudados. Entretanto, mais estudos são necessários para validar esta observação.

Trabalhos indicam ainda, que na obesidade pode ocorrer um desbalanço de genes relacionados ao metabolismo (Baranova *et al*, 2005; Lee *et al*, 2005; Von Eyben *et al*, 2004). Um estudo em obesos mórbidos revelou que genes relacionados ao metabolismo de lipídeos e da glicose, transporte de membrana e genes promotores do ciclo celular estão 85,5% regulados positivamente e 14,5% regulados negativamente (Baranova *et al*, 2005). Através desses resultados, pode-se sugerir que a expressão diferencial dos PPARs, na obesidade, esteja obedecendo a este desbalanço encontrado por outros autores. E, não podemos deixar de citar que,

possivelmente, este desbalanço na expressão de genes associados com o metabolismo de lipídeos e da glicose, obedeça à regionalidade do tecido adiposo, se subcutâneo, retroperitoneal ou visceral.

4 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho apontam para as seguintes conclusões:

- Altos níveis de AG *trans* foram encontrados nos tecidos adiposos analisados tanto em obesos quanto não obesos;

- O TAV apresentou maior concentração de AG *trans* que os depósitos TAS e TAR nos dois grupos de pacientes estudados;

- Com os altos níveis de AG *trans* encontrados, pode-se sugerir um elevado consumo destes AG na população estudada;

- O perfil de expressão do PPAR β/δ , nos diferentes depósitos de tecido adiposo estudados, apresentou variações tanto em obesos quanto em não obesos;

- O perfil de expressão do PPAR γ 1-3, nos diferentes depósitos de tecido adiposo, não variou no grupo de obesos e no de não obesos;

- Comparando a expressão de PPAR β/δ nos diferentes depósitos de tecido adiposo, pode-se concluir que em obesos, o TAV apresentou o menor nível de expressão, enquanto que não houve diferença entre TAS e TAR. E, em não obesos, o TAS apresentou maior nível de expressão e não houve diferença entre TAR e TAV;

- Analisando a expressão do PPAR β/δ entre obesos e não obesos, pode-se observar uma diminuída expressão deste receptor em TAS e TAV de obesos. A expressão de PPAR γ 1-3, por outro lado, mostrou-se aumentada no TAS e diminuída no TAR de obesos.

- Os níveis de expressão do PPAR β/δ e PPAR γ 1-3 correlacionaram negativamente com dados antropométricos dos pacientes obesos, fortificando sua relação com a obesidade. O

receptor PPAR β/δ correlacionou ainda com os níveis de insulina destes pacientes, apontando para uma associação na modulação.

5 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para um alto depósito de *AG trans* no tecido adiposo, tanto de obesos quanto de não obesos. Também apontam para uma regulação diferente dos PPARs na obesidade. No entanto, muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas, as quais geram as seguintes perspectivas de trabalho:

1. Estudar a influência direta de *AG trans* sobre o controle do metabolismo dos adipócitos, através da expressão do mRNA dos PPARs e da tradução das respectivas proteínas destes;
2. Estudar se esta influência respeita a regionalidade do tecido adiposo;
3. Avaliar se a modulação dos PPARs, via *AG trans*, é influenciada pela obesidade.

REFERÊNCIAS

- Abate N, Burns D, Peshock RM, *et al.* Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. **J Lipid Res** 35: 1490-96, 1994.
- Abate N, Garg A, Peshock RM, *et al.* Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. **J Clin Invest** 96: 88-98, 1995.
- Abate N, Garg A, Coleman R, Grundy SM, Peshock RM. Prediction of total subcutaneous abdominal, intraperitoneal, and retroperitoneal adipose tissue masses in men by a single axial magnetic resonance imaging slice. **Am J Clin Nutr** 65: 403–408, 1997
- Adam M, Mossoba MM, Lee T. Rapid determination of total *trans* fat content by attenuated total reflection infrared spectroscopy: An international collaborative study. **J Am Oil Chem Soc** 77: 457-62, 2000.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med** 15: 539-53, 1998.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J, for the IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. **Lancet** 366: 1059–62, 2005.
- Albrektsen T, Frederiksen KS, Holmes WE, *et al.* Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. **Diabetes** 51: 1042–1051, 2002.
- Akazawa S, Sun F, Ito M, *et al.* Efficacy of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetes. **Diabetes Care** 23:1067–1071, 2000.
- Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann Med** 27: 435-438, 1995.

- Arner P. Regional differences in protein production by human adipose tissue. **Biochem Soc Trans** 29: 72-75, 2001.
- Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, *trans* fatty acids, and dairyfat: effects on serum and lipoprotein, lipids apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in health subjects. **Am J Clin Nutr** 65: 1419-26, 1997.
- Aro A, van Amelsvoort Becker W, van Erp-Baart MA, Kafatos A, Leth T, van Poppel, G. *Trans* fatty acids in dietary fats and oils from 14 European Countries: The *TRANSFAIR* study. **J Food Comp Anal** 11: 137-49, 1998.
- Astrup A, Ryan L, Grunwald GK. The role of dietary in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies **Br J Nutr** 83: S25-S32, 2000.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes** 46: 1319 –27, 1997.
- Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. *Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR.* **Atherosclerosis** 124: S29 –37, 1996.
- Azevedo CH. Teores de isômeros *trans* em gorduras vegetais hidrogenadas avaliadas por diferentes técnicas instrumentais [dissertation]. Unicamp; 1999.
- Bailey AE. Industrial oil and fat products. New York: Interscience Publisher Inc.; 1951.
- Baranova A, Collantes R, Gowder SJ *et al.* Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. **Obes Surg** 15: 758-765, 2005.
- Barish GD, Narkar VA and Evans RM. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. **J Clin Invest** 116: 590-597, 2006.
- Basso R, Almeida IG, Mancini JF. Avaliação qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos *trans* em gorduras vegetais hidrogenadas. **Bol SBCTA** 33: 57-63, 1999.

- Bastard JP, Hainque B, Dusserre E *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ , leptin and tumor necrosis factor- α mRNA expression during very low calorie diet in subcutaneous adipose tissue in obese women. **Diabetes Metab Res Rev** 15: 92-8, 1999.
- Bastie C, Luquet S, Holst D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. **J Biol Chem** 275: 38768–38773, 2000.
- Bender R, Zeeb H, Schwarz M, Jöckeld KH, Berger M. Causes of death in obesity: Relevant increase in cardiovascular but not in all-cancer mortality. **J of Clin Epidemiol** 59: 1064–1071, 2006.
- Berger J, Tanen M, Elbrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands inhibit adipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. **J Biol Chem** 276: 12629–35, 2001.
- Björntorp P. Abdominal obesity and the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev** 4: 615-622, 1989.
- Brasil, Resolução – RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA
- Bray, GA. Medical Consequences of obesity. **J Clin Endocrinol Metab** 89: 2583-2589, 2004.
- Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. **J Nutr** 132: 2488-91, 2002.
- Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity. **Am J Clin Nutr** 68: 1157-1173, 1998.
- Buch HN, Baskar V, Barton DM, *et al.* Combination of insulin and thiazolidinedione therapy in massively obese patients with type 2 diabetes. **Diabet Med** 19:572– 574, 2002.

- Chambrier C, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefort-Rousselot D, Therond P, Hainque B, Riou JP, Laville M, Vidal H. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of Peroxisome proliferators-activated receptor. **Obes Res** 10: 518-25, 2002.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, *et al.* PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nat Med** 7: 53–8, 2001.
- Christiansen E, Schnider S, Palmvig B, Tauber-Lassen E, Pedersen O. Intake of a diet high in *trans* monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. **Diab Care** 20: 881–7, 1997.
- Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene *transcription*: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **J Nutr** 131: 1129–1132, 2001.
- Clivingston EH. Complications of bariatric surgery. **Surg Clin North Am** 85: 853-68, 2005.
- Costa AGV, Bressan J, Sabarense CM. Ácidos graxos *trans*: Alimentos e efeitos na saúde. **ALAN** 56: 12-21, 2006.
- Craig-Schmidt MC. World-wide consumption of *trans* fatty acids. **Atherosclerosis Supplements** 7: 1-4, 2006.
- DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care** 14: 173-94, 1991.
- Deitel M. Some Consequences of the Global Obesity Epidemic (Editorial). **Obes Surg** 15: 1-2, 2005.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. **Endocr Rev** 20: 649–688, 1999.
- Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogenactivated protein kinase. **Hypertension** 36: 851–5, 2000.

- Dietary references intakes: Guiding principles for nutrition labeling and fortification. Institute of Medicine of the National Academies. The National Academic Press, DC: 2003.
- Dlouhý P, Tvrzická E, Stanková B, Vecka M, Zák A, Straka Z, Fanta J, Pachl J, Kubisová D, Rambousková J, Bílková D, Andrei M. Higher content of 18:1 *trans* fatty acids in subcutaneous fat of persons with coronarographically documented atherosclerosis of the coronary arteries. **Ann Nutr Metab** 47: 302-305, 2003.
- Duval K, Marceau P, Lescelleur O, Hould FS, Marceau S, Biron S, Lebel S, Pérusse L, Laçasse Y. Health-Related Quality of Life in Morbid Obesity. **Obes Surg** 16: 574-579, 2006.
- Einhorn D. ACE position statement on insulin resistance syndrome. **Endocr Pract** 9: 237-52, 2003.
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. **Endocrinology** 142: 4195–202, 2001.
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med** 10: 1-7, 2004.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA** 285: 2486 –97, 2001.
- Feldman EB, Krisetherton P, Kritchevsky D, Lichtenstein AH. Position paper on *trans* fatty acids. **Am J Clin Nutr** 63: 663-70, 1996.
- Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. **Science** 237: 405–408, 1987.
- Folsom AR, Kaye SA, Sellers TA, *et al.* Body fat distribution and 5-year risk of death in older women. **JAMA** 269: 483–7, 1993.

- Fonseca V. Effect of Thiazolidinediones on Body Weight in Patients with Diabetes Mellitus. **Am J Medic** 115: 42S-48S, 2003.
- Formiguera X, Canton A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 18: 1125-46, 2004.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR- γ . **Cell** 83: 803-12, 1995.
- Frayn KN, Williams CM, Arner P. Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? **Clin Sci** 90, 243-253, 1996.
- Fritsche J, Steinhart H, Mossoba MM *et al.* Rapid determination of *trans*-fatty acids in human adipose tissue. Comparison of attenuated total reflection infrared spectroscopy and gas chromatography. **J Chromatogra B** 705: 177-82, 1998.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science** 307: 426-430, 2005.
- Garg A. Regional adiposity and insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab** 89: 4206-4210, 2004.
- Garland M, Sacks FM, Colditz GA *et al.* The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. **Am J Clin Nutr** 67: 25-30, 1998.
- Giusti V, Verdumo C, Suter M *et al.* Expression of Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 and Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. **Diabetes** 52: 1673-1676, 2003.
- Goya K, Sumitani S, Xu X, Kitamura T, Yamamoto H, Kurebayashi S, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24: 658-63, 2004.

- Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneal JA *et al.* Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predicts insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 46: 1579-1585, 1997.
- Grimaldi, PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. **Prog Lipid Res** 40: 269-281, 2001.
- Gross BS, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ : A novel target for the reduction of atherosclerosis. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies** 2: 237-243, 2005.
- Grundy S. Metabolic complications of obesity. **Endocrine** 13: 155-165, 2000.
- Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation** 109: 433-438, 2004.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/ National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation** 112: 2735-52, 2005.
- Guri AJ, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptors: Bridging metabolic syndrome with molecular nutrition. **Clin Nutrition** 25: 871-885, 2006.
- Hallakou S, Doare L, Foufelle F. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. **Diabetes** 46: 1393-9, 1997.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. **Obes Rev** 2: 239-254, 2001.
- Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, Grimaldi PA. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferators-activated receptor δ in fatty acid catabolism in skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta** 1633: 43-50, 2003.

- Hudgins LC, Hirsch J, Emken EA. Correlation of isomeric fatty acids in human adipose tissue with clinical risk factors for cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr** 53: 474-82, 1991.
- Ibrahim A, Natarajan S, Ghaforunissa. Dietary *trans* fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. **Metab Clin Exper** 54: 240-46, 2005.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)
http://www.ibge.gov.br/english/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=278&id_pagina=1. Acesso 15 de dezembro 2006.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature** 347: 645–50, 1990.
- Jehl-Pietri C, Bastie C, Gillot I, Luquet S, Grimaldi PA. Peroxisome proliferators activated receptor delta mediates the effects of long chain fatty acids on post-confluent cell proliferation. **Biochem J** 350: 93–98, 2000.
- Jensen MD, Johnson CM. Contribution of leg and splanchnic free fatty acid (FFA) kinetics to postabsorptive FFA flux in men and women. **Metabolism** 45: 662–666, 1996.
- Jensen MD, Sarr MG, Dumesic DA, Southorn, PA & Levine JA. Regional uptake of meal fatty acid in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 285, E1282–E1288, 2003.
- Judd JT, Clevidence BA, Muesing RA, Wittes J, Sunkin ME, Podczasy JJ. Dietary *trans* fatty acids: effects of plasma lipids and lipoproteins on healthy men and women. **Am J Clin Nutr** 59: 861-8, 1994.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest** 106: 473–81, 2000.
- Katan MB, Van Staveren WA, Deurenberg P. Linoleic and *trans* unsaturated fatty acids content of adipose tissue biopsies as objective indicators of the dietary habits of individuals. **Prog Lipid Res** 25: 193-195, 1986.

- Kelley DE, Thaete L, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 278: E941-E948, 2000.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J Clin Endocrinol Metab** 89: 2548–2556, 2004.
- Kissebah AH, Peiris AN. Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev** 5: 83-109, 1989.
- Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. **Physiol Rev** 7: 761-811, 1994.
- Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. **J Clin Invest** 113: 1530-32, 2004.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. **Nature** 404: 635-643, 2000.
- Kota BP, Tom Hsun-Wei Huang THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research** 51: 85-94, 2005.
- Krempler F, Breban D, Oberkofler H *et al.* Leptin, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ , and CAAAT/Enhancer Binding Protein- α mRNA Expression in Adipose Tissue of Humans and Their Relation to Cardiovascular Risk Factors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20:443-449, 2000.
- Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. **JAMA**, 272: 205–211; 1994.
- Kummerow FA, Zhou Q, Mahfouz MM, Smiricky MR, Grieshop CM, Schaeffer DJ. *Trans* fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipids of arterial cells. **Life Sciences** 74: 2707-23, 2004.
- Larqué E, Zamora S, Gil A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. **Early Human Development** 65: S31- S41, 2001.

- Larsson B, Svaerdsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G. Abdominal adipose tissue distribution, obesity and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow-up of participants in the study of men born in 1913. **Br Med J** 288: 1401–1404, 1984.
- Lean M. Pathophysiology of obesity. **Proc Nutr Soc** 59: 331-336, 2000.
- Lee YH, Nair S, Rousseau E, *et al.* Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. **Diabetologia** 48: 1776–1783, 2005.
- Lefevre AM, Laville M, Vega N *et al.* Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. **Diabetes** 47: 98-103, 1998.
- Lefevre M, Lovejoy J, Smith S, Windhauser M, DeLane J, Champagne C, Rood J, Bray GA. Acute effects of dietary *trans* fatty acids on postprandial insulin, glucose and triglyceride levels. **FASEB J** 13: A54, 1999.
- Li Y, Bujo H, Takahashi K, Shibasaki M, Zhu Y, Yoshida Y, Otsuka Y, Hashimoto N, Saito Y. Visceral fat: higher responsiveness of fat mass and gene expression to calorie restriction than subcutaneous fat. **Exp Biol Med** 228: 1118-1123, 2003.
- Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, *et al.* Consumption of *trans* fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **J Nutr** 135: 562–6, 2005.
- London SJ, Sacks FM, Caesar J, Stampfer MJ, Siguel E, Willet WC. Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue and diet in post-menopausal US women. **Am J Clin Nutr** 54: 340-345, 1991.
- Luquet S, Gaudel C, Holst D *et al.* Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta** 1740: 313-317, 2005.
- Mahfouz MM, Smith T, Kummerow FA. Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat liver microsomes. **Lipids** 19: 214-22, 1984.
- Mahfouz MM, Kummerow FA. Hydrogenated fat high in *trans* monoenes with an adequate level of linoleic acid has no effect on prostaglandin synthesis in rats. **J Nutr** 129: 15-24, 1999.

- Mamalakis G, Kafatos A, Manios Y, Kalogeropoulos N, Andrikopoulos N. Abdominal vs buttock adipose fat: relationships with children's serum lipid levels. **Eur J Clin Nutr** 56: 1081-86, 2002.
- Manson JE, Skerrett PJ, Greenland P, VanItallie TB. The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians. **Arch Intern Med** 164: 249-258, 2004.
- Märin P, Andersson B, Ottosson M *et al.* The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. **Metabolism** 41:1242–1248, 1992.
- Martin AJP, Syngde RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. **Biochem J** 35: 1358-68, 1941.
- Martin LF, Hunter S, Lauve R, O'Leary JP. Severe obesity: expensive to society, frustrating to treat, but important to confront. **Southern Med J** 88: 895–902, 1995.
- Martin CA, Matshushita M, Souza NE. Ácidos graxos *trans* implicações nutricionais e fontes da dieta. **Rev Nutr** 17: 361-368, 2004.
- Martin CA, Carapelli R, Visantainer JV *et al.* *Trans* fatty acids content of Brazilian biscuits. **Food Chem** 93: 445-8, 2005.
- Matthan NR, Cianflone K, Lichtenstein AH *et al.* Hydrogenated fat consumption affects acylation-stimulating protein levels and cholesterol esterification in rates in moderately hypercholesterolemia women. **J Lipid Res** 42: 1841-1848. 2001.
- Mauriege P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. **Eur J Clin Invest** 17: 156-165, 1987.
- Meijer GW, Van Tol A, Van Berkel TJC, Weststate JA. Effect of dietary elaidic versus vacenic acid on blood and liver lipids in the hamster. **Atherosclerosis** 157: 31-40, 2001.
- Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. **Mol Genet and Metab** 83: 93-102, 2004.

- Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **N Engl J Med** 323: 439-45, 1990.
- Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. **Am J Clin Nutr** 77: 1146–1155, 2003.
- Molavi B, Rasouli N, Kern, PA. The prevention and treatment of metabolic syndrome and high-risk obesity. **Curr Opin Cardiol** 21: 479-485, 2006.
- Montague CT, Prins JB, Sanders L *et al.* Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes** 47: 1384-1391, 1998.
- Monteiro C. Epidemiologia da obesidade. Em: Halpern A, Godoy Matos AF, Suplicy HL, Mancini MC, Zanella MT. Obesidade, São Paulo: Lemos Editorial; 1998. p. 15-31
- Mossoba MM, Yurawecz MP, Delmonte P. Overview of infrared methodologies for *trans* fat determination. **J AOAC Int** 87: 540-4, 2004.
- Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ activators in a tissue and inducer-specific manner. **J Biol Chem** 273: 16710–4, 1998.
- Mozaffarian D, Rimm EB, King IB, *et al.* *Trans* fatty acids and systemic inflammation in heart failure. **Am J Clin Nutr** 80:1521–5, 2004.
- Nagy L, *et al.* Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR-gamma. **Cell** 93: 229-40, 1998.
- Nakamura T, Funahashi T, Yamashita S, *et al.* Thiazolidinedione derivative improves fat distribution and multiple risk factors in subjects with visceral fat accumulation: double blind placebo-controlled trial. **Diabetes Res Clin Pract** 54:181–190, 2001.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation,

- and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation** 106:3143–421, 2002.
- Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. **Biochem Pharmacol** 60:1245–50, 2000.
- Nielsen S, Guo Z, Johnson M, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. **J Clin Invest** 113: 1582-88, 2004.
- Nisoli E, Carruba MO, Tonello C, Macor C, Federspil G, Vettor R. Induction of fatty acid *translocase*/CD36, peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2, leptin, uncoupling proteins 2 and 3, and tumor necrosis factor- α gene expression in human subcutaneous fat by lipid infusion. **Diabetes** 49: 319-24, 2000.
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **J Clin Invest** 101: 1354–61, 1998.
- Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated breceptor δ agonist promotes reverse cholesterol *transport*. **PNAS** 98: 5306-11, 2001.
- Pavelka JC, Bem-Shachar I, Fowler JM *et al.* Morbid obesity and endometrial cancer: surgical, clinical, and pathological outcomes in surgically managed patients. **Gynecol Oncol** 95: 588-92, 2004.
- Pegorier JP, Le May C & Girard J. Control of gene expression by fatty acids. **Journal of Nutrition** 134: 2444S–24449S, 2004.
- Popkin BM, Gordon-Larsen P. The nutrition *transition*: worldwide obesity dynamics and their determinants. **Int J Obes Relat Metab Disord** 28: S2–S9, 2004.
- Proietto J, Bauer LA. Management of obesity. **Med J Aust** 180: 474-80, 2004.

- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose-fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet** 1: 785–789, 1963.
- Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, *et al.* Genetic modulation of PPAR- γ phosphorylation regulates insulin sensitivity. **Dev Cell** 5: 657–63, 2003.
- Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and metabolism. **TRENDS Pharmacol Sci** 25: 331-336, 2004.
- Ratnayake WMN, Chen ZY. Development and processing of vegetable oils for human nutrition. Champaign (IL): **AOCS** 1995. p. 20-35.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annu Rev Med** 44: 121-31, 1993.
- Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L, Bjorntorp P. Metabolism of adipose tissue in intra-abdominal depots of nonobese men and women. **Metabolism** 38: 453-48, 1989.
- Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. **J Leukoc Biol** 66: 733-9, 1999.
- Risérus U. *Trans* fatty acids and insulin resistance. **Atherosclerosis Supplements** 7: 37-39, 2006.
- Roger JB, Ghafoorunisa, Kover O, Rocquelin G, Sundram R, Uauy R. Dietary fat in developing countries. **Food Nutr Bull** 19: 1-27, 1998.
- Rosen AB, Schneider EC, Rosen AB. Colorectal cancer screening disparities related to obesity and gender. **J Gen Intern Med** 19: 332-38, 2004.
- Ross R, Fortier L, Hudson R. Separate associations between visceral and subcutaneous adipose tissue distribution, insulin and glucose levels in obese women. **Diabetes Care** 19: 1404–11, 1996.
- Salmeron J, Hu FB, Manson JE, *et al.* Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. **Am J Clin Nutr** 73: 1019–26, 2001.

- Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and *trans* fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. **Eur J Endocrinol** 153: 159-165, 2005.
- Schein M, Wittmann DH, Aprahamian CC *et al.* The abdominal compartment syndrome: the physiological and clinical consequences of elevated intra-abdominal pressure. **J Am Coll Surg** 180: 745-53, 1995.
- Semma M. *Trans* fatty acids: properties, benefits and risks. **J Health Science** 48: 7-13, 2002.
- Sewter CP, Blows F, Vidal-Puig A *et al.* Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPAR γ and RXR α agonist. **Diabetes** 51: 718-723, 2002.
- Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. **Am J Clin Nutr** 45:277–282, 1987.
- Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr** 70: 560S-9S, 1999.
- Shaw N, *et al.* Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . **J Biol Chem** 278, 41589– 41592, 2003.
- Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral G, Imielinska C, Ross R, Heymsfield SB. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. **Obes Res** 11: 5-16, 2003.
- Shibasaki M, Takahashi K, Itou T, Bujo H, Saito Y. A PPAR agonist improves TNF- α -induced insulin resistance of adipose tissue in mice. **Biochem Biophys Res Commun** 309: 419–24, 2003.
- Shimaya A, Noshiro O, Hirayama R, Yoneta T, Niigata K, Shikama H. Insulin sensitizer YM268 ameliorates insulin resistance by normalizing the decreased content of GLUT4 in adipose tissue of obese Zucker rats. **Eur J Endocrinol** 137: 693–700, 1997.
- Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, *et al.* Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. **Diabetes** 51: 1737–44, 2002.

- Spiegelman BM. PPAR γ adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes** 47: 507-14, 1998.
- Soares LMV, Franco M.R.B. Níveis de *trans* isômeros e composição de ácidos graxos de margarinas e produtos hidrogenados semelhantes. **Cien Tecnol Aliment** 10: 57-71, 1990.
- Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica (SBCB) <http://www.sbc.org.br/index.php>, acessado em dezembro de 2006.
- Steinbrook R. Surgery for severe obesity. **N Engl J Med** 350: 1075-79, 2004.
- Stender S, Dyerberg J, 4th ed. The influence of *trans* fatty acids on health. **The Danish Nutritional Council**, 2003.
- Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, *et al.* Diet composition and insulin action in animal models. **Br J Nutr** 83: S85-S90, 2000.
- Sugerman H, Windsor A, Bessos M, *et al.* Abdominal pressure, sagittal abdominal diameter and obesity comorbidity. **J Int Med** 241:71-9, 1997.
- Sundram K, Ismail A, Hayes KC, Jeyamalar R, Pathmanathan R. *Trans* (elaidic) fatty acids adversely affect the lipoprotein profile relative to specific saturated fatty acids in humans. **J Nutr** 127(3):514s-20s, 1997.
- Tai ES, Lau TN, Ho, SC *et al.* Body fatty distribution and cardiovascular risk in normal weight women. Association with insulin resistance, lipids and plasma leptin. **Int J Obes Relat Disord** 24: 751, 2000.
- Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acids β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 100: 15924-15929, 2003.
- Tchernof A, Belanger C, Morisset AS, Richard C, Mailloux J, Laberge P, Dupont P. Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women Minor Effect of Obesity and Body Fat Distribution. **Diabetes** 55:1353-1360, 2006.

- Thomas LH, Winter JA, Scott RG. Concentration of 18:1 and 16:1 *trans* unsaturated fatty acids in the adipose body tissue of decedents dying of ischaemic heart disease compared with controls: Analysis by gas liquid chromatography. **J Epidemiol Community Health** 37: 16-21, 1983.
- Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society** 60: 329-339, 2001.
- Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. **Diabetes** 44: 863, 1995.
- Vague J. La differenciation sexuelle: facteur determinant des formes: de l'obesite. **Presse Med** 55: 339-340, 1947.
- Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. **Am J Clin Nutr** 34: 416-422, 1956.
- Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. **Lancet** 354: 141-8, 1999.
- Van Staveren WA, Deurenberg P, Katan MB, Burema J, DeGroot LC, Hoffmans AF. Validity of the fatty acids composition of subcutaneous fat tissue microbiopsies as an estimate of the long term average fatty acid composition of the diet of separate individuals. **Am J Epidemiol** 123: 455-463, 1986.
- Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene Expression in Human Tissues: Effects of Obesity, Weight Loss, and Regulation by Insulin and Glucocorticoids. **J Clin Invest** 99: 2416-2422, 1997.
- Vidal-Puig AJ, Jimenez-Liñan M, Lowell BB *et al.* Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. **J Clin Invest** 97: 2553-61, 1996.
- Vohl MC, Sladek R, Robitaille J *et al.* A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. **Obes Res** 12: 1217-1222, 2004.

- Von Eyben FE, Kroustrup JP, Larsen JF *et al.* Comparison of gene expression in intra-abdominal and subcutaneous fat: a study of men with morbid obesity and nonobese men using microarray and proteomics. **Ann N Y Acad Sci** 1030:508-36, 2004
- Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: *transcriptional* regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. **Chem Biol** 2: 261–6, 1995.
- Wang YX, Lee CH, Tjep S *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell** 113: 159-170, 2003.
- Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB *et al.* Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. **JAMA** 292: 2471-77, 2004.
- WHO- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series number 894. Geneva: WHO, 2000.
- Wilson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. **Annu Rev Biochem** 70: 341-67, 2001.
- Xu HE, *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell** 3, 397–403, 1999
- Yanase T, Yashiro T, Takitani K *et al.* Differential expression of PPAR γ 1 and γ 2 isoforms in humans adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun** 233:320-324, 1997.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 372:425–432, 1994.

ANEXO 1 – LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação do ácido graxo oléico, elaídico e esteárico	18
Figura 2. Mecanismo de <i>transcrição</i> gênica de PPARs	22

CAPÍTULO 1

Figure 1. Individual distribution of total TFA in different tissues of obese and non-obese patients	32
--	----

ANEXO 2 – LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Content of <i>trans</i> fatty acids in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of obese and non-obese individuals.	33
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1. Anthropometric and biological parameters of morbidly obese patients.....	51
Table 2. Oligonucleotides used in qRT-PCR reactions, 5' to 3'	52
Table 3. Expression of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNA in various abdominal AT in obese and non-obese subjects	53
Table 4. PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 expression in morbidly obese compared to non-obese subjects in different depots of AT	54

ANEXO 3

Termo de Consentimento Informado

O projeto de pesquisa intitulado: “*Análise e quantificação dos ácidos graxos trans depositados no tecido adiposo*” será realizado através do Departamento de Bioquímica do ICBS da UFRGS, em parceria com o Instituto de Química, da PUC-RS, o Centro de Obesidade Mórbida, do Centro Clínico do Hospital São Lucas da PUC e Centros de Cirurgias Reconstructivas.

O tecido adiposo ou gorduroso, utilizado nesta pesquisa, habitualmente descartado, será obtido por procedimentos cirúrgicos executados nos Hospitais São Lucas da PUC-RS, Moinhos de Ventos, Divina Providência etc. Os pesquisadores responsáveis são: Dra. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna, Dr. André Arigony Souto, Dr. Cláudio Corá Mottin, Dra. Sirlei Costa, Cíntia Reis e Josiane Bortolotto.

Esta pesquisa tem por objetivo geral determinar quantitativamente os ácidos graxos *trans* (lipídeo) depositados no tecido adiposo, numa amostra da população porto alegreense. Também tem por objetivos específicos: 1- analisar a possível correlação da quantidade de ácidos graxos *trans* no tecido adiposo com o tipo de dieta; 2- analisar a possível correlação da quantidade de ácidos graxos *trans* com certas doenças. Este trabalho também tem objetivo acadêmico, pois se trata de tema da tese de mestrado e trabalhos de Iniciação Científica das alunas Josiane Bortolotto e Cíntia Reis.

O presente estudo utilizará tecido gorduroso retirado e descartado de cirurgias plásticas, de redução de mama, lipoaspiração e gastroplastia. Os pacientes são previamente informados pelo médico cirurgião a respeito dos procedimentos, sendo a cirurgia de livre escolha dos pacientes. O processo de análise laboratorial dos ácidos graxos *trans* não envolve nenhum risco de vida para os pacientes.

Os participantes do estudo aderirão ao mesmo voluntariamente, podendo a sua participação ser interrompida em qualquer etapa, sem nenhum prejuízo ou punição. A qualquer momento, os participantes poderão solicitar informações sobre os procedimentos ou outros assuntos relacionados a este estudo. Todos os cuidados serão tomados para garantir o sigilo e a confidencialidade das informações, preservando a identidade dos participantes. Haverá divulgação dos resultados, de forma coletiva através de comunicações científicas, para as instituições envolvidas na pesquisa e comunidade científica.

Desde já, agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais.

Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

Coordenadora do Projeto. Depto Bioquímica UFRGS

rguaragna@terra.com.br

Telefone: 3332-2129/9984-4286

Eu, -----fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. O presente estudo utilizará tecido adiposo que será descartado durante a cirurgia, executada por meu livre arbítrio. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa. Fui informado também que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Frente ao que foi acima exposto, expressei meu consentimento em relação à execução desta pesquisa, no que se refere à coleta e análise do tecido adiposo.

_____, _____ de _____ de 2005.

Assinatura do voluntário

Termo de Consentimento Informado

O projeto de pesquisa intitulado: “*Análise e quantificação dos ácidos graxos trans depositados no tecido adiposo e o efeito destes ácidos na indução da expressão do receptor ativador da proliferação de peroxissomos (PPAR)*” será realizado através do Departamento de Bioquímica do ICBS da UFRGS, em parceria com o Centro de Obesidade Mórbida, do Centro Clínico do Hospital São Lucas da PUC e Centros de Cirurgias Reconstrutivas.

O tecido adiposo ou gorduroso, utilizado nesta pesquisa, habitualmente descartado, será obtido por procedimentos cirúrgicos executados nos Hospitais São Lucas da PUC-RS, Moinhos de Ventos. Os pesquisadores responsáveis são: Dra. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna, Dr. André Arigony Souto, Dr. Cláudio Corá Mottin, Dra. Sirlei Costa, Ângela C.B. Ferreira e Josiane Bortolotto.

Esta pesquisa tem por objetivo geral determinar quantitativamente os ácidos graxos *trans* (lipídeo) depositados no tecido adiposo, numa amostra da população porto alegreense e verificar a ação reguladora dos AG *trans* sobre a expressão dos PPARs nas células adiposas de indivíduos obesos e não obesos. Também tem por objetivos específicos: 1- analisar a possível correlação da quantidade de ácidos graxos *trans* no tecido adiposo com o tipo de dieta; 2- analisar a possível correlação da quantidade de ácidos graxos *trans* com certas doenças. Este trabalho também tem objetivo acadêmico, pois se trata de tema da tese de mestrado e trabalhos de Iniciação Científica das alunas Josiane Bortolotto e Ângela Ferreira.

O presente estudo utilizará tecido gorduroso retirado e descartado de cirurgias plásticas, de redução de mama, lipoaspiração e gastroplastia. Os pacientes são previamente informados pelo médico cirurgião a respeito dos procedimentos, sendo a cirurgia de livre escolha dos pacientes. O processo de análise laboratorial dos ácidos graxos *trans* e dos PPARs não envolve nenhum risco de vida para os pacientes.

Os participantes do estudo aderirão ao mesmo voluntariamente, podendo a sua participação ser interrompida em qualquer etapa, sem nenhum prejuízo ou punição. A qualquer momento, os participantes poderão solicitar informações sobre os procedimentos ou outros assuntos relacionados a este estudo. Todos os cuidados serão tomados para garantir o sigilo e a confidencialidade das informações, preservando a identidade dos participantes. Haverá divulgação dos resultados, de forma coletiva através de comunicações científicas, para as instituições envolvidas na pesquisa e comunidade científica.

Desde já, agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais.

Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

Coordenadora do Projeto. Depto Bioquímica UFRGS

rguaragna@terra.com.br

Telefone: 3332-2129/9984-4286

Eu, -----fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. O presente estudo utilizará tecido adiposo que será descartado durante a cirurgia, executada por meu livre arbítrio. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa. Fui informado também que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Frente ao que foi acima exposto, expressei meu consentimento em relação à execução desta pesquisa, no que se refere à coleta e análise do tecido adiposo.

_____, _____ de _____ de 200__ .

Assinatura do voluntário