

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Comissão de Graduação em Nutrição

Thais Ortiz Hammes

**Análise e Quantificação da Expressão do mRNA de
Adiponectina e FOXO1 em Tecido Adiposo de Indivíduos
Obesos Grau III e de Não-Obesos.**

PORTO ALEGRE, 2008

Thais Ortiz Hammes

**Análise e quantificação da expressão do mRNA de
Adiponectina e FOXO1 em tecido adiposo de indivíduos
obesos grau III e de não-obesos.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Nutrição à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição.

Orientador: Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

Co-Orientador: Jussara de Almeida Carnevale

Porto Alegre, 2008

RESUMO

Introdução: O tecido adiposo é responsável pela secreção de inúmeras citocinas (como leptina, adiponectina e resistina) que podem atuar local ou sistemicamente na obesidade e na resistência a ação da insulina. Valores aumentados de adiponectina plasmática estão associados a uma melhora na sensibilidade a ação da insulina e no perfil lipídico sérico. A FOXO1 é um fator de transcrição responsável pela modulação de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. A expressão de FOXO1 parece estar associada à expressão de adiponectina devido a sua ação na formação de um complexo promotor da transcrição de adiponectina.

Objetivo: Avaliar a expressão relativa de mRNA de adiponectina e FOXO1 em tecidos adiposo visceral e subcutâneo de indivíduos obesos grau III (IMC ≥ 40 kg/m²) e não obesos (IMC < 30 kg/m²).

Materiais e métodos: Foram coletadas amostras de tecido adiposo (subcutâneo e visceral) de indivíduos obesos por cirurgia bariátrica e de não obesos por cirurgia eletiva. Foram obtidos de prontuário médico os dados bioquímicos (glicose e insulina plasmáticas e perfil lipídico sérico) e antropométricos (peso, altura, circunferência da cintura) dos indivíduos obesos. As amostras coletadas foram imediatamente imersas em TriZol[®] para a extração de RNA total e posterior síntese de cDNA (método de TriZol[®]). A quantificação da expressão de mRNA foi feita por qRT-PCR com *primers* para adiponectina, FOXO1 e beta-2-microglobulina como padrão interno.

Resultados: A expressão relativa de mRNA de adiponectina no tecido adiposo visceral em pacientes não obesos foi maior do que em pacientes obesos: 1,016 (0,53 – 2,24) vs 0,111 (0,002 – 0,46); $p=0,028$. Entretanto, a expressão relativa do mRNA de FOXO1 no mesmo tecido não foi diferente entre os dois grupos de pacientes. Em tecido adiposo subcutâneo, as expressões relativas de mRNA de adiponectina e de FOXO1 não foram diferentes entre os indivíduos não obesos e obesos. Ao comparar a expressão de mRNA entre os tecidos, a expressão de mRNA de FOXO1 foi maior no tecido adiposo subcutâneo do que no tecido visceral, tanto em obesos [1,74 (1,37 – 2,75) vs 0,81 (0,61 – 1,22), $p= 0,004$] quanto em não obesos [2,50 (1,52 – 3,33) vs 0,96 (0,64 – 1,89), $p= 0,012$]. A expressão de mRNA de adiponectina não foi diferente entre os tecidos. A expressão de mRNA de FOXO1 correlacionou-se inversamente com a idade [$r = -0,681$] e os triglicerídeos séricos [$r = -0,758$] em obesos ($p < 0,05$ para todas as correlações).

Conclusão: A expressão de mRNA de adiponectina e FOXO1 podem estar relacionadas a gênese da obesidade e resistência à ação da insulina.

Palavras-Chave: Obesidade; Adiponectina; resistência à insulina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 OBESIDADE.....	6
1.2 TECIDO ADIPOSEO.....	7
1.3 RESISTÊNCIA À INSULINA.....	8
1.4 ADIPONECTINA.....	9
1.5 FOXO.....	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVO	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
4 METODOLOGIA	15
4.1 AMOSTRAS.....	15
4.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	15
4.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	16
4.4 ANÁLISE MOLECULAR.....	17
4.4.1 SÍNTESE DE CDNA.....	17
4.4.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	18
4.5 MODELO MATEMÁTICO.....	20
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5 RESULTADOS	21
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	30

LISTA DE ABREVIACÖES

B2M - beta-2-microglobulina

C/EBP α - C/Enhancer-binding protein α

cDNA – complementary deoxyribonucleic acid

COM-PUCRS – Centro de Obesidade M6rbida da Pontifícia Universidade Cat6lica
Rio Grande do Sul

C_T - threshold cycle

dNTP - desoxirribonucleosídeos trifosfatados

FOXO - Forkhead/winged helix

HDL – High density lipoprotein

HOMA IR - Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance

IMC – índice de Massa Corporal

LDL – Low density lipoprotein

mRNA – Messenger ribonucleic acid

NF- κ B – nuclear factor-kappa B

OMS - Organizaç6o Mundial da Saúde

PUCRS – Pontifícia Universidade Cat6lica Rio Grande do Sul

qRT-PCR – quantitative real time polimerase chain reaction

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A prevalência da obesidade vem aumentando em proporções epidêmicas nas últimas décadas. Atualmente, cerca de 40% da população adulta brasileira tem excesso de peso sendo que 11,1% destes indivíduos já são considerados obesos¹. Nos Estados Unidos, 24,6% dos indivíduos adultos são obesos². A organização mundial da saúde (OMS) estima que para 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões destes serão obesos³. A ascensão da obesidade constitui um grave problema de saúde pública, estando associado com o aumento da morbi-mortalidade⁴. Além disto, indivíduos obesos possuem maior resistência à ação da insulina⁵ e apresentam, mais frequentemente, anormalidades lipídicas⁶

A obesidade é considerada uma desordem metabólica de etiologia multifatorial, que envolve em sua gênese fatores genéticos, ambientais, psicológicos e sociais⁷. Apesar da complexidade, sabe-se que o desequilíbrio entre ingestão e gasto energético é o mecanismo básico do seu desenvolvimento⁸. O excesso de energia proveniente desse desequilíbrio é estocado nos adipócitos que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia, aumentando assim o volume do tecido adiposo⁹.

1.2 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo, considerado por muito tempo apenas um reservatório energético, é entendido atualmente como órgão endócrino de múltiplas funções¹⁰,

sendo responsável pela produção e secreção de inúmeras citocinas – conhecidas como adipocinas¹¹. Estes peptídeos (resistina, fator de necrose tumoral alfa, leptina e adiponectina) podem atuar, direta ou indiretamente, em processos metabolicamente adversos como a resistência à ação da insulina, por exemplo^{11,12}. Além disso, as funções do adipócito são reguladas por diversos sinais como os da insulina, do cortisol e das catecolaminas¹³.

Anatomicamente o tecido adiposo abdominal pode ser dividido em subcutâneo (anterior e posterior) e intra-abdominal (visceral e retroperitoneal)¹⁴. Estes tecidos exibem diferenças metabólicas e no padrão de expressão de adipocinas¹⁵. O tecido adiposo visceral é metabolicamente mais ativo, possui maior sensibilidade à ação lipolítica, maior resistência à ação da insulina, além de secretar maiores quantidades de adipocinas quando comparado ao tecido subcutâneo¹⁴. Esta situação, favorece a liberação de ácidos graxos livres diretamente na veia porta, induzindo ao aumento na produção hepática de glicose e o acúmulo de lipídeos em outros tecidos que não o tecido adiposo¹⁶.

Já o tecido adiposo subcutâneo é menos sensível à ação de catecolaminas, porém mais sensível à ação da insulina¹⁰. Existe a hipótese de que o seqüestro de triglicerídeos para o tecido subcutâneo seja o componente que induz ao aumento da sensibilidade à ação da insulina exercida pelas tiazolidinedionas^{17,18}. De fato, em um estudo com cultura primária de pré-adipócitos expostos a tiazolidinedionas, somente os pré-adipócitos provenientes do tecido adiposo subcutâneo se diferenciaram em adipócitos maduros quando comparados com os pré-adipócitos do tecido adiposo visceral¹⁹.

1.3 RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA

A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase da glicose, crescimento e diferenciação celular. A secreção deste hormônio é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células β pancreáticas, principalmente a glicose. A glicose é transportada para o interior da célula β pancreática por uma proteína integral de membrana, denominada Glut 2²⁰. A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática que se autofosforila, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos desencadeia uma série de eventos incluindo a cascata de reações de fosforilação e defosforilação que regula os seus efeitos. Essas vias regulam a ação da insulina na redução da gliconeogênese, glicogenólise hepática, no aumento do anabolismo protéico e da captação de glicose periférica, além da redução da lipólise nos adipócitos, entre outros mecanismos^{16,21}.

Resistência à ação da insulina pode ser definida como uma falha na sua atividade fisiológica causada pela deficiência na transdução de sinal via seus receptores¹⁶. Clinicamente apresenta-se por uma resposta abaixo do normal da insulina, ou seja, ocorre quando altas concentrações deste hormônio estão associadas a concentrações de glicose plasmáticas normais ou alteradas. O termo “resistência à ação da insulina” começou a ser usado com a introdução da insulino terapia, em meados da década de 20, quando pacientes diabéticos requeriam altas doses de insulina para o controle da hiperglicemia²². Atualmente, a resistência à ação da insulina é reconhecida como um componente de diversas desordens incluindo síndrome dos ovários policísticos, síndrome metabólica, obesidade, diabetes melito tipo 2^{23,24}.

Os mecanismos fisiopatogênicos de associação da gordura visceral com a resistência à ação da insulina ainda não estão bem esclarecidos. Acredita-se que os ácidos graxos livres circulantes, provenientes da lipólise e das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, podem atuar no fígado aumentando a produção de glicose com conseqüente resposta compensatória da produção de insulina^{25,26} (**Tabela 1**). Além

disso, a maior secreção de algumas adipocinas, como a adiponectina, parece estar relacionada com o aumento da sensibilidade à ação da insulina²⁷.

Tabela 1. Efeito da resistência à ação da insulina nos diferentes órgãos.

LOCAL	AÇÃO
Músculo	Piora no transporte transmembrana de glicose.
Fígado	Aumento da gliconeogênese e piora na absorção de glicose.
Tecido Adiposo	Redução da absorção de glicose mediada por insulina.

Fonte: Adaptado de Fulop, T e colaboradores, 2006²².

Em um estudo de coorte com 1513 participantes do *Hoorn Study* (homens e mulheres caucasianos) com idade entre 50 e 75 anos, foi observado uma associação inversa entre o menor quartil de adiponectina plasmática com metabolismo prejudicado da glicose e diabetes melito²⁸.

1.4 ADIPONECTINA

A adiponectina, produto do gene *apM1*, é uma proteína composta por 244 aminoácidos também conhecida por GBP-28 (*gelatin binding protein-28*), adipoQ, adipsina e Acrp30. Esta adipocina é largamente secretada por adipócitos, embora possa ser também secretada por cardiomiócitos, hepatócitos e placenta em menores concentrações^{29,30}. Sua estrutura pode ser dividida em três domínios^{31,32} e está demonstrada na **Figura 1**:

- Domínio N-Terminal, com grande variação na seqüência de aminoácido entre as espécies;

- Domínio semelhante ao colágeno (assim chamado devido a homologia com o colágeno VII, X e ao fator complemento C1q);
- Domínio globular da região C-terminal.

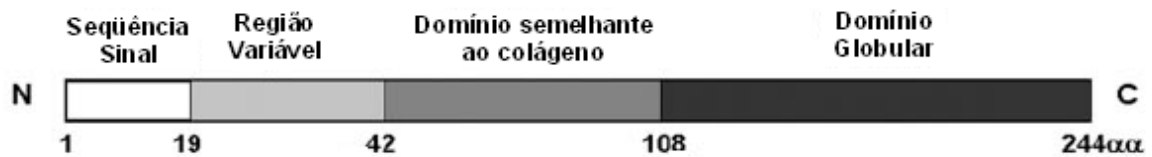


Figura 1. Estrutura da adiponectina humana.

Fonte: Adaptado de Richards AA e colaboradores (2006)³²

A adiponectina é abundante no plasma humano em concentrações que variam de 5 a 30 mg/dL, na forma de multímeros^{32,33}. A habilidade de multímerização da adiponectina é uma característica atribuída a um resíduo de cisteína na posição 39, localizado no domínio semelhante ao colágeno³⁴. Um estudo com filtração em gel e velocidade de gradiente revelaram que a adiponectina (com peso molecular de 30 KiloDaltons) circula no plasma com diferentes formas, sendo que algumas podem ter até 100 KiloDaltons³⁵. A redução na expressão de adiponectina está relacionada à hipertrofia de células adiposas³⁶.

O efeito da adiponectina na melhora da sensibilidade à ação da insulina talvez seja explicado pela supressão da gliconeogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo²⁹. Um estudo em cultura de hepatócitos murinos observou que o tratamento com adiponectina reduz a produção hepática de glicose sem alterar as concentrações de insulina³⁷. Ratos sem o gene para adiponectina apresentam baixos níveis circulantes de mRNA de proteínas transportadoras de ácidos graxos em seus músculos⁴². Um experimento em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica observou que a infusão de adiponectina reduziu a concentração plasmática de ácidos graxos livres, com perda de peso e redução da concentração de triglicerídeos hepático e muscular dos animais quando comparados àqueles que não receberam a infusão³⁸.

Além disto, em indivíduos obesos foram observados valores plasmáticos menores de adiponectina em relação a indivíduos não obesos³³. Neste estudo, os valores de adiponectina foram inversamente correlacionados com o IMC, principalmente em homens.

1.5 FOXO 1

Forkhead/winged helix (FOXO)³⁹ é uma superfamília de fatores de transcrição responsáveis pela modulação de genes envolvidos em inúmeras funções celulares (diferenciação, proliferação e sobrevivência celular)⁴⁰. Existem várias isoformas: FOXO1, FOXO3a, FOXO4 e FOXO6³⁹. As proteínas FOXO, que contém 110 aminoácidos, são compostas por três alfa-hélices arranjadas em forma eclíptica em torno de uma hélice central, rodeada de alças; esta estrutura é referida como “hélice alada” ou “cabeça em forquilha”. Por esse motivo, as proteínas desta família são tidas como fatores de transcrição “pioneiros” pois facilitam a ligação de outros fatores transcricionais⁴¹.

A FOXO1 está amplamente expressa em tecidos insulino-responsivos, como fígado, tecido adiposo e pâncreas⁴². Em ausência de insulina, a FOXO1 encontra-se no núcleo celular onde participa da transcrição de genes que regulam a gliconeogênese. Já na presença de insulina e em resposta da ligação desta ao seu receptor, a proteína quinase Akt (fosfatidilinositol-quinase dependente) fosforila a FOXO1 e inativa sua atividade transcricional, deixando-a retida no citoplasma⁴³. A inativação da FOXO1, no pâncreas, induz a expressão do fator promotor de insulina 1 que tem um papel importante na secreção de insulina e na proliferação de células β pancreáticas⁴².

Os efeitos da FOXO1 na obesidade e na resistência à ação da insulina ainda não estão esclarecidos. Existe a hipótese que o aumento da expressão de FOXO1 contribua para a resistência à ação da insulina através da inibição da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos⁴³. Em um experimento de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-

L1 por dez dias, a expressão da FOXO1 mostrou ser estágio dependente, ou seja, está inibida durante a expansão clonal e ativada no início da fase de diferenciação terminal dos pré-adipócitos em adipócitos maduros⁴⁴. Foi visto em pré-adipócitos 3T3-L1 que constante ativação de FOXO1 impediu o início da expansão clonal e, conseqüentemente, a diferenciação dos adipócitos⁴⁴.

Outros mecanismos envolvendo a FOXO1 podem estar relacionados com a sensibilização à ação da insulina, como a redução na produção hepática de glicose e o aumento da expressão de genes sensíveis a ação da insulina no tecido adiposo⁴⁴. Em ratos haploinssuficientes para FOXO1, após indução de resistência à ação da insulina através de dieta hiperlipídica, a inativação de FOXO1 mostrou exercer efeito protetor na resistência à ação da insulina e na hipertrofia dos adipócitos⁴⁴.

A expressão de FOXO1 parece estar diretamente associada à expressão de adiponectina em virtude de sua ação na formação de um complexo com C/EBP α (C/Enhancer-binding protein α) para promover a ativação da transcrição de adiponectina³⁶. Em ratos, a haploinssuficiência de FOXO1 levou a uma significativa redução na expressão de adiponectina quando comparado ao controle sem haploinssuficiência⁴⁴. Além disso, em outro estudo experimental, a expressão de mRNA de adiponectina em pré-adipócitos induzidos à diferenciação foi menor no grupo de adipócitos com FOXO1 inativada quando comparados com os adipócitos normais e adipócitos com FOXO1 ativada³⁶. Este experimento sugere que a inativação da FOXO1 diminui a expressão de adiponectina em adipócitos maduros.

2 JUSTIFICATIVA

O tecido adiposo tem sido freqüentemente associado ao desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade, como a resistência à ação da insulina ou à dislipidemia¹². No entanto, pouco se sabe a respeito da regulação deste tecido em nível molecular. Sabe-se que o padrão de expressão de diversos genes apresenta diferenças entre o tecido adiposo visceral e o subcutâneo¹⁵. O tecido adiposo visceral, por exemplo, está fortemente relacionado ao desenvolvimento de resistência à ação da insulina, além de secretar maiores quantidades de adipocinas¹⁴.

Foi visto que valores de adiponectina plasmática estão inversamente correlacionados com IMC³³ e diretamente relacionados com sensibilidade a ação de insulina⁴⁶ em humanos. Por outro lado, o aumento da expressão de FOXO1 parece contribuir para a resistência à ação da insulina através da inibição da diferenciação terminal de adipócitos⁴³

Estudos experimentais demonstraram que a expressão da FOXO1 aumenta a expressão de mRNA de adiponectina³⁶. Entretanto, não há na literatura atual, descrição do padrão de expressão de mRNA de FOXO1 no tecido adiposo de humanos.

A hipótese do presente trabalho é que a expressão relativa de mRNA de adiponectina e da FOXO1 estejam reduzidas em obesos quando comparados com indivíduos não obesos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar e quantificar a expressão relativa de mRNA de adiponectina e FOXO1 em tecido adiposo visceral e subcutâneo de obesos grau III e de não-obesos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a expressão relativa do mRNA de adiponectina e FOXO1 no tecido adiposo visceral e subcutâneo.
- Comparar a expressão relativa do mRNA de adiponectina e FOXO1 entre obesos grau III e não obesos.
- Comparar a expressão relativa do mRNA de adiponectina e FOXO1 entre os tecidos visceral e subcutâneo em obesos grau III e não obesos.
- Correlacionar os padrões bioquímicos e antropométricos dos indivíduos obesos grau III com a expressão relativa do mRNA de adiponectina e FOXO1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram coletadas amostras de tecido adiposo visceral e subcutâneo de 13 indivíduos obesos grau III, com IMC (Índice de massa corporal: obtido pela divisão do peso corporal, em Kilogramas, pelo quadrado da altura em metros) maior que 40 Kg/m² submetidos à cirurgia bariátrica no Centro de Obesidade Mórbida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (COM-PUCRS)⁷. Juntamente com as amostras de tecido, foram obtidos os dados bioquímicos e antropométricos dos prontuários destes pacientes.

Amostras iguais de tecido adiposo visceral e subcutâneo foram obtidas de 10 indivíduos não obesos (IMC <30 Kg/m²) submetidos a cirurgia eletiva. Este último grupo não teve os dados antropométricos e bioquímicos coletados.

Os indivíduos submetidos à pesquisa não faziam uso de agentes antiobesidade, hipolipemiantes ou antidiabéticos (agentes orais e insulina). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Todos os integrantes da pesquisa assinaram um consentimento livre e informado antes da participação do estudo.

4.2 Avaliação Antropométrica

Para avaliação antropométrica foram utilizados dados de peso, altura e circunferência da cintura. A medida do peso corporal foi obtida com o paciente em jejum, vestindo avental hospitalar, com posterior desconto do peso do avental em balança eletrônica da marca Filizola[®]. A altura foi medida com o paciente descalço, ereto, com os braços estendidos ao longo do corpo, cabeça erguida, olhando para um

ponto fixo na altura dos olhos, com os calcanhares, ombros e nádegas em contato com o estadiômetro vertical marca Sanny[®]. A circunferência da cintura foi feita em torno da cicatriz umbilical com uso de fita de fibra flexível. Valores de cintura acima de 90 cm para homens e 80 cm para mulheres foram considerados alterados conforme critério proposto pelo International Diabetes Federation⁴⁷.

4.3 Avaliação Bioquímica

Para avaliação laboratorial foram utilizados dados de glicose plasmática (em jejum) e perfil lipídico sérico realizados pelo método de química seca. A insulina plasmática em jejum foi obtida pelo método de quimioluminescência. Todos os exames foram realizados no laboratório de análises clínicas do Hospital São Lucas da PUCRS. Os valores de referência utilizados estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de referência dos exames clínicos laboratoriais.

Medida Laboratorial	Valores de referência
Glicose plasmática	<100 mg/dL
Insulina plasmática	3 a 25 μ U/mL
Colesterol total sérico	< 200 mg/dL
Colesterol LDL sérico	< 100 mg/dL
Colesterol HDL sérico	Homens: > 40 mg/dL Mulheres: > 50 mg/dL
Triglicerídeos séricos	<150 mg/dL.

Valores de glicose acima de 100 mg/dL foram considerados alterados conforme critério proposto pelo IDF⁴⁷.

Para estimativa da resistência à ação da insulina foi utilizada a fórmula matemática HOMA IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*) = [(glicemia de jejum em mg/dL x 0,05551) x insulina de jejum em $\mu\text{U/mL}$] / 22,5. Foram considerados resistentes à ação da insulina os indivíduos com HOMA IR >3,8 mmol/L x $\mu\text{U/mL}$ ^{48,49}.

4.4 Análise Molecular

4.4.1 Síntese de cDNA

Durante o processo cirúrgico, os tecidos eram coletados e imediatamente imersos em 500 μl uma solução monofásica contendo fenol e tiocinato de guanidina (Trizol[®], Invitrogen, Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Em laboratório, esse tecido era macerado com pistilo de vidro dentro do próprio microtubo até que o seu conteúdo ficasse turvo. Em seguida eram adicionados 100 μl de clorofórmio (1:5 de clorofórmio para Trizol[®]) nas amostras que eram homogeneizadas por 30 segundos em vórtex até que se obtivesse uma solução rosácea de aspecto leitoso. Após a homogeneização as amostras eram centrifugadas a 18,290 x g por 15 minutos a 6°C (Microcentrifuga Eppendorf modelo 5417R) para que ocorresse a separação das fases. Após a centrifugação eram visíveis 3 fases: a primeira, aquosa, que continha o RNA; a interfase branca e leitosa com DNA majoritariamente e a fase inferior rósea que continha predominantemente proteínas. A fase superior (fase aquosa) era então cuidadosamente aspirada (cerca de 200 μl) e transferida para um novo microtubo.

No novo microtubo, as amostras eram adicionadas 250 μ l de isopropanol (1:2 de isopropanol para Trizol[®]) que eram então homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e incubadas por 10 minutos. Após a incubação as amostras eram centrifugadas por 18,290 x g por 10 minutos a 6°C. Feita a centrifugação, conteúdo líquido foi vertido e descartado de uma só vez. Os microtubos eram então colocados sobre papel toalha para secagem por 10 minutos. Após a secagem foi acrescentado 500 μ l de álcool a 75%, o conteúdo foi homogeneizado (60 segundos em vórtex) e então centrifugado a 21,340 x g por 5 minutos a 6°C. Nesta fase, ocorrerá a formação de um *precipitado* visível no fundo do microtubo. Após a centrifugação o conteúdo líquido foi vertido e o microtubo posto para secar sobre o papel toalha por 2 ou 3 horas. Feito isso o pellet de RNA total era ressuspensão em 25 μ l de água (água ultrapura estéril).

Para a extração de RNA mensageiro (mRNA) foram pipetadas em um microtubo limpo: 1 μ l de primer poli T ou T23V (5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV 3' a uma concentração de 1 μ g/ μ l), 5 μ l de água ultrapura estéril e 10 μ l de RNA total. Os microtubos foram então colocados no termociclador (Termociclador Thermo Hybaid PCR Sprint) a 70°C por 5 minutos.

Para a reação de síntese de cDNA foram pipetados em cada microtubo contendo mRNA: 1 μ l de enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen[®]), 5 μ l de tampão 5 vezes para enzima MMLV e 2,5 μ l de deoxinucleotídeos (dNTP). Essa mistura foi levada ao termociclador onde sofria aquecimento até 42°C por 50 minutos para o alongamento do cDNA. Posteriormente foi feita a desnaturação da enzima a 70°C por 15 minutos. O cDNA resultante foi então diluído em 225 μ l de água ultrapura estéril a uma concentração de 1:10 para a estocagem a -20°C.

4.4.2 Quantificação da expressão gênica.

Para a análise da expressão relativa dos genes da adiponectina e FOXO1 foi utilizado o método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). A quantificação do produto da reação em cadeia da polimerase em cada ciclo se deu pela detecção de fluorescência existente em cada amostra de produto. Esta fluorescência é emitida, pois há a incorporação do corante fluoróforo *SYBR Green* nas duplas fitas de DNA sintetizadas na etapa de extensão da cadeia de DNA.

Foram utilizados *primers* para adiponectina, FOXO1 e beta-2-microglobulina (B2M), para padrão interno. A seqüência dos *primers* estão listados na **Tabela 3**. A reação foi composta por uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C e 35 segundos a 60°C; as amostras foram retidas por mais 15 segundos a 95°C para anelar e então foram aquecidas por 1 minuto a 60°C (com taxa de aumento de 0,1°C/s). Foi utilizado termociclador *Applied-Biosystem 7500 real-time cyclers*[®].

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR em tempo real, de 5' para 3'

GENE	SEQUÊNCIA
Adiponectina	Senso 5'-TGGTGAGAAGGGTGAGAA-3' Antisenso 5'-AGATCTTGGTAAAGCGAATG-3'
FOXO1	Senso 5'-TGGACATGCTCAGCAGACATC-3' Antisenso 5'-TTGGGTCAGGCGGTTCA-3'
B2M	Senso 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' Antisenso 5' TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT3'

A reação foi feita com um volume final de 20 μl , os quais foram compostos de: 10 μl de transcriptase reversa (diluição de 40:100); 2 μl de tampão 10 vezes para PCR, 1,2 μl de MgCl_2 50 mM, 0,1 μl de dNTPs 5 mM, 0,4 μl de *primer* a 10 μM , 4,25 μl de água de água ultrapura estéril, 2,0 μl de SYBR green (1:10,000 Molecular Probe[®]), e 0,05 μl de Platinum Taq DNA polymerase 5 U/ μl (Invitrogen[®]).

4.5 Modelo Matemático

A quantificação da expressão gênica foi feita utilizando método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (threshold cycle). Para cada amostra, analisada em quaduplicata, o valor de ΔC_T foi obtido subtraindo o valor de C_T da B2M do valor de C_T do gene de interesse⁵⁰. A expressão relativa de mRNA entre indivíduos obesos e não obesos foi calculada utilizando a expressão de não obesos para a calibração. Para comparar a expressão relativa entre os tecidos utilizou-se como calibrador a expressão do gene de interesse em tecido adiposo visceral de não obesos.

4.6 Análise estatística

Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (percentis de 25 e 75) ou número de casos para o total de indivíduos. Para a comparação da expressão relativa de mRNA de adiponectina e de FOXO1 no tecido adiposo visceral e no subcutâneo em obesos e não obesos foi utilizado teste U de Mann-Whitney.

Para a avaliação da correlação entre características dos pacientes [perfil lipídico (colesterol total e triglicerídeos séricos), HOMA-IR e IMC] com a expressão relativa de

mRNA de adiponectina e de FOXO1 foi utilizado coeficiente de correlação de Spearman.

O nível de significância considerado foi de 5%.

Para as análises estatísticas foi utilizado o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 13.0.

5 RESULTADOS

A **tabela 4** apresenta o perfil bioquímico e antropométrico dos indivíduos obesos. Todos os pacientes obesos apresentaram circunferência da cintura aumentada (como já esperado) e 38,5% dos pacientes apresentaram glicemia de jejum alterada conforme os critérios do IDF⁵⁶. Dos 13 indivíduos estudados, 10 tiveram índice HOMA maior que 3,8 mmol/L x μ U/mL⁴⁸.

Tabela 4. Características antropométricas e bioquímicas do grupo de obesos (n=13).

Características	Valores
Sexo (masculino)	7 (53,85 %)
Idade (anos) ¹	33 (28 – 38)
IMC (kg/m ²) ¹	49,6 (43,8 – 55,3)
Cintura (cm) ¹	130,7 (120,1 – 141,3)
Glicose plasmática (mg/dL) ¹	128 (72 – 184)
% de glicemia alterada ³	38,46%
Insulina plasmática (μ U/mL) ¹	26,4 (18,6 – 34,2)
HOMA IR (mmol/L x μ U/mL) ⁴	8,2 (4,7 – 11,7)
% de HOMA alterado	76,9%
Colesterol Total sérico (mg/dL) ¹	203 (167 – 239)
Colesterol HDL sérico (mg/dL) ¹	47,9 (38,4 – 57,3)
Homens	39,3 (18,2 – 60,3)
Mulheres	52,6 (33,9 – 71,5)
Colesterol LDL sérico (mg/dL) ¹	116,6 (97,8 – 135,3)
Triglicerídeos séricos (mg/dL) ⁵	171 (101,5 – 226,5)

¹ Dados apresentados em média (Intervalo de confiança de 95%)

² Cintura alterada = circunferência \geq 80 cm em mulheres e \geq 90 cm em homens⁴⁸.

³ Glicemia alterada = \geq 100mg/dL⁴⁸.

⁴ HOMA IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*) = [(glicemia de jejum em mg/dL x 0,05551) x insulina de jejum em μ U/mL] / 22,5.

⁵ Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil - 25 e 75)

A **Figura 2** apresenta a expressão relativa do mRNA de adiponectina e FOXO1 em tecido adiposo visceral de pacientes obesos e não obesos. A expressão relativa de mRNA de adiponectina em pacientes não obesos foi maior que em pacientes obesos: 1,016 (0,53 – 2,24) vs 0,111 (0,002 – 0,46); $p=0,028$. Entretanto, a expressão relativa do mRNA de FOXO1 não foi diferente entre os dois grupos de pacientes: 0,96 (0,64 – 1,89) vs 0,84 (0,62 – 1,44); $p=0,227$.

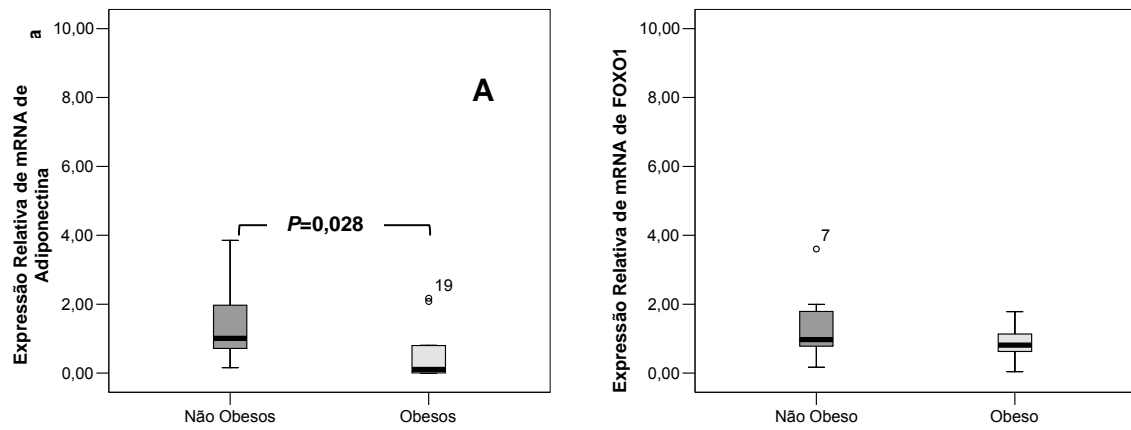


Figura 2: Expressão relativa de mRNA de Adiponectina (A) e FOXO1 (B) em tecido adiposo visceral de indivíduos não-obesos (barras escuras) e obesos (barras claras). Traço largo indica mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e a linha vertical indica o valor mínimo e máximo.

Em tecido adiposo subcutâneo de indivíduos não obesos e obesos, as expressões relativas de mRNA de adiponectina [1,09 (0,24 – 5,59) vs 1,81 (0,09 – 1,81), $p=0,824$] e de FOXO1 [1,01 (0,61 – 1,46) vs 0,73 (0,54 – 0,73), $p=0,381$] não foram diferentes entre os grupos (Figura 3).

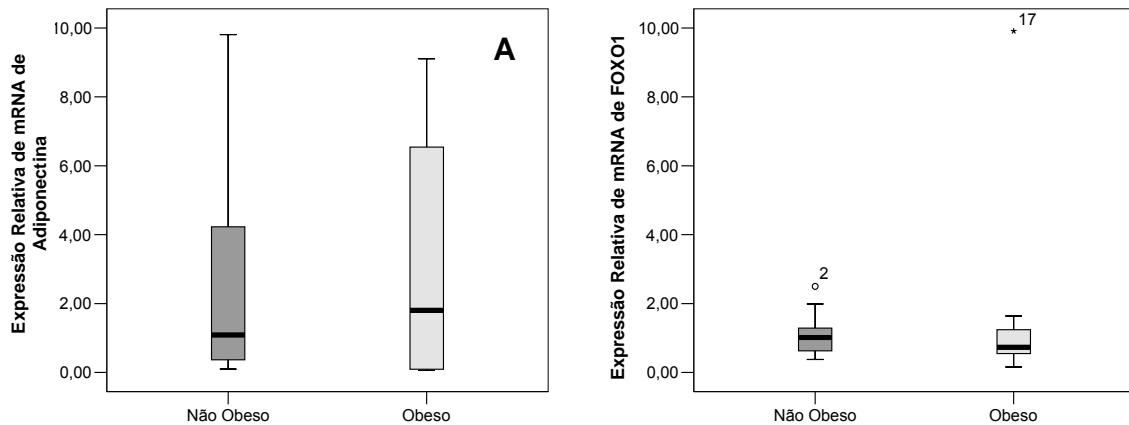


Figura 3: Expressão relativa do mRNA de Adiponectina (A) e FOXO1 (B) em tecido adiposo subcutâneo de indivíduos não-obesos (barras escuras) e obesos (barras claras). Traço largo indica mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e a linha vertical indica o valor mínimo e máximo.

Foram realizadas análises de correlação entre as características clínicas e antropométricas dos indivíduos obesos com a expressão relativa de adiponectina e de FOXO1 (**Figura 4**), tanto no tecido adiposo subcutâneo quanto no visceral. Não foram observadas correlações entre: a expressão relativa do mRNA de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo e visceral com os parâmetros estudados nos indivíduos obesos. A expressão relativa de FOXO1 no tecido adiposo subcutâneo apresentou correlação negativa com idade ($r = -0,681$; $p = 0,021$) e com os valores séricos de triglicérides ($r = -0,758$; $p = 0,011$). Também não foram observadas correlações entre a expressão relativa de mRNA de FOXO1 no tecido adiposo visceral e demais parâmetros avaliados nos indivíduos obesos (dados não apresentados).

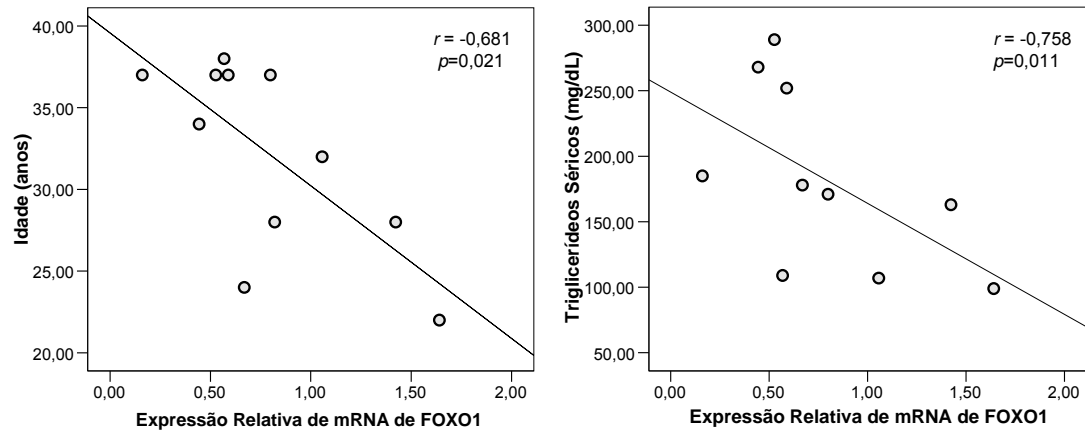


Figura 4: Correlações (Spearman) entre a expressão relativa de mRNA de FOXO1 no tecido adiposo subcutâneo e a idade (em anos) e os valores de triglicérides séricos (mg/dL) em indivíduos obesos grau III.

Foi analisada a expressão relativa de adiponectina e FOXO1 entre os tecidos adiposos visceral e subcutâneo. Para comparar a expressão relativa entre os tecidos utilizou-se como calibrador a expressão do gene de interesse em tecido adiposo visceral de não obesos.

Em indivíduos não obesos e obesos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão relativa de adiponectina entre os tecidos subcutâneo e visceral (**Figura 5**): indivíduos não obesos = 0,49 (0,10 – 2,52) vs 1,01 (0,53 – 2,54), $p=0,402$; indivíduos obesos = 0,81 (0,03 – 3,54) vs 0,11 (0,004 – 0,80), $p=0,065$, respectivamente. No entanto, observa-se em obesos uma tendência à diminuição de mRNA de adiponectina em tecido adiposo visceral.

Tanto em indivíduos não obesos quanto em obesos, a expressão relativa de FOXO1 foi maior no tecido adiposo subcutâneo do que no tecido adiposo visceral (**Figura 6**): indivíduos não obesos = 2,50 (1,52 – 3,33) vs 0,96 (0,64 – 1,89), $p= 0,012$; indivíduos obesos = 1,74 (1,37 – 2,75) vs 0,81 (0,61 – 1,22), $p= 0,004$, respectivamente.

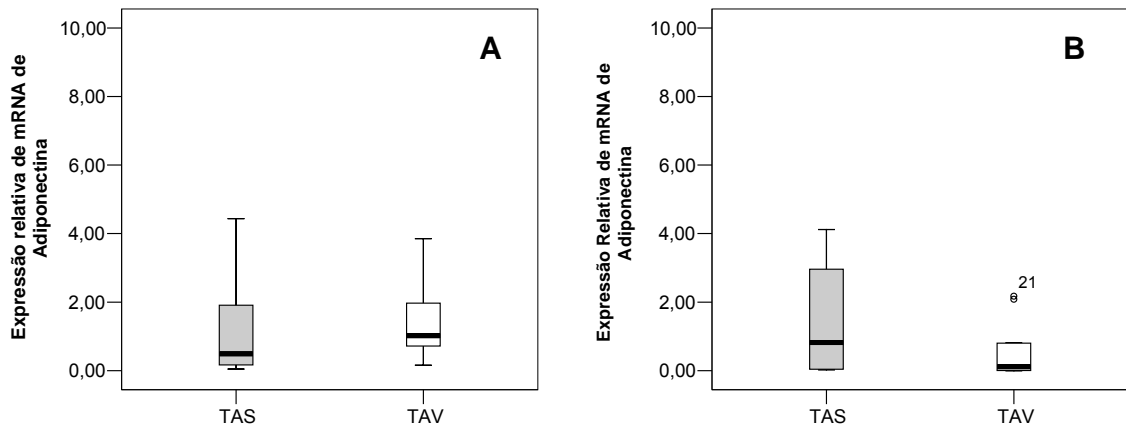


Figura 5: Expressão relativa de mRNA de adiponectina em tecido adiposo subcutâneo (TAS – Barra cinza) e visceral (TAV – Barra branca) de pacientes não-obesos (A) e obesos (B). Traço largo indica mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e a linha vertical indica o valor mínimo e máximo. $p > 0,05$ (Teste U de Mann-Whitney).

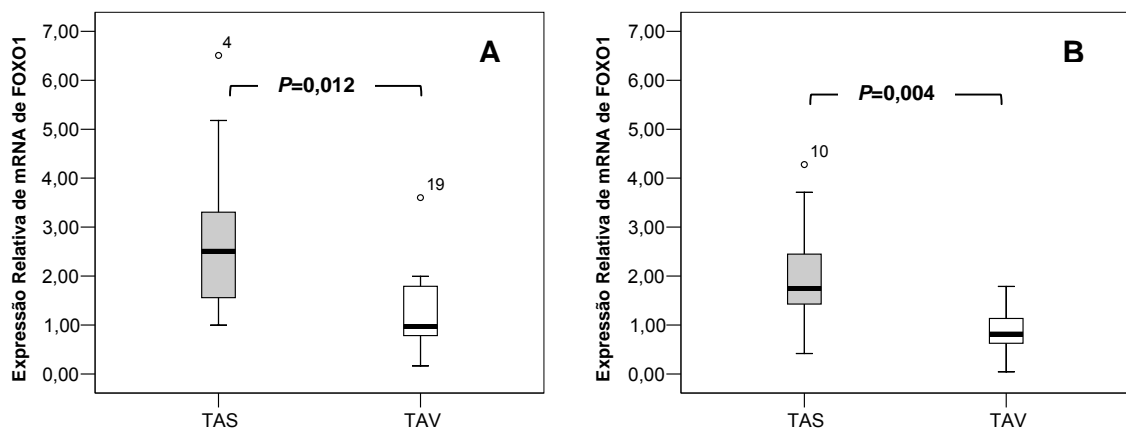


Figura 6: Expressão relativa de mRNA de FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo (TAS – Barra cinza) e visceral (TAV – Barra branca) de pacientes não-obesos (A) e obesos (B). Traço largo indica mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e a linha vertical indica o valor mínimo e máximo. Teste U de Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se a expressão relativa de mRNA de adiponectina e FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo e visceral de pacientes não obesos e de obesos grau III, comparando as expressões entre os indivíduos e também entre os tecidos. No tecido adiposo visceral encontramos que a expressão de mRNA de adiponectina está diminuída em indivíduos obesos grau III. Observamos que a expressão do mRNA de FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo é maior que em tecido adiposo visceral tanto em obesos quanto em não obesos. Em tecido adiposo subcutâneo, a expressão de mRNA de FOXO1 correlacionou-se inversamente com a idade e triglicerídeos séricos dos indivíduos obesos.

A quantificação relativa por qRT-PCR foi o método utilizado para a quantificação da expressão gênica neste estudo, sendo indicado por descrever o padrão de expressão de mRNA de um determinado gene em relação a expressão em um outro grupo, chamado calibrador⁵⁰. No entanto, a expressão de adiponectina em tecido adiposo de humanos por qRT-PCR ainda é pouco estudada. Por outro lado, não existem estudos sobre a expressão relativa de mRNA de FOXO1 em tecido adiposo de humanos.

A expressão relativa de mRNA de adiponectina em tecido adiposo visceral foi nove vezes maior em indivíduos não obesos que em obesos. Nenhum estudo de nosso conhecimento quantificou e comparou a expressão relativa do mRNA de adiponectina entre obesos e não obesos. Conforme a literatura, altas concentrações plasmáticas de adiponectina são encontradas em indivíduos não obesos³³, da mesma forma que a expressão relativa de mRNA de receptores de adiponectina em tecido adiposo é maior em indivíduos não obesos quando comparados com os obesos⁵¹.

Comparando a expressão de mRNA de adiponectina entre tecido adiposo subcutâneo e visceral, em indivíduos obesos, observamos uma tendência a uma diminuição desta expressão no tecido visceral. Um estudo observou que a expressão

de mRNA de adiponectina no tecido adiposo visceral foi menor em indivíduos com diabetes tipo II que em indivíduos obesos não diabéticos⁵². Além disso, a redução da expressão de adiponectina está relacionada com a hipertrofia de adipócitos⁴⁵ – evento associado à piora da sensibilidade à ação da insulina⁹. Este fenômeno associa o tecido adiposo visceral mais intensamente à resistência a insulina do que o tecido subcutâneo propriamente dito. Dessa forma, o baixo padrão de expressão de adiponectina em obesos grau III pode estar associado ao desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina nestes indivíduos.

A expressão relativa de mRNA de FOXO1 não apresentou diferenças significativas entre obesos e não obesos em ambos os tecidos estudados. No entanto, a expressão relativa de mRNA de FOXO1 foi maior em tecido adiposo subcutâneo comparado ao tecido adiposo visceral tanto em obesos quanto em não obesos. Não existem na literatura dados sobre o padrão de expressão de mRNA de FOXO1 em humanos. Contudo, um estudo que avaliou a expressão de mRNA de FOXO1 em modelo porcino adulto, encontrou que a expressão de mRNA de FOXO1 é maior no tecido adiposo subcutâneo que no visceral⁵³. Em pré-adipócitos, a expressão da FOXO1 parece ser estágio dependente, ou seja, está inibida durante a expansão clonal de pré-adipócitos e ativada no início da fase de diferenciação terminal em adipócitos maduros⁴⁴. Além disso, a inativação da FOXO1 reduz a hipertrofia de adipócitos em ratos haploinsuficientes⁴⁴. Em tecido adiposo subcutâneo, a hiperplasia (aumento do número de células) de adipócitos promove a sensibilização à ação da insulina¹⁷ ao passo que a hipertrofia de adipócitos relaciona-se com a piora da sensibilidade a ação da insulina⁹. Dessa forma, o aumento na expressão de mRNA de FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo comparado ao visceral poderia induzir à piora da sensibilidade à ação da insulina tanto em obesos quanto em não obesos por bloquear a diferenciação de adipócitos.

A expressão relativa de mRNA de FOXO1 em tecido subcutâneo apresentou correlação inversa com a idade. Um estudo que comparou a expressão de mRNA de FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo de porcos com um dia e com 180 dias de vida observou que a expressão de FOXO1 era maior no grupo mais jovem⁵³. As proteínas

FOXO interagem com diversos fatores de transcrição (como NF- κ B e p53) responsáveis pela resistência ao estresse oxidativo, a sobrevivência celular e a longevidade⁵⁴. Além disso, a Sirtuína (proteína associada ao aumento da longevidade) promove ativação das proteínas FOXO em diversos organismos⁵⁵.

A expressão relativa de mRNA de FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo apresentou ainda correlação inversa com os triglicerídeos séricos. Como dito anteriormente, a ativação de FOXO1 está associada à inibição da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos⁴³. Por outro lado, o aumento da expressão de FOXO1 pode facilitar a transcrição gênica de adiponectina³⁶. Baixos valores de adiponectina foram encontrados em indivíduos com infarto agudo do miocárdio não fatal e estes valores foram associados a altos valores de triglicerídeos plasmáticos⁵⁶.

Dentre as limitações do presente estudo, a ausência de dados clínicos dos indivíduos não obesos e a ausência de um grupo de indivíduos eutróficos devem ser considerados. O conhecimento das características clínicas do grupo controle permitiria um melhor esclarecimento dos resultados. Afinal, indivíduos com sobrepeso podem apresentar resistência à ação da insulina. Outro aspecto a ser considerado é que a determinação de expressão dos mRNA estudados foi no tecido adiposo total, ou seja, contendo células mesenquimais, pré-adipócitos e adipócitos maduros.

Considerando o papel da Sirtuína na ativação da FOXO1 e de C/EBP α ³⁶ na expressão de adiponectina pretendente-se, como perspectiva deste trabalho avaliar a expressão de mRNA de Sirtuína e C/EBP α nas mesmas amostras de tecido adiposo visceral e subcutâneo de indivíduos obesos grau III e não obesos. Essa análise permitirá o entendimento dos aspectos relacionados à expressão de adipocinas e o desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade, como resistência à ação da insulina.

7 CONCLUSÃO

O padrão de expressão do mRNA da adiponectina em tecido adiposo visceral de obesos e não obesos sugere uma possível associação desta proteína à obesidade e à resistência à ação da insulina.

Os valores de FOXO1 entre indivíduos obesos e não obesos revelam que a obesidade não altera a expressão de mRNA de FOXO1. Os achados na expressão de FOXO1 em tecido adiposo subcutâneo comparado ao visceral evidenciam a importância deste tecido na patogênese da resistência à ação da insulina.

Os resultados sugerem que a expressão de mRNA adiponectina e FOXO1 podem estar relacionadas à gênese da obesidade e resistência à ação da insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro; 2004.
2. STURM R. Increases in morbid obesity in the USA: 2000–2005. **Public Health**. v 121, p. 492–496. 2007.
3. World Health Organization. Obesity and overweight. [Matéria publicada em Setembro de 2006]. Acesso em: 7 de novembro de 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
4. Joint World Health Organization or of the Food and Agriculture Organization (WHO/FAO) Expert Consultation. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **WHO Technical Report Series**. Geneva, Switzerland: WHO, 2003. Acesso em: 10 de novembro de 2008. Disponível em: https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/gsfao_introduction.pdf
5. O’RAHILLY S. Human obesity and insulin resistance: lessons from experiments of Nature. **Biochemical Society Transactions**. v35, p. 33-36. 2007
6. FRANSSEN R, MONAJEMI H, STROES ES, et al. Obesity and Dyslipidemia. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**. v 37, n.3, p. 623-633. 2008.
7. SOWEMIMO AO, YOOD SM, MOORE JJ, et al. Natural history of morbid obesity without surgical intervention. **Surgery for Obesity and Related Diseases**. v 3 , n. 1, p.73-77. 2007.
8. LEAN MEJ. Pathophysiology of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v 59, p. 331–336. 2000
9. BAYS HE;GONZLEZ-CAMPOY JM; BRAY GA, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**. v 6, n.3, p. 343-68. 2008.
10. HERMSDORFF HHM, MONTEIRO JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v 48, n.6, p.803-811. 2004.

11. FILHO FFR, MARIOSIA L S, FERREIRA SRG, ZANELLA MT. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v 50, n. 2, p. 230-238. 2006.
12. BAILEY CJ. Treating insulin resistance: future prospects. **Diabetes and Vascular Disease Research**. v 4, n. 1, p. 20-31. 2007.
13. ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**. v 444, n.7121, p. 847-853. 2006
14. TCHERNOF A, BÉLANGER C, MORISSET A S, RICHARD C, MAILLOUX J, LABERGE P, DUPONT P. Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women. **Diabetes**. v 55, n. 5, p.1353-1360, 2006.
15. KLEIN S. The case of visceral fat: argument for the defense. **Journal of Clinical Investigation**. v 113, n. 11, p.1530-32, 2004.
16. FULOP T, TESSIER D, CARPENTIER A. The metabolic syndrome. **Pathologie Biologie**. v 54, n. 7, p. 375–386. 2006.
17. SMITH SA. Central role of the adipocyte in the insulin-sensitising and cardiovascular risk modifying actions of the thiazolidinediones. **Biochimie**. v 85, p.1219–1230. 2003.
18. MOTOSHIMA H, WU X, SINHA MK, et al. Differential Regulation of Adiponectin Secretion from Cultured Human Omental and Subcutaneous Adipocytes: Effects of Insulin and Rosiglitazone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v 87, n.12, p.5662–5667. 2002.
19. HARMELEN VV, DICKER A, RYDE´N M, et al. Increased Lipolysis and Decreased Leptin Production by Human Omental as Compared With Subcutaneous Preadipocytes. **Diabetes**. v 51, n.7, p.2029-36. 2002.
20. HARBER E, CURI R, CARVALHO CRO, CARPINELLI AR. Secreção da Insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v 45, n. 3, p.19-23. 2001.
21. CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD MJA. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v 46, n. 4, p.419-425. 2002.
22. MANTZOROS C. Insulin resistance: Definition and clinical spectrum. Acesso em: 27 de agosto de 2008. Disponível em:

http://www.uptodate.com/patients/content/topic.do?topicKey=~jtuu5_aKVKp6QEm&selectedTitle=5~150&source=search_result.

23. CUMMINGS S, APOVIAN CM, KHAODHIAR L. Obesity Surgery: Evidence for Diabetes Prevention/Management. **Journal of the American Dietetic Association**. v 108, n. 4, Suplemento 1, p. 40-44. 2008
24. KAHN BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. v 106, n. 4, p. 473-481. 2000.
25. MACHADO UF, SCHAAN BD, SERAPHIM PM. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v 50, n. 2, p.177-189. 2006.
26. CHEN BH, SONG Y, DING EL, et al. Circulating Levels of Resistin and Risk of Type 2 Diabetes in Men and Women: Results from Two Prospective Cohorts. **Diabetes Care**. DOI: 10.2337/dc08-1625.
27. FASSHAUER M, PASCHKE R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. **Diabetologia**. v 46, n.12, p.1594–1603. 2003.
28. SNIJDER MB, HEINE RJ, SEIDELL JC, et al. Associations of Adiponectin Levels With Incident Impaired Glucose Metabolism and Type 2 Diabetes in Older Men and Women. **Diabetes Care**. v 29, p.2498–2503. 2006.
29. DIEZ JJ, IGLESIAS P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **European Journal of Endocrinology**. v 148, p.293–300. 2003.
30. PETERLIN BL, ALEXANDER G, TABBY D, REICHENBERGER E. Oligomerization state-dependent elevations of adiponectin in chronic daily headache. **Neurology**. v 70, p.1905-1911. 2008.
31. MAEDA K, OKUBO K, SHIMOMURA I, et al. cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (Adipose Most Abundant Gene Transcript 1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v 221, p.286–289. 1996.
32. RICHARDS AA, STEPHENS T, CHARLTON HK, et al. Adiponectin Multimerization Is Dependent on Conserved Lysines in the Collagenous Domain: Evidence for Regulation of Multimerization by Alterations in Posttranslational Modifications. **Molecular Endocrinology**. v 20, n.7, p.1673–1687. 2006.

33. ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N, et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v 257, p.79–83, 1999.
34. KUSMINSKI CM, MCTERNAN PG, SCHRAW T, et al. Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: distinct complex distribution from serum. **Diabetologia**. v 50, p.634–642. 2007.
35. WAKI H, YAMAUCHI T, KAMON J, et al. Impaired Multimerization of Human Adiponectin Mutants Associated with Diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. **The Journal of Biological Chemistry**. v 278, n. 41, p.40352–40363. 2003.
36. QIAO L, SHAO J. SIRT1 Regulates Adiponectin Gene Expression through Foxo1-C/Enhancer-binding Protein α Transcriptional Complex. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 52, p. 39915–39924. 2006.
37. BERG AH, COMBS TP, DU X, et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nature Medicine**. v 7, n 8, p.947-53. 2001.
38. MAEDA N, SHIMOMURA I, KISHIDA K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nature Medicine**. v 8, n. 7, p. 731–737. 2002.
39. HUANG H, TINDALL DJ. Dynamic FoxO transcription factors. **Journal of Cell Science**. v. 120, n.15, p. 2479-87. 2007.
40. GRINIUS L, KESSLER C, SCHROEDER J, HANDWERGER S. Forkhead transcription factor FOXO1A is critical for induction of human decidualization. **Journal of Endocrinology**. v. 189, n.1, p.179–187. 2006.
41. FRIEDMAN JR, KAESTNER KH. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 63, n.19-20, p. 2317–2328. 2006.
42. KITAMURA T, NAKAE J, KITAMURA Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. **The Journal of Clinical Investigation**.v 110, p.1839–1847. 2002.
43. KARIM MA, CRAIG RL, WANG X, et al. Analysis of *FOXO1A* as a candidate gene for type 2 diabetes. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 88, n.2, p. 171–177. 2006.

44. NAKAE J, KITAMURA T, KITAMURA Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. **Developmental Cell**, v. 4, n.1, p.119–129, 2003.
45. CARIOU B, POSTIC C, BOUDOU P, et al. Cellular and molecular mechanisms of adipose tissue plasticity in muscle insulin receptor knockout mice. **Endocrinology**. v 145, n 4, p.1926-1932. 2004.
46. SPRANGER J, KROKE A, MÖHLIG M, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **The Lancet**. v 361, n 9353, p.226-8. 2003.
47. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. Acesso em: 7 de novembro de 2008. Disponível em: <http://www.idf.org/home/index.cfm?node=1429v>
48. VIEIRA CS, GOMES MKO, RODRIGUES PC, et al. Avaliação da função das células β pancreáticas através do modelo matemático de HOMA em portadoras de síndrome dos ovários policísticos: comparação entre obesas e não-obesas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 29, n. 3, p.141-146. 2007.
49. VASQUES AC J, ROSADO LEFPL, ALFENAS RCG, et al. Análise Crítica do Uso dos Índices do *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) na Avaliação da Resistência à Insulina e Capacidade Funcional das Células- β Pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v 52, n. 1, p.32-39. 2008.
50. LIVAK KJ. SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**. v 25, p. 402-408. 2001.
51. BLÜHER M, WILLIAMS CJ, KLÖTING N, et al. Gene Expression of Adiponectin Receptors in Human Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Is Related to Insulin Resistance and Metabolic Parameters and is Altered in Response to Physical Training. **Diabetes Care**. v 30, n 12, p.3110–3115. 2007.
52. STATNICK MA, BEAVERS LS, CONNER LJ, et al. Decreased Expression of apM1 in Omental and Subcutaneous Adipose Tissue of Humans with Type 2 Diabetes. **International Journal of Experimental Diabetes Research**. v 1, n 2, p.81-88.2000.
53. PANG WJ, YU TY, BAI L, et al. Tissue expression of porcine FOXO1 and its negative regulation during primary preadipocyte differentiation. **Molecular Biology Reports**. vol 36, n 1, p. 165-176. 2008

54. SALMINEN A, OJALA J, HUUSKONEN J, et al. Interaction of aging-associated signaling cascades: Inhibition NF- κ B signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. **Cellular and Molecular Life Science**. v 65, p. 1049 – 1058. 2008.
55. BERDICHEVSKY A. GUARENTE L. A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14–3-3 proteins. **Cell Cycle**, v 5, n 22, p.2588–2591. 2006.
56. PISCHON T, GIRMAN CJ, HOTAMISLIGIL GS, et al. Plasma Adiponectin Levels and Risk of Myocardial Infarction in Men. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. v 291, n 14, p.1730-1737.2004.