

ANDRÉ GUSTAVO VASCONCELOS COSTA

**REGULAÇÃO DA ADIPOGÊNESE E DA SECREÇÃO DE QUEMERINA POR
ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA E PELO ÁCIDO GRAXO
EICOSAPENTAENÓICO EM CÉLULAS 3T3-L1**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

ANDRÉ GUSTAVO VASCONCELOS COSTA

REGULAÇÃO DA ADIPOGÊNESE E DA SECREÇÃO DE QUEMERINA POR
ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA E PELO ÁCIDO GRAXO
EICOSAPENTAENÓICO EM CÉLULAS 3T3-L1

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de junho de 2010.

Prof^ª. Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Coorientadora)

Prof. Fabyano Fonseca e Silva
(Coorientador)

Prof^ª. María Jesús Moreno-Aliaga

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof^ª. Josefina Bressan
(Orientadora)

*Ao meu pai José Flávio e à minha mãe Marlene, exemplos de honestidade,
humildade, força e perseverança.*

A vocês o meu eterno agradecimento, amor e admiração!

Essa tese é também uma conquista de vocês!

DEDICO

À Polly querida, por ser tão generosa e por me ajudar com o famoso “PPNRα”.

Muito obrigado pelas inúmeras ajudas, por inspirar-me, por mostrar-me como se pode descomplicar o complicado.

*Ao Ique e ao Nando, por estarem sempre presentes e por torcerem por mim.
Muito obrigado pela força!*

A vocês o meu agradecimento especial.

AGRADECIMENTOS

A tese doutoral que se apresenta é fruto de um período que, em analogia, pode ser comparado aos eventos iniciais, intermediários e finais do processo de diferenciação celular. Inicialmente, a célula necessita sair de seu ciclo celular e inibir os genes repressores da diferenciação, assemelhando-se ao período que precede ao início do treinamento doutoral. Na etapa intermediária ocorre o estímulo à expressão de genes iniciadores do processo de diferenciação, os quais se assemelham ao período de cumprimento dos créditos e definição do tema de pesquisa. Nos eventos finais, ocorrem fortes estímulos à expressão de genes responsáveis pelas características fenotípicas e moleculares da célula, período que se representa pela coleta de dados, análises, tratamentos estatísticos e redação da tese e de manuscritos.

A adipogênese ocorre a partir de uma sucessão de eventos e, por isso, todos os processos são igualmente importantes. Certamente não haveria diferenciação se a célula fosse única, uma vez que o estímulo por contato é essencial para que a diferenciação ocorra de forma extremamente dinâmica e igualmente harmônica. Entretanto, mesmo havendo o contato, as células necessitam de fortes estímulos para que todo o processo se desenvolva em sua potencialidade.

Ao final, erros certamente foram cometidos e etapas certamente não foram totalmente cumpridas, mas a diferenciação ocorreu, promovendo importantes modificações.

Por esses motivos agradeço:

Ao Criador, agradeço diariamente! É impossível não reconhecer a onisciência de Deus na arquitetura do desenvolvimento celular. É impossível não reconhecer sua onipresença nos milhões de células que se observa pela lente do microscópio.

À minha família, que sempre se faz presente. Um obrigado especialmente à Dé, Fernando, Lívia, tia Lilice, Ane, Melissa, Fernada, Maria Laura, Lucas, Bruno, Ana Beatriz, José Ângelo, Rosão.

À D. Verônica, muito obrigado por todas as ajudas e pelos inúmeros translados de roupas e de mantimentos.

Às agências financiadoras de meus estudos:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (201834/2008-1) para o período sanduíche na Espanha.

Aos financiadores do projeto deste estudo:

Ministerio de Educación y Ciencia (AGL 2006-04716/ALI) da Espanha e *Línea Especial de pesquisa Nutrición, Obesidad y Salud (LE/97)* da *Universidad de Navarra*, Espanha.

À Universidade Federal de Viçosa, instituição responsável pela minha formação, por sua excelência em ensino e pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por proporcionar a realização de meu curso.

À Professora Dra. Josefina Bressan, pela orientação, dedicação e incentivo. Muito obrigado por me impulsionar e por ser sempre positiva!

À Professora Dra. María Jesús Moreno-Aliaga, por receber-me de forma tão amistosa e pelas inúmeras orientações nesse estudo.

Ao Professor Dr. Alfredo Martínez, por abrir-me as portas da *Universidad de Navarra* e pelo *empadronamiento*.

À Professora Dra. Sônia Machado Rocha Ribeiro, pela co-orientação e incentivo. Muito obrigado por tornar simples o que muitas vezes se faz difícil.

Ao Professor Dr. Fabyano Fonseca e Silva, pela co-orientação e pelas análises estatísticas.

Ao Professor Dr. Paulo César Stringheta, pela co-orientação, pelo apoio e pelas contribuições iniciais.

Ao Professor Dr. Sérgio Oliveira de Paula, por contribuir mais uma vez em meu doutorado.

À Professora Dra. Neuza Maria Brunoro Costa, mais uma vez presente em minha vida. Muito obrigado por tudo!

À Dra. Denise Machado Mourão, muito obrigado pela amizade e pelo companheirismo! Obrigado por contribuir para com essa tese.

Aos amigos Kiki, Túlio, Felipe, Vinícius e demais amigos do LAMECC. Muito obrigado pela excelente convivência e constante apoio!

Ao grande amigo e professor Dennys Cintra, com quem tenho muito a aprender. Você, mesmo longe, sempre se faz presente!

À Helen Hemsdorff e Pablo Albino, com certeza o período na Espanha não teria graça sem vocês!

A los amigos de España:

Muchísimas gracias a la Dra Silvia Lorente-Cébrian, ¡la jefa 2! Seguro que mucho más haremos en algún punto del mundo.

Doy las gracias al maestro Pedro Prieto (Dr Eliso) y Marta Fernández (Dra Western Blot) por todos los enseñamientos y por la amistad.

A la Mary, compañera. Muchísimas gracias por las ayudas y ayudas y ayudas...

A Pablo Quintero, ¡flaco tu eres un grand hermano! Muchas gracias por enseñarme la isla de Tenerife, Chinamada y su gente.

A Don Paúl Cordero, Ana Gómez y Pilar Valdecantos, ¡seguro que no os olvidaré! Las despedidas fueron increíbles.

A los amigos de cultivos, aparatos, 234 y ordenadores: Diego, Beatriz Marcos, Don José, Ceci, Rocío, Tara, Adriana, Laura, Almu, Noemí, Carmen, Carlos y Asun. ¡Ya me perdonareis si olvidé de alguien!

Al Dr. Fermín Milagro, Dr. Javier Campión y Dr. Pedro González por las ayudas con RT-PCR y cultivos.

A los técnicos Verónica Ciaurriz y Ana Lorente, por las ayudas con ELISA.

A la Paula Oteiza y Beatriz Jimeno.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste estudo o meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

ANDRÉ GUSTAVO VASCONCELOS COSTA, filho de José Flávio Costa e Geralda Marlene Vasconcelos Costa, nasceu em 11 de agosto de 1978, na cidade de Carmópolis de Minas – MG.

Em março de 2000, iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo-o em julho de 2004. Em agosto do mesmo ano iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 2006. Em agosto de 2007 iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, com período sanduíche na *Universidad de Navarra* (Espanha).

ÍNDICE

	<i>Página</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome metabólica	1
1.2 Obesidade	1
1.3 Tecido adiposo	2
1.3.1 Modelo de diferenciação de adipócitos: 3T3-L1	3
1.3.2 Cascata de eventos transcripcionais da adipogênese	4
1.3.3 Agentes reguladores da adipogênese	5
1.3.3.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF α)	5
1.3.3.2 Quemerina	6
1.3.3.3 Wingless related MMTV integration site (WNT)	7
1.3.3.4 Fator preadipogênico (DLK1 ou Pref-1)	7
1.4 Ácidos graxos ômega 3: ácido eicosapentaenóico	7
1.4.1 Metabolismo e mecanismo de ação dos ácidos graxos ômega 3: ácido eicosapentaenóico	8
1.5 Ácidos graxos de cadeia média: ácido octanóico (C8:0) e ácido láurico (C12:0)	9
1.5.1 Metabolismo e mecanismo de ação dos ácidos graxos de cadeia média: ácido octanóico (C8:0) e ácido láurico (C12:0)	10
1.6 Referências Bibliográficas	11
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 CAPÍTULO 1	21
4 CAPÍTULO 2	24
4.1 Introdução	24

4.2	Materiais e métodos	25
4.2.1	Cultivo celular	25
4.2.2	Oil Red-O	27
4.2.3	Real time PCR	27
4.2.4	Análise estatística	28
4.3	Resultados	29
4.4	Discussão	32
4.5	Agradecimentos	36
4.6	Referências Bibliográficas	43
5	CAPÍTULO 3	49
5.1	Introdução	49
5.2	Materiais e métodos	50
5.2.1	Materiais	50
5.2.2	Cultivo celular	51
5.2.3	Oil Red-O	52
5.2.4	Extração e análise da concentração de RNA	52
5.2.5	Real Time PCR	53
5.2.6	Análise estatística	54
5.3	Resultados	55
5.4	Discussão	58
5.5	Agradecimentos	62
5.6	Referências Bibliográficas	69
6	CAPÍTULO 4	73
6.1	Introdução	73
6.2	Materiais e métodos	74
6.2.1	Reagentes e anticorpo	74
6.2.2	Experimento 1	75
6.2.3	Experimento 2	75
6.2.4	Experimento 3	76
6.2.5	Real Time PCR	76
6.2.6	Imunoensaio enzimático – ELISA	77
6.2.7	Análise estatística	77
6.3	Resultados	79

6.4	Discussão	80
6.5	Agradecimentos	83
6.6	Referências Bibliográficas	89
7	CONCLUSÃO GERAL	93
8	ANEXOS	94
8.1	Anexos do Capítulo 2	94
8.2	Anexos do Capítulo 3	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	<i>Ácido araquidônico;</i>
AAL	<i>Ácido α-linolênico;</i>
AGPI	<i>Ácidos graxos poli-insaturados;</i>
AGCM	<i>Ácidos graxos de cadeia média;</i>
AICAR	<i>5-amino-4-imidazol carboxamida-1-β-d-ribofuranosídio;</i>
AMPK	<i>Proteína quinase ativada por AMP;</i>
AMPc	<i>AMP cíclico;</i>
AKT	<i>Proteína quinase B;</i>
C8:0	<i>Ácido octanóico;</i>
C12:0	<i>Ácido láurico;</i>
CC	<i>Compound C;</i>
C/EPB	<i>Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT;</i>
D	<i>Dia;</i>
DEX	<i>Dexametasona;</i>
DHA	<i>Ácido docosahexaenóico;</i>
DLK1 (Pref-1)	<i>Fator preadipogênico;</i>
DMEM	<i>Meio de Eagle modificado de Dulbecco;</i>
EPA	<i>Ácido eicopentaenóico;</i>
ERK	<i>Proteína quinase reguladora de sinal extracelular;</i>
EXP	<i>Experimento;</i>
FBS	<i>Soro bovino fetal;</i>
IBMX	<i>3-isobutil-1-metilxantina;</i>
IGF-1	<i>Fator 1 semelhante a insulina;</i>
IL	<i>Interleucina;</i>
IMC	<i>Índice de massa corporal;</i>
INS	<i>Insulina;</i>
JNK	<i>Proteína quinase c-Jun N-terminal;</i>
LY	<i>LY294002;</i>
MAPK	<i>Proteína quinase ativada por mitógenos;</i>
NF- κ B	<i>Fator nuclear κB;</i>
PD	<i>PD98059;</i>

PI3K	<i>Fosfatidil inositol 3 quinase;</i>
PPAR	<i>Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma;</i>
Ppia (Ciclofilina)	<i>Peptidil-prolil isomerase A;</i>
PKA	<i>Proteína quinase dependente de AMPC;</i>
RARRES2	<i>Receptor responsivo ao ácido retinóico²;</i>
SM	<i>Síndrome metabólica;</i>
SP	<i>SP600125;</i>
TCM	<i>Triacilgliceróis de cadeia média;</i>
TNF α	<i>Fator de necrose tumoral α;</i>
TRO	<i>Troglitazona;</i>
WNT	<i>Wingless related MMTV integration site;</i>

RESUMO

COSTA, André Gustavo Vasconcelos. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2010. **Regulação da adipogênese e da secreção de quemerina por ácidos graxos de cadeia média e pelo ácido graxo eicosapentaenóico em células 3T3-L1.** Orientadora: Josefina Bressan. Coorientadores: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Fabyano Fonseca e Silva e Paulo César Stringheta.

A incidência da obesidade vem aumentando drasticamente atingindo proporções epidêmicas no mundo, principalmente nos países ocidentais e industrializados. Evidências científicas relacionam a obesidade a um processo inflamatório crônico de baixa intensidade, devido ao aumento de citocinas proinflamatórias, como a produção anormal de fator de necrose tumoral alfa (TNF α). A hipertrofia e a hiperplasia do adipócito têm sido associadas às doenças relacionadas à síndrome metabólica, na qual a obesidade parece ser o pivô. Assim, o estudo da adipogênese é fundamental para o entendimento da obesidade, bem como para seu tratamento. Estudos sugerem que o ácido eicosapentaenóico (EPA), bem como os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) são capazes de modular a incorporação de lipídios durante a adipogênese e de regular a expressão de fatores transcricionais chave da diferenciação celular. Este estudo objetivou avaliar o efeito do EPA e de AGCM (C8:0 e C12:0) sobre a adipogênese em células 3T3-L1. Além disso, avaliou-se o efeito desses ácidos graxos sobre a expressão de mRNA e secreção de quemerina, uma nova adipocina envolvida na adipogênese. Para isso, preadipócitos foram cultivados em presença (adipogênese induzida) ou ausência (adipogênese espontânea) de coquetel de hormônios. Durante o processo de diferenciação, as células foram tratadas com C8:0 (250 μ M), C12:0 (250 μ M) e EPA (100 ou 200 μ M), acrescidos ou não de TNF α . Durante o período experimental foram coletadas amostras para avaliar a expressão gênica de: fator preadipogênico (DLK1); *Wingless related MMTV integration site 10b* (WNT10b); proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP) β , δ e α ; PPAR γ e quemerina. A incorporação de lipídios foi avaliada por Oil Red-O. Ainda, para o estudo sobre quemerina, adipócitos maduros foram incubados por 24 horas com os ácidos graxos descritos anteriormente, bem como com TNF α e insulina, em presença ou ausência de inibidores de proteínas quinase. Ao final desse período efetuou-se a análise de expressão de mRNA e da secreção de quemerina. Os resultados mostraram que

durante a adipogênese induzida os ácidos graxos não alteraram significativamente a incorporação de lipídios. Por outro lado, o EPA (200 μ M), durante a adipogênese espontânea, promoveu maior incorporação de lipídios ($p < 0,05$), ao passo que os AGCM testados não apresentaram esse efeito. O C8:0 diminuiu a incorporação de lipídios durante a adipogênese induzida, quando acrescido de TNF α , ampliando o efeito inibitório dessa citocina. O EPA, acrescido de TNF α , estimulou a expressão de mRNA de DLK1, de WNT10b e de C/EBP β , porém inibiram a expressão de C/EBP α e PPAR γ . O EPA não apresentou efeitos significativos sobre C/EBP δ . Os AGCM foram capazes de regular a expressão de fatores adipogênicos transcricionais clássicos (C/EBP β , δ e α e PPAR γ), com destaque especial aos efeitos desempenhados pelo C8:0. Em relação à expressão de quemerina, observou-se que os ácidos graxos testados aparentemente não participam da secreção e expressão dessa adipocina. Entretanto, no estudo de 24 horas de incubação, o TNF α estimulou a expressão de mRNA de quemerina, bem como sua secreção, possivelmente via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K). Em conjunto, os resultados mostraram que os ácidos graxos testados são capazes de modular a incorporação de lipídios, bem como a expressão de fatores transcricionais chave da diferenciação, potencializando o efeito do TNF α .

ABSTRACT

COSTA, André Gustavo Vasconcelos. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2010. **Regulation of adipogenesis and chemerin secretion by medium-chain fatty acids and eicosapentaenoic acid in 3T3-L1 cells.** Adviser: Josefina Bressan. Co-Advisers: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Fabyano Fonseca e Silva and Paulo César Stringheta.

The incidence of obesity has been drastically increasing, reaching epidemic proportions worldwide, mainly in Western and industrialized countries. Scientific evidence relates obesity to a chronic inflammatory process of low intensity, due to increased pro-inflammatory cytokines, such as an abnormal production of tumor necrosis factor alpha (TNF α). Hypertrophy and hyperplasia of adipocytes have been associated with diseases related to the metabolic syndrome, in which obesity seems to be the pivot. Therefore, the study of adipogenesis is crucial in the understanding of obesity, as well as its treatment. Studies suggest that both the eicosapentaenoic acid (EPA) and medium-chain fatty acids (MCFA) are capable of modulating the incorporation of lipids during the adipogenesis and of regulating the expression of key adipogenic transcription factors to cell differentiation. This study aimed to evaluate the effect of EPA and MCFA (C8:0 and C12:0) over the adipogenesis in 3T3-L1 cells. Moreover, the effect of such fatty acids over the mRNA expression and chemerin secretion, a new adipocyte involved in adipogenesis, was evaluated. Hence, preadipocytes were cultured in the presence (induced adipogenesis) or absence (spontaneous adipogenesis) of a hormonal cocktail. Throughout the differentiation process, cells were treated with C8:0 (250 μ M), C12:0 (250 μ M) and EPA (100 or 200 μ M), supplemented or not with TNF α . During the experimental period, samples were collected in order to assess the gene expression of: preadipogenic factor (DLK1), wingless related MMTV integration site 10b (WNT10b); CCAAT / enhancer-binding proteins (C/EBP) β , δ , and α ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and chemerin. The incorporation of lipids was determined by Oil Red-O. Furthermore, still regarding the study of chemerin, mature adipocytes were incubated for 24 hours with the previously described fatty acids, along with TNF α and insulin, in the presence or absence of protein kinases inhibitors. At the end of this period, an analysis of the mRNA expression and chemerin secretion was conducted. The results showed that during the induced adipogenesis, the fatty acids

did not significantly alter the incorporation of lipids. On the other hand, during the spontaneous adipogenesis, EPA (200 μ M) promoted a greater incorporation of lipids ($p < 0.05$), while the tested MCFA demonstrated no such effect. When added of TNF α , the C8:0 decreased the incorporation of lipids during the induced adipogenesis, thus enhancing the inhibitory effect of this cytokine. When added of TNF α , EPA stimulated the mRNA expression of the DLK1, WNT10b and C/EBP β , whereas the C/EBP α and PPAR γ expression were inhibited. The EPA did not present significant effects over the C/EBP δ . The MCFA were able to regulate the expression of the classical transcriptional adipogenic factors (C/EBP β , α and δ and PPAR γ), with particular emphasis given to the effects achieved by the C8:0. Regarding the expression of chemerin, it was observed that, apparently, the studied fatty acids did not participate in the secretion and expression of such adipokine. However, in a 24-hour incubation study, TNF α stimulated the expression of the mRNA chemerin, as well as its secretion, possibly via phosphatidil inositol 3-kinase (PI3K). In conclusion, the results showed that the analyzed fatty acids are capable of modulating the incorporation of lipids, as well as the expression of key adipogenic transcription factors, thus potentializing the effect of the TNF α .

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome metabólica

O termo síndrome metabólica (SM) descreve uma condição que inclui a associação de doenças com alta prevalência, principalmente obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e dislipidemia (Alberti, Zimmet et al. 2006; Bays, González-Campoy et al. 2008). Por se tratar de uma síndrome multifatorial a sua etiopatogenia não está totalmente elucidada, o que desperta interesse de pesquisadores nessa área.

A SM tem sido descrita como o maior problema de saúde pública mundial (Alberti, Zimmet et al. 2006). Embora a patogênese da SM seja complexa e ainda obscura, dois componentes são, possivelmente, os causadores: obesidade central e resistência insulínica (Alberti, Zimmet et al. 2006; Nagao and Yanagita 2008). De fato, a incidência de obesidade, resistência insulínica e diabetes vêm aumentando em proporções epidêmicas no mundo, independente da classe econômica ou grau de desenvolvimento do país (Esposito and Giugliano 2004; Mermel 2004; Pilch and Berghem 2006). Browning (2003) relata que homens com índice de massa corporal (IMC) acima de 30 kg/m² tem 13 vezes mais chances de desenvolver diabetes tipo 2 e mulheres tem 12 vezes mais chance, comparados ao IMC de 22 kg/m²; o que demonstra que essas doenças estão intrinsecamente associadas.

1.2. Obesidade

A obesidade pode estar relacionada com 44 tipos de doenças, as quais afetam 12 diferentes órgãos e tecidos do sistema humano (Mermel 2004). O excesso de gordura corporal, principalmente a visceral, está intimamente associado ao processo inflamatório, resistência insulínica, diabetes, dislipidemia e hipertensão arterial (Kershaw and Flier 2004; Després and Lemieux 2006). De acordo com Organização Mundial de Saúde aproximadamente um terço dos europeus são obesos e estima-se que, nesses países, ocorram 320.000 mortes/ano decorrentes de doenças associadas à obesidade (Mermel 2004). No Brasil, em um estudo com pacientes ambulatoriais, a magnitude da obesidade é semelhante às descritas na Europa, porém menor que nos Estados Unidos (Gomes, Giannella Neto et al. 2006). Aproximadamente 67% dos

indivíduos com diabetes tipo 2 possuem sobrepeso ou obesidade, o que confirma a associação entre essas doenças (Jeffcoat 2007).

A obesidade se desenvolve quando a quantidade de energia ingerida é maior que a expendida, gerando um excesso de substrato, o qual é estocado na forma de triacilgliceróis, causando hipertrofia e hiperplasia de adipócitos (Kovacs and Mela 2006; Bays, González-Campoy et al. 2008). A obesidade é caracterizada por um processo inflamatório crônico de baixo grau, devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina 6 (IL-6) (Browning 2003; Zampelas, Panagiotakos et al. 2005; Calder 2006; Carpentier, Portois et al. 2006; Robinson, Buchholz et al. 2007; Nagao and Yanagita 2008). Além disso, o tecido adiposo de indivíduos obesos possui uma concentração anormal de macrófagos, os quais contribuem diretamente para a produção desses mediadores inflamatórios (Tilg and Moschen 2006). Ainda, sugere-se que a obesidade esteja relacionada ao aumento do estresse oxidativo e redução dos mecanismos de defesa antioxidantes. O consumo calórico excessivo produz uma grande quantidade de radicais livres, que contribuem para o processo inflamatório (Keaney, Larson et al. 2003; Urakawa, Katsuki et al. 2003; Nettleton and Katz 2005).

Os mecanismos moleculares e fisiopatológicos envolvidos na obesidade não estão totalmente elucidados. Sabe-se que a ocidentalização da alimentação, associado ao sedentarismo, é um fator preponderante para a gênese dessa doença. Nesse sentido, a alta ingestão de lipídios é considerada como um importante fator para a gênese da obesidade, o que sugere que o controle dessa doença perpassa pelo controle da quantidade e da qualidade do ácido graxo consumido (Aoyama, Nosaka et al. 2007).

1.3. Tecido adiposo

O tecido adiposo pode ser caracterizado como um órgão endócrino, que desempenha um papel crucial na regulação e na homeostase energética. Entre as substâncias secretadas por esse tecido, destacam-se as adipocinas (peptídeos bioativos ou sinalizadores celulares) com atuação autócrina, parácrina e sistêmica; bem como diversos receptores para os tradicionais hormônios sistêmicos (Kershaw and Flier 2004; Fonseca-Alaniz, Takada et al. 2007). Entre as adipocinas mais estudadas destacam-se a adiponectina e leptina (Fruebis, Tsao et al. 2001; Yamauchi,

Kamon et al. 2003; Fernandez-Real, Vendrell et al. 2005; Perez-Matute, Marti et al. 2005; Fonseca-Alaniz, Takada et al. 2007; Hernandez-Morante, Milagro et al. 2007), o TNF α (Pischon, Hankinson et al. 2003; Lopez-Garcia, Schulze et al. 2004; Zampelas, Panagiotakos et al. 2005; Perez-Matute, Perez-Echarri et al. 2007; Sierra, Lara-Villoslada et al. 2008; Wang, Lim et al. 2008; Micallef and Garg 2009) e a IL-6 (Ciubotaru, Lee et al. 2003; Mori, Woodman et al. 2003; Browning, Krebs et al. 2007). Por outro lado, outras adipocinas, como a quemerina (Arita, Bianchini et al. 2005) foram detectadas mais recentemente no tecido adiposo e, portanto, carecem de estudos.

O tecido adiposo branco é constituído de aproximadamente 50% de adipócitos e 50% de células sanguíneas, células endoteliais, macrófagos e precursores de adipócitos com diferentes graus de diferenciação, fundamentalmente fibroblastos e preadipócitos (Moreno-Aliaga and Martinez 2002; Bays, González-Campoy et al. 2008). A formação desse tecido inicia-se antes do nascimento, embora sua maior expansão seja após esse período (Fève 2005). Em períodos de balanço calórico positivo, a energia é estocada por meio da lipogênese, causando hipertrofia do adipócito. Paralelamente, ocorre o recrutamento e diferenciação de novas células adiposas (Moreno-Aliaga and Martinez 2002; Bays, González-Campoy et al. 2008). Assim, para o entendimento e tratamento da obesidade, é de grande importância identificar quais são os fatores reguladores da formação de novos adipócitos, a partir de células precursoras existentes no tecido adiposo.

1.3.1. Modelo de diferenciação de adipócitos: 3T3-L1

A diferenciação de adipócitos é um processo complexo, no qual os preadipócitos devem interromper seu crescimento e sair do ciclo celular antes do processo de diferenciação (Gregoire 2001). A utilização da linhagem celular 3T3-L1, oriundas de embriões de camundongos Swiss 3T3, é ideal para o estudo dos eventos moleculares responsáveis pela conversão de preadipócitos em adipócitos (Ntambi and Young-Cheul 2000; Fève 2005). A indução da adipogênese, em preadipócitos 3T3-L1, ocorre por meio da suplementação do meio de cultivo com coquetel de hormônios indutores da diferenciação celular (3-isobutil-1-metilxantina, dexametasona e insulina), cujo objetivo é mimetizar o enriquecimento hormonal em estágios iniciais da diferenciação celular (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Yang,

Della-Fera et al. 2009). Ao final da diferenciação, essas células se assemelham aos adipócitos encontrados no tecido adiposo branco, no que condiz aos aspectos morfológicos, como acúmulo de triacilgliceróis, e moleculares, como a expressão gênica (Kato, Ozaki et al. 2007).

A utilização da linhagem 3T3-L1 constitui um modelo mais confiável e adequado para a análise da hipertrofia durante a adipogênese, uma vez que essa linhagem é altamente caracterizada e fornece uma população homogênea, podendo realizar culturas indefinidamente (Ntambi and Young-Cheul 2000; Moreno-Aliaga and Martinez 2002; Feve 2005). Entretanto, a extrapolação dos resultados obtidos com modelos celulares *in vitro* deve ser realizada com cautela, uma vez que apresenta diferenças em relação aos modelos de cultivo primário de animais (ratos, camundongos e porcos) e de humanos. Além disso, por ser um modelo *in vitro*, obviamente diferente da situação *in vivo*.

1.3.2. Cascata de eventos transcricionais da adipogênese

O processo de adipogênese, *in vitro*, compreende estágios bem ordenados e organizados: ruptura do ciclo celular, expansão clonal e processo de diferenciação, caracterizado por eventos iniciais, intermediários e terminais (Figura 1.1) (Ntambi and Young-Cheul 2000; Gregoire 2001; Moreno-Aliaga and Martinez 2002; Feve 2005; Queiroz, Alonso-Vale et al. 2009).

Com objetivo de interromper a proliferação dessas células e estimular a adipogênese, as células 3T3-L1 são tratadas com indutores adipogênicos, que incluem um agonista de glicocorticóides (dexametasona), um receptor de fator 1 semelhante a insulina – IGF-1 (insulina) e um agente que aumenta a concentração de AMPc intracelular (3-isobutil-1-metilxantina – IBMX). Além disso, há a adição de uma alta dose de glicose para estimular os receptores de IGF-1. Esses agentes, em conjunto, promovem a estimulação dos eventos iniciais representados pela expressão de proteínas ligantes ao amplificador – C/EPBs (isômeros β e δ) (Figura 1.1). Após, as células reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular de forma regulada (expansão clonal), saem permanentemente do ciclo celular e entram em diferenciação terminal. Essa etapa ocorre por meio da ativação do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos – PPAR γ e pela ativação de C/EPB α ; os quais são os reguladores principais da adipogênese (Figura 1.1). O PPAR γ antecede a expressão

de C/EPB α , sendo que esses genes são capazes de estimularem a si próprios, assim como um ao outro.

A expressão dos genes PPAR γ e C/EPB α ativam a expressão da grande maioria, senão de todos, os genes que caracterizam o fenótipo adipocitário, como as enzimas ácido graxo sintase e acetil-CoA carboxilase, além do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) e proteína ligadora de ácidos graxos (aP2/FABP). Por meio desse processo, no citoplasma celular aparecem gotas lipídicas, que ao longo do tempo ocupam grande parte do citoplasma.

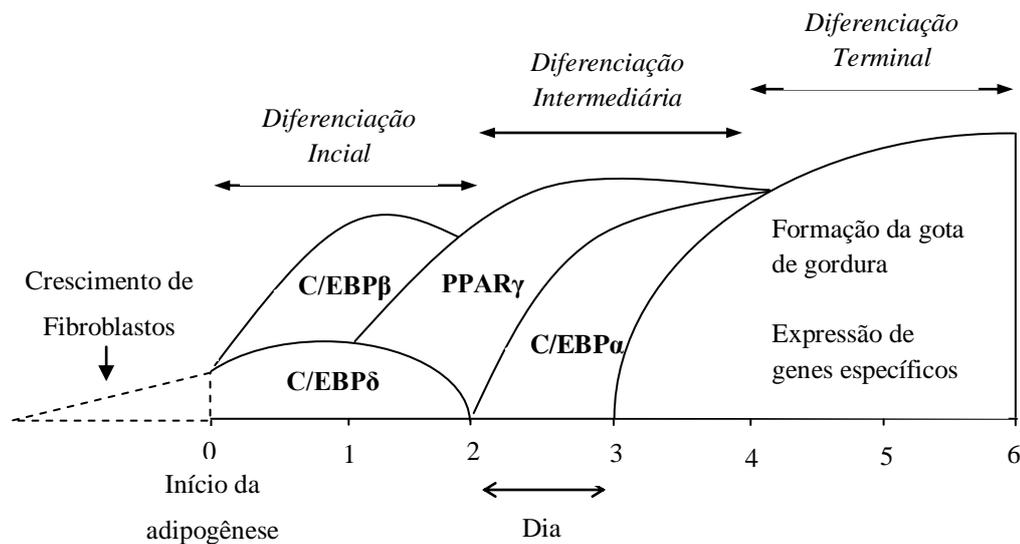


Figura 1.1: Evolução da diferenciação de adipócitos. Os principais eventos que ocorrem durante a adipogênese são apresentados cronologicamente. As áreas delimitadas pelos nomes dos genes representam períodos de expressão gênica. Os diferentes estágios de diferenciação estão representados na porção superior da figura. C/EPBs: Proteínas ligantes ao amplificador (isômeros α , β e δ), PPAR γ : Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos. Adaptado de Ntambi & Young-Cheul (2000).

1.3.3. Agentes reguladores da adipogênese

1.3.3.1. Fator de necrose tumoral alfa (TNF α)

TNF α (fator de necrose tumoral alfa) é uma proteína transmembrana que sofre processos de clivagem, originando a sua forma biologicamente ativa, a qual

exerce sua função por meio de receptores tipo I e II (Guilherme, Tesz et al. 2009). O TNF α é naturalmente sintetizado e secretado por adipócitos e macrófagos. Evidências sugerem que o TNF α e seu receptor estão envolvidos na resistência insulínica (Warne 2003; Perez-Matute, Perez-Echarri et al. 2007; Wang, Lim et al. 2008). Essa adipocina inibe a sinalização de insulina, reduzindo a fosforilação de resíduos de serina nos receptores de insulina S1 e da atividade do receptor fosfoinositol 3-quinase (PI3K), provocando diminuição da síntese do transportador de glicose GLUT-4 (Rajala and Scherer 2003; Tilg and Moschen 2008). Ainda, o TNF α desempenha um importante papel no controle parácrino e autócrino do funcionamento de adipócitos (Warne 2003). Essa substância inibe a ação da lipase de lipoproteína, responsável pela captação de triacilgliceróis de lipoproteínas plasmáticas (Hita, Ramírez et al. 2002), promove a lipólise e impede a lipogênese (Warne 2003), como consequência há inibição da hiperplasia da célula adiposa. Além disso, o TNF α induz a apoptose em adipócitos (Guilherme, Tesz et al. 2009).

1.3.3.2. Quemerina

Quemerina é uma proteína que é produzida em vários órgãos e tecidos, como o fígado, pulmão, rim e recentemente foi descoberta no tecido adiposo (Bozaoglu, Bolton et al. 2007; Roh, Song et al. 2007). Essa adipocina é o ligante natural do receptor para quemerina (chemerinR), também conhecido como receptor 1 semelhante a quimocina (ChemR23), que é um membro da família dos receptores órfãos acoplados à proteína G.

A quemerina parece estar envolvida no metabolismo lipídico e de carboidratos (MacDougald and Burant 2007) e os níveis plasmáticos dessa adipocina mostram uma forte e independente associação com componentes da síndrome metabólica, incluindo obesidade, triacilgliceróis plasmáticos e pressão arterial (Bozaoglu, Bolton et al. 2007). Ainda, a expressão de mRNA de quemerina foi descrita em adipócitos maduros e em tecido adiposo de animais obesos, o que sugere que a expressão dessa substância pode refletir o estágio de diferenciação e tamanho do adipócito, bem como o total de massa adiposa (Bozaoglu, Bolton et al. 2007). De acordo com Roh *et al.* (2007) a quemerina apresenta um efeito lipolítico em adipócitos diferenciados e a sua expressão, bem como de seu receptor parecem ser

controlados por fatores transcricionais de adipócitos, incluindo o PPAR γ . No entanto, essas vias ainda não estão elucidadas.

1.3.3.3. Wingless related MMTV integration site 10b (WNT10b)

O início da adipogênese normalmente depende da inibição de WNT (*Wingless related MMTV integration site*), uma família de lipoproteínas glicosiladas, na qual a WNT10b é expressada em preadipócitos, mas não em adipócitos (Gustafson, Hammarstedt et al. 2007). Após a indução da diferenciação a expressão de WNT10b é rapidamente suprimida. De uma forma geral, a expressão de WNT não afeta a indução de C/EBP β e C/EBP δ , mas bloqueia a indução dos fatores transcricionais C/EBP α e PPAR γ (Ross, Hemati et al. 2000). Assim, essas glicoproteínas atuam freando o processo de diferenciação de preadipócitos. A adição de tiazolidinedionas, como a troglitazona, que estimulam a expressão de PPAR γ promove a degradação de β -cateninas, um potente inibidor da adipogênese (Gustafson, Hammarstedt et al. 2007). Por outro lado, o TNF α inibe a diferenciação celular, mantendo a sinalização de WNT (Christodoulides, Lagathu et al. 2009).

1.3.3.4. Fator preadipogênico (DLK1 ou Pref-1)

O fator preadipogênico 1 (DLK1 ou Pref-1), também conhecido como DLK1, é uma proteína de membrana, que atua como inibidor da diferenciação celular. Em preadipócitos o DLK1 se expressa mais intensamente, o qual diminui ao longo do período de diferenciação celular (Sul, Smas et al. 2000). A dexametasona, um agonista de glicocorticóides, atua inibindo a expressão de DLK1 e, assim, promovendo a adipogênese.

1.4. Ácidos graxos ômega 3: ácido eicosapentaenóico

Os ácidos graxos são classificados em saturados ou insaturados, de acordo com a ausência ou presença, respectivamente, de duplas ligações carbono-carbono. Os insaturados são divididos em monoinsaturados (apenas uma insaturação) ou em poliinsaturados (mais de uma dupla ligação). Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), por sua vez, são classificados de acordo com a posição da primeira dupla ligação, relativa ao grupamento metil terminal. Entre os AGPI da série n-3 inclui-se o ácido alfa linolênico (AAL), essencial ao organismo animal, precursor de

importantes compostos como o EPA e DHA. Entre os AGPI da série n-6 destaca-se o ácido araquidônico (AA – C20:4 n-6), cujo precursor é o ácido graxo essencial ácido linoléico (C18:2 n-6) (Saldeen and Saldeen 2006; El-Badry, Graf et al. 2007). Esses processos de conversão são mediados por enzimas de dessaturação ($\Delta 5$ e $\Delta 6$) e enzimas de alongação (Burdge 2006).

Os AGPI n-3 estão presentes em peixes marinhos, principalmente entre aqueles provenientes de águas frias e profundas. Destacam-se como fontes de AAL o óleo de soja, a linhaça e seu óleo e como fontes de EPA e DHA estão incluídos o salmão, cavala, anchova e sardinha. Por outro lado, os óleos vegetais (girassol, milho e soja) possuem 50% ou mais de AGPI n-6 (Cintra, Costa et al. 2006; Baylin, Siles et al. 2007; Sirot, Oseredczuk et al. 2008; Russo 2009). Uma vez consumidos, os ácidos graxos podem ser oxidados, fornecendo energia; serem estocados, na forma de triacilgliceróis; comporem estruturas celulares, como as membranas lipídicas; ou serem metabolizados, originando outros ácidos graxos e subprodutos destes, como os eicosanóides e resolvinas (Burdge 2006). Os metabólitos desses ácidos graxos essenciais são fundamentais para o adequado funcionamento do cérebro, retina, fígado, rim, glândulas adrenais e gonodais (Das 2006).

1.4.1. Metabolismo e mecanismo de ação dos ácidos graxos ômega 3: ácido eicosapentaenóico

As membranas celulares são constituídas de aproximadamente 60% de lipídios (Saldeen and Saldeen 2006; Schmitz and Ecker 2008). Os ácidos graxos saturados tornam a membrana celular rígida e compacta, ao passo que a incorporação de AGPI confere maior flexibilidade e fluidez a essas estruturas. Essa plasticidade favorece importantes processos na membrana, como atividades de enzimas, transporte de proteínas, permeabilidade a íons e funcionamento de receptores, expressão gênica (Saldeen and Saldeen 2006), bem como favorece o tráfego e funcionamento de proteínas e a fusão e excreção de vesículas (Schmitz and Ecker 2008). De acordo com Russo (2009) a resistência insulínica pode estar associada à rigidez da membrana, a qual limita o número de receptores para esse hormônio.

A incorporação de AGPI em membranas celulares está relacionada à produção de eicosanóides, que são substâncias de ação parácrina e rapidamente metabolizadas. O AA e o EPA, por meio da ação de enzimas ciclooxigenase (COX) e

lipooxigenase (LOX), são convertidos a prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT) da série par e ímpar, respectivamente (Calder 2006; Saldeen and Saldeen 2006; Schmitz and Ecker 2008). De uma forma geral, os eicosanóides da série par são mais potentes e de natureza inflamatória, ao passo que aqueles da série ímpar são menos potentes ou apresentam atividade antiinflamatória (Schmitz and Ecker 2008). Ainda, as PG da série par (I_2 , $F_{2\alpha}$ e E_2) participam do processo de diferenciação do pré-adipócito, o que favorece a adipogênese (Hita, Ramírez et al. 2002). Recentemente, descobriu-se que o AA, EPA e DHA são precursores de substâncias chamadas resolvinas (*resolution phase interaction products*), que desempenham atividade antiinflamatória (Serhan 2004; Das 2006).

Estudos envolvendo humanos e animais sugerem que os AGPI n-3, em especial o EPA, desempenham uma atividade antiobesidade (Fernandez-Real, Vendrell et al. 2005; Hernandez-Morante, Milagro et al. 2007; Pérez-Echarri, Pérez-Matute et al. 2008), estimulando a β -oxidação e reprimindo a síntese de lipídios (Al-Hasani and Joost 2005). Entretanto, poucos estudos verificaram o efeito desse ácido graxo durante a adipogênese *in vitro*.

1.5. Ácidos graxos de cadeia média: ácido octanóico (C8:0) e ácido láurico (C12:0)

Os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) representam uma família de gliceróis compostos pelos ácidos graxos capróico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e láurico (C12:0). Devido suas propriedades físico-químicas, desde 1950, os TCM vêm sendo amplamente utilizados em vários ramos da indústria e em 1994, os produtos que contém esses compostos receberam da Food and Drugs Administration (Estados Unidos) o status de GRAS (Substância Geralmente Reconhecida como Segura) (Traul, Driedger et al. 2000). Na área clínica, esses lipídios são utilizados como fonte energética em casos de anormalidades do metabolismo lipídico (insuficiência pancreática, fibrose cística, cirrose, má absorção de lipídios, transporte inadequado de quilomícrom, hiperquilomicrolidemia), em casos de epilepsia, doença celíaca, obesidade e como componente lipídico de fórmulas para nutrição enteral, parenteral total e fórmulas infantis (Nandi, Gangopadhyay et al. 2005; Jones, Butt et al. 2006; Marten, Pfeuffer et al. 2006; Takeuchi, Sekine et al. 2008). Além de sua aplicação como alimento, os TCM podem ser utilizados como emulsificantes, em

produtos farmacêuticos e em cosméticos (Traul, Driedger et al. 2000; Nandi, Gangopadhyay et al. 2005), como solventes de tinturas e perfumes (Nandi, Gangopadhyay et al. 2005), como lubrificantes industriais e há um crescente interesse em sua aplicação como biodiesel (Ghebretinsae, Graham et al. 2008).

As principais fontes naturais de TCM são os óleos de coco, de palma ou azeite de dendê e de babaçu. Pequenas quantidades são também encontradas em leites, manteigas e queijos. O principal ácido graxo de cadeia média presente em óleos comestíveis é o C12:0, variando de 2 a 50% do total lipídico e o C8:0 e o C10:0 são os preponderantes em módulos utilizados em terapia nutricional.

1.5.1. Metabolismo e mecanismo de ação dos ácidos graxos de cadeia média: ácido octanóico (C8:0) e ácido láurico (C12:0)

Os AGCM são absorvidos de forma mais eficiente e mais rápida, devido ao tamanho da cadeia carbônica, por facilitarem a ação de lipases, por serem mais solúveis em água e por não requererem a formação de quilomícrons. O transporte dessas substâncias ao fígado (local onde são oxidados) é realizado via circulação portal e conduzidos, principalmente, pela albumina. Assim, esses compostos evitam a passagem periférica, o que impede sua deposição no tecido adiposo (St-Onge 2005; Marten, Pfeuffer et al. 2006; Roynette, Rudkowska et al. 2008; Takeuchi, Sekine et al. 2008). Além disso, esses compostos sofrem menor ação da acil-CoA sintetase (responsável pela reesterificação de triacilgliceróis) e não requerem a presença da carnitina acil transferase, o que acelera a β -oxidação e limita a estocagem do TCM no tecido (Kovacs and Mela 2006; Marten, Pfeuffer et al. 2006). No entanto, é desconhecido o exato mecanismo pelo qual os AGCM são independentes da carnitina. Jones *et al.* (2006), em um estudo com fibroblastos, relataram que os AGCM sofrem um processo de alongação anterior à oxidação, sendo independente do mecanismo de síntese de ácidos graxos. Ressalta-se que a compreensão dessas rotas metabólicas tem importantes implicações para o tratamento de inúmeras desordens, nas quais os AGCM são os componentes dietéticos necessários para o tratamento.

O alto consumo de TCM e a facilidade de oxidação dos AGCM podem gerar um excesso de produção de acetil-CoA, acetato, CO₂ e de corpos cetônicos. Entretanto, o consumo desses compostos, em dietas normais, não provoca

cetoacidose ou cetonemia (Traul, Driedger et al. 2000; Kovacs and Mela 2006; Matulka, Noguchi et al. 2006). Por outro lado, segundo Marten *et al.* (2006) a proporção de TCM em quilomícrons aumenta de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e com a administração prolongada. Tal fato pode promover a incorporação ou favorecer uma maior oxidação de AGCM em tecidos periféricos, como o tecido adiposo.

Estudos sugerem que o ácido octanóico (C8:0) aumenta a diferenciação de adipócitos em presença (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Sanosaka, Minashima et al. 2008) ou em ausência (Yang, Della-Fera et al. 2009) de coquetel adipogênico. Por outro lado, outros estudos sugerem que o octanoato atenua a adipogênese (Guo, Choi et al. 2000; Han, Farmer et al. 2002; Han, Hamilton et al. 2003). Segundo DeLany et al. (2000), o ácido láurico (C12:0) é preferencialmente oxidado em detrimento de outros ácidos graxos saturados e de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. Ding et al. (Ding and Mersmann 2001) verificaram que o C12:0 não apresentou efeito sobre a diferenciação de adipócitos, de acordo com a coloração por Oil Red-O.

1.6. Referências Bibliográficas

Al-Hasani, H. and H. G. Joost (2005). "Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 589-603.

Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. (2006). "Metabolic syndrome--a new world-wide definition: a Consensus Statement from the International Diabetes Federation." Diabet Med **23**(5): 469-480.

Aoyama, T., N. Nosaka, et al. (2007). "Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids." J Med Invest **54**(3-4): 385-388.

Arita, M., F. Bianchini, et al. (2005). "Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1." J Exp Med **201**(5): 713-722.

Baylin, A., X. Siles, et al. (2007). "Fatty acid composition of Costa Rican foods including trans fatty acid content." J Food Comp Anal **20**(3-4): 182-192.

Bays, H. E., J. M. González-Campoy, et al. (2008). "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(3): 343-368.

Bozaoglu, K., K. Bolton, et al. (2007). "Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome." Endocrinology **148**(10): 4687-4694.

Browning, L. M. (2003). "n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease." Proc Nutr Soc **62**(2): 447-453.

Browning, L. M., J. D. Krebs, et al. (2007). "The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on inflammation, insulin sensitivity and CVD risk in a group of overweight women with an inflammatory phenotype." Diabetes Obes Metab **9**(1): 70-80.

Burdge, G. C. (2006). "Metabolism of [alpha]-linolenic acid in humans." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(3): 161-168.

Calder, P. (2006). "n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): S1505-1519.

Carpentier, Y. A., L. Portois, et al. (2006). "n-3 fatty acids and the metabolic syndrome." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): 1499S-1504S.

Christodoulides, C., C. Lagathu, et al. (2009). "Adipogenesis and WNT signalling." Trends Endocrinol Metab **20**(1): 16-24.

Cintra, D. E. C., A. V. Costa, et al. (2006). "Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin." Nutrition **22**(2): 197-205.

Ciubotaru, I., Y.-S. Lee, et al. (2003). "Dietary fish oil decreases C-reactive protein, interleukin-6, and triacylglycerol to HDL-cholesterol ratio in postmenopausal women on HRT." J Nutr Biochem **14**(9): 513-521.

Das, U. N. (2006). "Biological significance of essential fatty acids." J Assoc Physicians India **54**: 309-319.

DeLany, J. P., M. M. Windhauser, et al. (2000). "Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans." Am J Clin Nutr **72**(4): 905-911.

Després, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-887.

Ding, S. and H. J. Mersmann (2001). "Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins*." J Nutr Biochem **12**(2): 101-108.

El-Badry, A. M., R. Graf, et al. (2007). "Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?" J Hepatol **47**(5): 718-725.

Esposito, K. and D. Giugliano (2004). "The metabolic syndrome and inflammation: association or causation?" Nutr Metab Cardiovasc Dis **14**(5): 228-232.

Fernandez-Real, J. M., J. Vendrell, et al. (2005). "Circulating adiponectin and plasma fatty acid profile." Clin Chem **51**(3): 603-609.

Fève, B. (2005). "Adipogenesis: cellular and molecular aspects." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 483-499.

Fonseca-Alaniz, M. H., J. Takada, et al. (2007). "Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice." J Pediatr (Rio J) **83**(5 Suppl): S192-203.

Fruebis, J., T. S. Tsao, et al. (2001). "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 2005-2010.

Ghebretinsae, A. G., S. A. Graham, et al. (2008). "Natural infraspecific variation in fatty acid composition of *Cuphea* (Lythraceae) seed oils." Industrial Crops and Products **27**(3): 279-287.

Gomes, M. B., D. Giannella Neto, et al. (2006). "Nationwide multicenter study on the prevalence of overweight and obesity in type 2 diabetes mellitus in the Brazilian population." Arq Bras Endocrinol Metabol **50**(1): 136-144.

Gregoire, F. M. (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 997-1002.

Guilherme, A., G. J. Tesz, et al. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes." J Biol Chem **284**(25): 17082-17091.

Guo, W., J. K. Choi, et al. (2000). "Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate." Biochem J **349**(Pt 2): 463-471.

Gustafson, B., A. Hammarstedt, et al. (2007). "Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2276-2283.

Han, J., S. R. Farmer, et al. (2002). "Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes." J Nutr **132**(5): 904-910.

Han, J., J. A. Hamilton, et al. (2003). "Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats." Obes Res **11**(6): 734-744.

Hernandez-Morante, J. J., F. I. Milagro, et al. (2007). "Relationship among Adiponectin, Adiponectin Gene Expression and Fatty Acids Composition in Morbidly Obese Patients." Obes Surg **17**(4): 516-524.

Hita, M. G., B. E. B. Ramírez, et al. (2002). "Funciones endocrinas de la célula adiposa." Rev Endocrinol Nutr **10**(3): 140-146.

Jeffcoat, R. (2007). "Obesity - A perspective based on the biochemical interrelationship of lipids and carbohydrates." Medical hypotheses **68**(5): 1159-1171.

Jones, P. M., Y. Butt, et al. (2006). "Medium-chain fatty acids undergo elongation before [beta]-oxidation in fibroblasts." Biochemical and Biophysical Research Communications **346**(1): 193-197.

Kato, Y., N. Ozaki, et al. (2007). "H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A." Life Sci **80**(5): 476-483.

Keaney, J. F. J., M. G. Larson, et al. (2003). "Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(3): 432-439.

Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." J Clin Endocr Metab **89**(6): 2548-2556.

Kovacs, E. M. and D. J. Mela (2006). "Metabolically active functional food ingredients for weight control." Obes Rev **7**(1): 59-78.

Lopez-Garcia, E., M. B. Schulze, et al. (2004). "Consumption of (n-3) Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Activation in Women." J Nutr **134**: 1806-1811.

MacDougald, O. A. and C. F. Burant (2007). "The Rapidly Expanding Family of Adipokines." Cell Metab **6**(3): 159-161.

Marten, B., M. Pfeuffer, et al. (2006). "Medium-chain triglycerides." International Dairy Journal **16**(11): 1374-1382.

Matulka, R. A., O. Noguchi, et al. (2006). "Safety evaluation of a medium- and long-chain triacylglycerol oil produced from medium-chain triacylglycerols and edible vegetable oil." Food and Chemical Toxicology **44**(9): 1530-1538.

Mermel, V. (2004). "Old paths new directions: the use of functional foods in the treatment of obesity." Trends Food Sci Tech **15**(11): 532-540.

Micallef, M. A. and M. L. Garg (2009). "Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals." Atherosclerosis **204**(2): 476-482.

Moreno-Aliaga, M. J. and J. A. Martinez (2002). "El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor." An Sist Sanit Navar **25**(1): 29-39.

Mori, T. A., R. J. Woodman, et al. (2003). "Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects." Free Radic Biol Med **35**(7): 772-781.

Nagao, K. and T. Yanagita (2008). "Bioactive lipids in metabolic syndrome." Prog Lipid Res **47**(2): 127-146.

Nandi, S., S. Gangopadhyay, et al. (2005). "Production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase-catalyzed reactions." Enzyme and Microbial Technology **36**(5-6): 725-728.

Nettleton, J. A. and R. Katz (2005). "n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review." J Am Diet Assoc **105**(3): 428-440.

Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." J Nutr **130**(12): 3122S-3126S.

Pérez-Echarri, N., P. Pérez-Matute, et al. (2008). "Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats." Br J Nutr: 1-9.

Perez-Matute, P., A. Marti, et al. (2005). "Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(6): R1682-1688.

Perez-Matute, P., N. Perez-Echarri, et al. (2007). "Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha." Br J Nutr **97**(2): 389-398.

Pilch, P. F. and N. Bergenheim (2006). "Pharmacological targeting of adipocytes/fat metabolism for treatment of obesity and diabetes." Mol Pharmacol **70**(3): 779-785.

Pischon, T., S. E. Hankinson, et al. (2003). "Habitual Dietary Intake of n-3 and n-6 Fatty Acids in Relation to Inflammatory Markers Among US Men and Women." Circulation **108**(2): 155-160.

Queiroz, J. C. F., M. I. Alonso-Vale, et al. (2009). "Controle da adipogênese por ácidos graxos." Arq Bras Endocrinol Metab **53**(5): 582-594.

Rajala, M. W. and P. E. Scherer (2003). "Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis." Endocrinology **144**: 3765-3773.

Robinson, L. E., A. C. Buchholz, et al. (2007). "Inflammation, obesity, and fatty acid metabolism: influence of n-3 polyunsaturated fatty acids on factors contributing to metabolic syndrome." Appl Physiol Nutr Metab **32**(6): 1008-1024.

Roh, S.-g., S.-H. Song, et al. (2007). "Chemerin--A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor." Biochem Biophys Res Commun **362**(4): 1013-1018.

Ross, S. E., N. Hemati, et al. (2000). "Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling." Science **289**(5481): 950-953.

Royette, C. E., I. Rudkowska, et al. (2008). "Structured medium and long chain triglycerides show short-term increases in fat oxidation, but no changes in adiposity in men." Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases **18**(4): 298-305.

Russo, G. L. (2009). "Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention." Biochem Pharmacol **77**(6): 937-946.

Saldeen, P. and T. Saldeen (2006). "Omega-3 Fatty acids: structure, function, and relation to the metabolic syndrome, infertility, and pregnancy." Metab Syndr Relat Disord **4**(2): 138-148.

Sanosaka, M., T. Minashima, et al. (2008). "A combination of octanoate and oleate promotes in vitro differentiation of porcine intramuscular adipocytes." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **149**(2): 285-292.

Schmitz, G. and J. Ecker (2008). "The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids." Prog Lipid Res **47**(2): 147-155.

Serhan, C. N. (2004). "A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution." Histochem Cell Biol **122**: 305-321.

Sierra, S., F. Lara-Villoslada, et al. (2008). "Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as decosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects." Nutrition **24**(3): 245-254.

Sirotnik, V., M. Oseredczuk, et al. (2008). "Lipid and fatty acid composition of fish and seafood consumed in France: CALIPSO study." J Food Comp Anal **21**(1): 8-16.

St-Onge, M. P. (2005). "Dietary fats, teas, dairy, and nuts: potential functional foods for weight control?" Am J Clin Nutr **81**(1): 7-15.

Sul, H. S., C. Smas, et al. (2000). "Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 4**: S15-19.

Takenouchi, T., Y. Takayama, et al. (2004). "Co-treatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells." Cell Biol Int **28**(3): 209-216.

Takeuchi, H., S. Sekine, et al. (2008). "The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation." Asia Pac J Clin Nutr **17**(S1): 320-323.

Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-783.

Tilg, H. and A. R. Moschen (2008). "Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease." Trends Endocrinol Metab **19**(10): 371-379.

Traul, K. A., A. Driedger, et al. (2000). "Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides." Food and Chemical Toxicology **38**(1): 79-98.

Urakawa, H., A. Katsuki, et al. (2003). "Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 4673-4676.

Wang, L., E.-J. Lim, et al. (2008). "The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor [alpha]-induced endothelial cell activation." Metabolism **57**(10): 1328-1339.

Warne, J. P. (2003). "New perspectives on endocrine signalling." J Endocrinol **177**: 351-355.

Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis." J Biol Chem **278**(4): 2461-2468.

Yang, J.-Y., M. A. Della-Fera, et al. (2009). "Regulation of adipogenesis by medium-chain fatty acids in the absence of hormonal cocktail." J Nutr Biochem **20**(7): 537-543.

Zampelas, A., D. B. Panagiotakos, et al. (2005). "Fish Consumption Among Healthy Adults Is Associated With Decreased Levels of Inflammatory Markers Related to Cardiovascular Disease: The ATTICA Study." J Am Coll Cardiol **46**(1): 120-124.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de ácidos graxos de cadeia média e do ácido graxo eicosapentaenóico sobre a adipogênese em células 3T3-L1.

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar os efeitos de ácidos graxos cadeia média (octanóico – C8:0 e láurico – C12:0) na regulação da adipogênese induzida e espontânea em células 3T3-L1.
- Investigar os efeitos do ácido graxo eicosapentaenóico (EPA – C20:5 n-3) na regulação da adipogênese induzida e espontânea em células 3T3-L1.
- Verificar os efeitos de ácidos graxos de cadeia média e do ácido graxo eicosapentaenóico frente à ação antiadipogênica do fator de necrose tumoral alfa (TNF α).
- Analisar a ação de ácidos graxos cadeia média e do ácido graxo eicosapentaenóico na regulação da expressão de mRNA e secreção da proteína quemerina.
- Verificar possíveis vias de sinalização para a secreção de quemerina.

3. CAPÍTULO 1

ESTUDO INICIAL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF α)

Inicialmente avaliaram-se as concentrações de ácidos graxos que foram utilizadas nos capítulos 2, 3 e 4.

Uma vez alcançada a confluência, os preadipócitos 3T3-L1 foram incubados em meio basal (DMEM a 25 mM de glicose, 10% v/v de FBS, 100 unidades/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina), durante todo o processo de diferenciação. Os tratamentos foram divididos em três grupos: A) suplementação de hormônios indutores de diferenciação (1 μ M de dexametasona, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina – IBMX e 10 μ g/mL de insulina); B) suplementação com coquetel de hormônios, acrescido de TNF- α (5 ng/mL) e C) ausência de hormônios indutores de diferenciação. Ainda, cada grupo foi incubado em presença dos seguintes fatores: Troglitazona (10 μ M), C8:0 (250 μ M ou 1mM), C12:0 (250 μ M, 500 μ M ou 1mM) ou EPA (10 μ M, 100 μ M, 200 μ M ou 300 μ M). Os tratamentos, acrescidos ou não de TNF- α , foram adicionados ao meio a cada 2 dias, imediatamente após a troca do meio basal por um meio basal fresco. O EPA, C8:0 e C12:0 foram dissolvidos em etanol. TNF- α e dexametasona foram dissolvidos em água ultrapura e IBMX foi dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO). Todos os tratamentos foram preparados em soluções estoque 1000 vezes maiores que aquelas adicionadas ao meio de cultivo. As células controle foram tratadas com 0,1% de etanol, correspondendo à mesma quantidade dos tratamentos adicionados ao meio. Ao final do processo de diferenciação, efetuou-se a avaliação da incorporação de lipídios, utilizando-se o método Oil Red-O (Moreno-Aliaga and Matsumura 1999). O processo de diferenciação foi acompanhado visualmente, utilizando-se microscópio óptico.

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a incorporação de lipídios utilizou-se o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado. O número de repetições foi diferente para cada tratamento, implicando em delineamento desbalanceado, no qual foi assumido um número mínimo de 3 repetições. O efeito significativo dos fatores foi verificado por meio do teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$) e uma vez comprovada tal significância as médias dos níveis de cada fator foram

comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Todas as análises foram conduzidas no software SAS® versão 9.1 (SAS Institute Inc 2002).

De forma geral, os resultados demonstraram efeito não significativo dos tratamentos sobre a incorporação de lipídios, em relação controle (etanol) (Figura 3.1 A, B, C), uma vez que a única significância foi observada para C12:0 a 1mM na adipogênese espontânea (Figura 3.1 A). Assim, a partir dessas análises optou-se por utilizar as seguintes concentrações: EPA a 100 e 200 μ M, C8:0 a 250 μ M e C12:0 a 250 μ M. As concentrações rejeitadas não promoveram alterações no fenótipo celular ou foram avaliadas visualmente como tóxicas às células. A dose de TNF α a 10 ng/mL foi considerada alta, uma vez que as células apresentaram um comportamento apoptótico. Assim, optou-se por utilizar a dose de 5 ng/mL de TNF α .

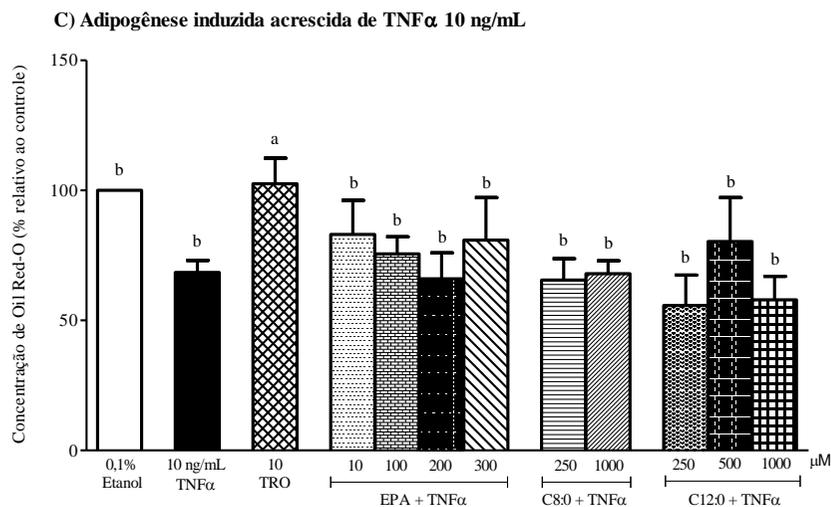
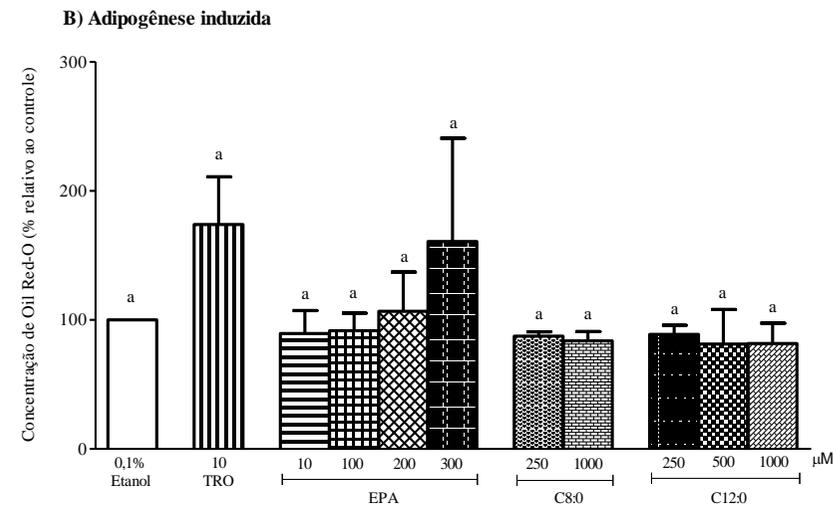
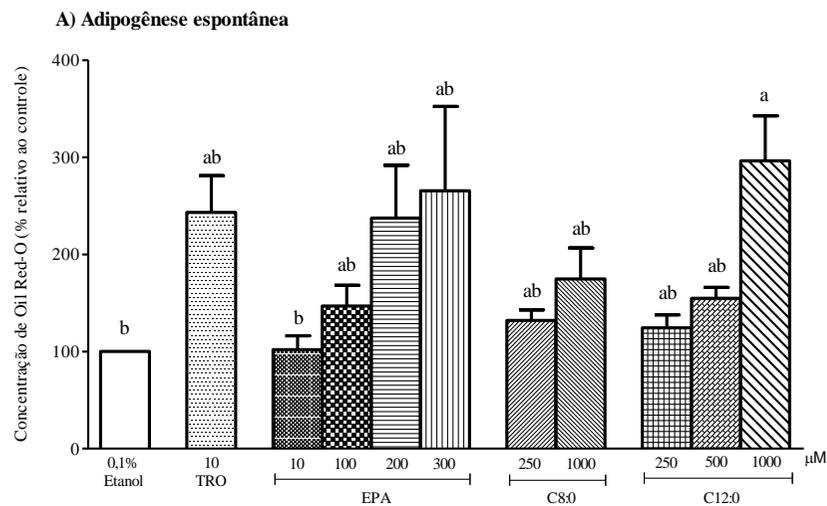


Figura 3.1: Efeito de diferentes tratamentos sobre a concentração de Oil Red-O em adipócitos, em relação ao controle (Etanol) ajustado a 100%. A) Amostras tratadas sem adição de coquetel de hormônios (adipogênese espontânea); B) Tratamentos acrescidos de coquetel de hormônios (adipogênese induzida); C) Amostras tratadas com hormônios (adipogênese induzida), em presença de Fator de necrose tumoral alfa (TNF α). EPA: Ácido eicosapentaenóico; TRO: Troglitazona. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade.

4. CAPÍTULO 2

EFEITO DO ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO SOBRE FATORES REGULADORES DA ADIPOGÊNESE EM CÉLULAS 3T3-L1

4.1. Introdução

O tecido adiposo é um órgão que desempenha um importante papel na regulação da homeostase energética e no metabolismo dos ácidos graxos no organismo (Bays, González-Campoy et al. 2008). Em situações de oferta excessiva de calorias o tecido adiposo estoca os ácidos graxos livres na forma de triacilgliceróis, os quais são utilizados como fonte energética em situações de déficit de calorias (Bays, González-Campoy et al. 2008; Galic, Oakhill et al. 2010). Esse tecido é capaz de produzir peptídeos bioativos (adipocinas), como o fator de necrose tumoral α (TNF α), além de diversos receptores para os hormônios sistêmicos (Kershaw and Flier 2004; Fonseca-Alaniz, Takada et al. 2007). A hipertrofia do adipócito e o acúmulo do tecido adiposo visceral têm sido associados às doenças relacionadas à síndrome metabólica, na qual a obesidade parece ser o pivô (Alberti, Zimmet et al. 2006; Bays, González-Campoy et al. 2008). Dessa forma, a compreensão da diferenciação adipocitária e do metabolismo lipídico é crucial para o entendimento da obesidade.

A linhagem celular 3T3-L1 é amplamente utilizada para o estudo *in vitro* da adipogênese, pois essas células são capazes de se diferenciarem em adipócitos maduros (Ntambi and Young-Cheul 2000; Fève 2005), uma vez estimuladas por hormônios. Classicamente, utilizam-se insulina, dexametasona e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) para induzir o processo de diferenciação (Gregoire 2001). Ao final da diferenciação, essas células se assemelham aos adipócitos encontrados no tecido adiposo branco, no que condiz aos aspectos morfológicos, como acúmulo de triacilgliceróis, e moleculares, como a expressão gênica (Kato, Ozaki et al. 2007).

Por outro lado, nos últimos anos tem-se verificado que os ácidos graxos são os principais reguladores biológicos, estimulando a produção de diferentes tipos de adipocinas, dependendo do tipo de ácido graxo envolvido (Deckelbaum, Worgall et al. 2006; Lee, Kwun et al. 2008). Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da série n-3 representam uma classe de ácidos graxos, na qual o ácido alfa-linolênico (AAL;

C18:3 n-3), essencial ao organismo humano, é o precursor para a síntese de importantes compostos, como o ácido eicosapentaenóico (EPA; – C20:5 n-3) e docosahexaenóico (DHA; C22:6 n-3) (Robinson, Buchholz et al. 2007). A conversão de AAL em EPA é muito baixa, sendo de 0,2 a 6%, e em DHA essa taxa é de apenas 0,05% (Burdge and Calder 2006; Goyens, Spilker et al. 2006). Estudos envolvendo humanos e animais sugerem que os AGPI n-3, em especial o EPA, desempenham uma atividade antiobesidade (Fernandez-Real, Vendrell et al. 2005; Hernandez-Morante, Milagro et al. 2007; Pérez-Echarri, Pérez-Matute et al. 2008), estimulando a β -oxidação e reprimindo a síntese de lipídios (Al-Hasani and Joost 2005). No presente estudo, verificou-se que o EPA desempenhou uma atividade proadipogênica em células 3T3-L1 e é capaz de regular a expressão de mRNA de genes envolvidos na adipogênese. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito regulatório do ácido eicosapentaenóico sobre a adipogênese em células 3T3-L1.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Cultivo celular

Fibroblastos 3T3-L1 (passagens 3 a 11) foram comprados da American Type Culture Collection (Rockville, MD). As células foram cultivadas até a confluência em meio composto por: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a 4,5 g/L de glicose (Invitrogen GIBCO), 10% v/v de Calf Serum Bovine (Invitrogen GIBCO), 100 unidades/mL de penicilina (Invitrogen GIBCO) e 100 μ g/mL de estreptomicina (Invitrogen GIBCO). Após a confluência (dia zero – D0), os preadipócitos foram divididos em três grupos experimentais: A) meio basal (DMEM e antibióticos, como o anterior, porém contendo 10% v/v de Fetal Bovine Serum) suplementado com coquetel de hormônios (1 μ M de dexametasona, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina – IBMX e 10 μ g/mL de insulina); B) meio basal suplementado com hormônios, acrescido de TNF- α (5 ng/mL; Sigma-Aldrich) e C) meio basal sem adição de hormônios indutores da diferenciação celular. Brevemente, as células foram cultivadas por 48 horas (D1 e D2) em meio basal, suplementado ou não com coquetel de hormônios (Figura 4.1). Posteriormente, as células foram cultivadas em meio basal em presença ou ausência de insulina (10 μ g/mL), durante 48 horas (D3 e D4). Após esse período, as células foram cultivadas em meio basal, porém sem insulina, até o dia 7 (D7) ou 9 (D9). Entre D7 e D9 as células apresentavam fenótipo de

adipócitos. Durante todo o processo as células foram mantidas a 37° C e em atmosfera de 5% de CO₂. Nos dias D0, D2, D4, D6 e D8 os preadipócitos foram tratados com 0,1% de Etanol (controle) ou com os compostos testados: 10 µM de Troglitazona (Cayman Chemical), 100 ou 200 µM de EPA (Cayman Chemical). Foram congeladas amostras de células (D1, D2, D4 e D8 de diferenciação) para posterior análise de expressão gênica (Figura 4.1). A avaliação da incorporação de lipídios foi realizada em D7 e em D9 (Figura 4.1).

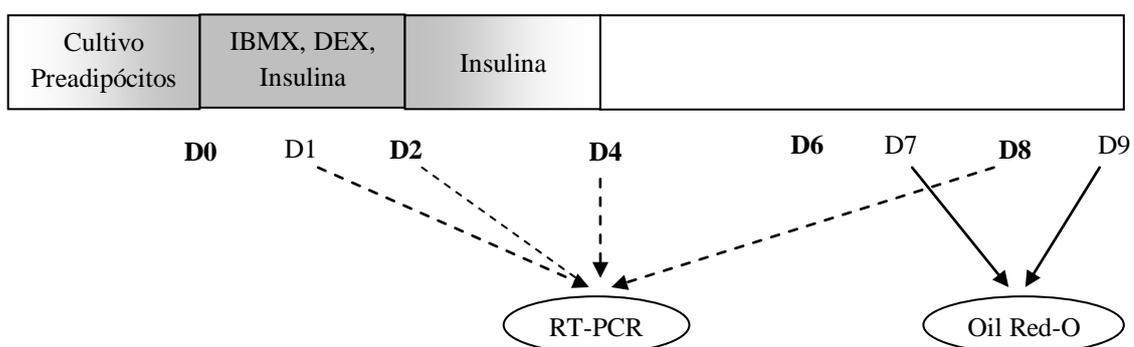


Figura 4.1: Desenho experimental. IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina; DEX: dexametasona; D: dias de diferenciação. Suplementação com coquetel de hormônios não se aplica ao estudo de adipogênese espontânea. Dias em destaque representam a adição de tratamento e troca de meio de cultivo.

4.2.2. Oil Red-O

A avaliação da incorporação de lipídios foi realizada ao final de 7 dias de diferenciação para os grupos tratados com hormônios e ao final de 9 dias para o grupo em ausência de hormônios. As células foram coradas com Oil Red-O (Sigma-Aldrich) (Moreno-Aliaga and Matsumura 1999). As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixadas com formaldeído a 3,7% em PBS por 1 hora. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com água destilada e secas em temperatura ambiente. Então, as células foram coradas com Oil Red-O (6 partes de Oil Red-O saturado a 0,3% em isopropanol e 4 partes de água) durante 15 minutos. O excesso de corante foi removido e as células foram lavadas com etanol a 70%, por 5 ou 6 vezes. Então, as células coradas foram lavadas com água e secas a temperatura ambiente. Foram feitas fotos das células coradas a 100x de ampliação. Após, realizou-se a quantificação do corante por espectrofotometria, dissolvendo as partículas de lipídios coradas com ICEPAL a 4% em isopropanol, durante 5 minutos. A absorbância foi medida a 520 nm.

4.2.3. Real Time PCR

Avaliou-se a expressão gênica de amostras coletadas nos dias D1, D2, D4 e D8 de diferenciação. O RNA total foi extraído utilizando o método TRIzol®, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen). A concentração e qualidade do RNA foi verificada mediante a absorbância a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Um total de 2 µg foram retrotranscritos a cDNA, por meio de transcriptase reversa MMLV (Moloney-murine-leukaemia vírus; Invitrogen), obedecendo as seguintes condições: 10 minutos a 25° C, 50 minutos a 37° C e 15 minutos a 70° C. Utilizou-se Real Time PCR para avaliar a expressão dos seguintes genes (Tabela 5.1): C/EBP-alfa, C/EBP-beta, C/EBP-delta (exceto em D8), DLK-1 (Pref-1), PPAR-gama e WNT10b. O gene Ppia (Ciclofilina) foi escolhido como referência (*housekeeping*) para normalizar os níveis de expressão gênica entre das amostras analisadas. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System, versão 2.3

(Applied Biosystems, Foster City, California USA). As modificações da expressão de mRNA foram avaliadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001).

4.2.4. Análise estatística

Para avaliar o efeito da incorporação de lipídios utilizou-se teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O número de repetições foi diferente para cada tratamento, sendo no mínimo 6 por tratamento, implicando em delineamento desbalanceado. Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a expressão de mRNA durante a adipogênese utilizou-se o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado em esquema fatorial 8Tx6Px4D, sendo “T” tratamento, “P” *primer* e “D” tempo. Neste último delineamento, o número de repetições também foi diferente para cada fator, implicando em delineamento desbalanceado, no qual foi assumido um número mínimo de 3 repetições. O efeito significativo dos fatores foi verificado por meio do teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$) e uma vez comprovada tal significância as médias dos níveis de cada fator foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas no software SAS® versão 9.1 (SAS Institute Inc 2002), por meio do procedimento GLM (*General Linear Model*). Uma vez realizada a ANOVA e obtidas as médias de interesse, as trajetórias longitudinais de cada tratamento de cada *primer* foram estudadas mediante análise de agrupamento (análise de *cluster*), cujo objetivo residiu em agrupar tratamentos de trajetórias semelhantes. Para tanto, foi utilizado o procedimento *Cluster* software SAS® (SAS Institute Inc 2002), por meio do método centróide. Como complemento dessa análise, utilizou-se o procedimento *Tree* do SAS® (SAS Institute Inc 2002), com objetivo de visualizar o dendograma e verificar quais tratamentos pertenciam aos diferentes grupos.

Tabela 4.1: Genes analisados (TaqMan® Gene Expression Assays; Applied Biosystems)

Sigla	Nome	Assay
C/EBP-alfa	Proteína alfa estimuladora de ligação a CCAAT	Mm00514283_s1
C/EBP-beta	Proteína beta estimuladora de ligação a CCAAT	Mm00843434_s1
C/EBP-delta	Proteína delta estimuladora de ligação a CCAAT	Mm00514291_s1
Ciclofilina - Ppia	Peptidil-prolil isomerase A	Mm02342430_g1
DLK-1	Delta-like 1 homolog (Drosophila) – Fator preadipogênico (Pref-1)	Mm00494477_m1
PPAR-gama	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama	Mm00440945_m1
WNT10b	Wingless related MMTV integration site 10b	Mm00442104_m1

4.3. Resultados

EPA em ausência de coquetel de hormônios induz a adipogênese

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a adipogênese espontânea foi realizada de acordo com a concentração do corante Oil Red-O, nove dias posconfluência. De acordo com os resultados, verificou-se uma potente indução da adipogênese em preadipócitos tratados com troglitazona e EPA 200 µM, os quais apresentaram um incremento ($p < 0,05$) de 143% e 137%, respectivamente, do conteúdo lipídico, em relação ao controle (etanol; 100%) (Figura 4.2 A). O tratamento com EPA 100 µM também apresentou uma resposta proadipogênica, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle (Figura 4.2 A). As microfotografias apresentadas na Figura 4.3 (A,D,F,H) confirmam esse efeito.

EPA em presença de coquetel de hormônios não apresentou efeito adipogênico e não reverteu o efeito antiadipogênico do TNFα

Os preadipócitos 3T3-L1 foram cultivados em meio acrescido de hormônios indutores da diferenciação celular (IBMX, dexametasona e insulina), suplementado ou não com TNFα. Após sete dias de tratamento, os resultados da incorporação de

lipídios demonstraram que as células tratadas com EPA (100 ou 200 μ M), em ausência de TNF α , não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) do tratamento controle (dados não apresentados). Em relação às células tratadas com EPA, acrescido de TNF α , observou-se um efeito inibitório da adipogênese em relação ao controle, porém não estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Figura 4.2 A). As microfotografias apresentadas na Figura 4.3 (G e I) confirmam esse efeito. Por outro lado, os cotratamentos de troglitazona e TNF α e de EPA e TNF α apresentaram menor incorporação de lipídios, quando comparados aos respectivos tratamentos sem acréscimo de TNF α (Figura 4.2 A).

Os cotratamentos das doses de EPA com TNF α não apresentaram efeito estatisticamente significativo em relação ao TNF α , ajustado a 100% (Figura 4.2 B). A comparação entre as células tratadas com troglitazona e TNF α e o controle (Figura 4.2 A) demonstrou uma redução, não significativa, do conteúdo lipídico. Entretanto, quando comparado ao TNF α ajustado a 100% (Figura 4.2 B) observou-se que o cotratamento de troglitazona e TNF α apresentou um incremento de 59% ($p<0,05$) no conteúdo lipídico.

EPA regula a expressão de mRNA de fatores transcricionais da adipogênese

Este estudo avaliou a regulação da adipogênese, por meio da expressão de mRNA de genes supressores (DLK1 e WNT10b), iniciadores (C/EBP β e δ) e terminais (PPAR γ e C/EBP α) da diferenciação celular. Os resultados demonstraram que os tratamentos testes, bem como os cotratamentos com TNF α , não demonstraram efeitos estatisticamente diferentes ($p>0,05$) na expressão de DLK1 e de WNT10b no período inicial da diferenciação celular, D1 e D2 (Tabela 4.2). Entretanto, as doses de EPA testadas, acrescidas de TNF α , estimularam ($p<0,05$) a expressão dos genes supressores no dia 4 da diferenciação celular. Ainda, observa-se, em D4, que as células tratadas com EPA, acrescido de TNF α , apresentaram maior estimulação ($p<0,05$) para a expressão de DLK1 e WNT10b, em relação às células tratadas somente com EPA. A Figura 4.4 demonstra que, ao longo da diferenciação celular, o tratamento com troglitazona promoveu a supressão dos genes repressores, embora esse efeito não tenha sido estatisticamente significativo ($p>0,05$), em relação ao controle (Tabela 4.2). O cotratamento de troglitazona e TNF α desempenhou uma tendência para a inibição dos genes repressores, sendo estatisticamente menor

($p < 0,05$) frente ao controle, em D4 para o gene DLK1 ($0,40 \pm 0,03$) e em D8 para o gene WNT10b ($0,34 \pm 0,12$). No que condiz à expressão de mRNA de genes iniciadores da diferenciação celular, observa-se que as doses de EPA a 100 μM e 200 μM induziram significativamente ($p < 0,05$) a expressão de mRNA de C/EBP β em D1 e D2, respectivamente (Tabela 4.2). Entretanto, em D4, essas doses inibiram significativamente a expressão desse gene (EPA 100 μM : $0,23 \pm 0,01$; EPA 200 μM $0,34 \pm 0,05$). As doses de EPA promoveram a inibição ($p < 0,05$) da expressão de mRNA de C/EBP δ nos dias 1 e 4. De forma semelhante, o tratamento com troglitazona inibiu ($p < 0,05$) a expressão de mRNA dos genes iniciadores da diferenciação (C/EBP β e δ) em D4 (Tabela 4.2). Por outro lado, o TNF α , bem como seus cotratamentos, induziram significativamente a expressão C/EBP β , em D4, sendo a maior indução exercida pelo EPA 200 μM acrescido de TNF α ($2,04 \pm 0,14$). Ainda, no dia 4, observa-se que os tratamentos, em presença de coquetel adipogênico, estimularam a expressão de C/EBP β , ao passo que esses tratamentos, em ausência de hormônios, inibiram a expressão desse gene (Tabela 4.2). De acordo com a Tabela 4.2, observa-se que os tratamentos, em ausência de TNF α , promoveram um aumento da expressão de mRNA de C/EBP α ao final da diferenciação celular (D8), porém esse efeito foi estatisticamente significativo somente para o tratamento com troglitazona ($4,30 \pm 0,24$; $p < 0,05$). Ainda, quando comparados entre si, os cotratamentos com TNF α desempenharam um efeito inibitório da expressão de C/EBP α , em D8, ao passo que os respectivos tratamentos sem adição de TNF α estimularam a expressão desse gene (Figura 4.4). Em relação à expressão de mRNA de PPAR γ , verificou-se, em D8, um efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) exercido pelo TNF α ($0,16 \pm 0,01$), bem como pelos cotratamentos de TNF α com EPA 100 μM ($0,10 \pm 0,04$) e EPA 200 μM ($0,11 \pm 0,03$). De uma forma geral, o TNF α e seus cotratamentos, ao longo da diferenciação celular, inibiram a expressão de PPAR γ (Figura 4.4). Por outro lado, os tratamentos com troglitazona e EPA 200 μM , em D4, e EPA 100 μM , em D8, estimularam a expressão de PPAR γ , porém não de forma significativa ($p > 0,05$).

Na análise de agrupamento (Quadro 4.1), os genes foram classificados, de acordo com suas características: repressores (DLK1 e WNT10b), iniciadores (C/EBP δ e β) e terminais (C/EBP α e PPAR γ). Os efeitos dos tratamentos foram reunidos em três *clusters* para cada gene (Anexos 7.1). Os agrupamentos foram

realizados utilizando-se as médias das expressões de mRNA obtidas em D0 a D4 para as classes de genes repressores e iniciadores e de D2 a D8 para os genes terminais. Na análise efetuada para o gene DLK1, observa-se que os tratamentos acrescidos de TNF α , exceto o cotratamento com troglitazona, foram reunidos em um mesmo *cluster*, apresentado uma tendência para a estimulação na expressão desse gene. Os demais *clusters* desempenharam uma tendência de inibição de DLK1. De forma semelhante, verificou-se que os cotratamentos de EPA e TNF α apresentaram uma tendência à estimulação de WNT10b. Em relação aos genes iniciadores, observou-se que os cotratamentos de EPA e TNF α desempenharam uma tendência oposta, estimulando a expressão de C/EBP β e inibindo a expressão de C/EBP δ . Por outro lado, o tratamento com troglitazona e EPA 100 μ M foram incluídos em um mesmo *cluster*, o qual apresentou uma tendência à inibição de C/EBP β e δ . Verificou-se que todos os *clusters* para o gene CEBP α apresentaram uma tendência à estimulação, de acordo com a seguinte ordem: *cluster* C (troglitazona) maior que o *cluster* B, no qual foram incluídos EPA 100 e 200 μ M, e este maior que o *cluster* A, compreendendo o tratamento com TNF α e os cotratamentos com as doses de EPA. Por outro lado, para o gene PPAR γ , verificou-se que os tratamentos com TNF α foram incluídos em um mesmo *cluster*, com desempenho inibitório. O *cluster* B, no qual foram incluídos os tratamentos com EPA a 100 μ M e 200 μ M, não apresentou uma tendência à inibição ou à estimulação.

4.4. Discussão

Este estudo evidenciou que o ácido eicosapentaenóico, em ausência de coquetel de hormônios, desempenha um efeito proadipogênico em células 3T3-L1. O efeito do EPA sobre as funções biológicas dos adipócitos estão relacionados a duas vias principais: a) ativação de genes relacionados à lipogênese e à adipogênese e b) competição com o ácido araquidônico (AA; C20:4 n-6) pela incorporação na membrana fosfolipídica e subsequente conversão em eicosanóides, como prostaglandinas (PG) (Wortman, Miyazaki et al. 2009). O AA e o EPA, por meio da ação de enzimas ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, são convertidos em PG, tromboxanos e leucotrienos da série par e ímpar, respectivamente (Calder 2006; Saldeen and Saldeen 2006; Schmitz and Ecker 2008). Sugere-se que a PGE₂ seja capaz de induzir a lipogênese em adipócitos, aumentando a hipertrofia dessas células

(Wortman, Miyazaki et al. 2009). Em um estudo com fibroblastos NIH 3T3 observou-se que PGE₃, embora mais fracamente, ativa as mesmas vias de sinalização celular que PGE₂ (Bagga, Wang et al. 2003). Por outro lado, Lee et al. (2008) verificaram que o tratamento de 24 horas com 300 µM de EPA, em adipócitos maduros 3T3-L1, promoveu a redução do acúmulo lipídico, por estimulação da lipólise. Em um estudo com cultivo primário de adipócitos, isolados de ratos *Wistar*, observou-se que o EPA (200 µM) estimulou a captação e oxidação de glicose, além de diminuir a lipogênese e promover uma indução (não significativa) da lipólise, após 96 horas de incubação (Perez-Matute, Marti et al. 2005).

O presente estudo também evidenciou que a incubação de EPA a 100 ou 200 µM, em presença de hormônios adipogênicos, não promoveu alterações na incorporação de lipídios (dados não apresentados). Tanabe et al. (2008) também não verificaram efeito adipogênico do EPA a 100 µM em presença de coquetel de hormônios. Esses resultados contraditórios sugerem que o EPA pode desencadear diferentes efeitos em tratamentos agudos e crônicos, bem como em presença ou ausência de hormônios indutores da diferenciação celular.

Este estudo mostrou que o EPA acrescido de TNFα não alterou o efeito antiadipogênico dessa citocina (Figura 4.2 B). O TNFα promove a ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez leva à fosforilação de perilipina, uma proteína que reveste a vesícula de lipídios dos adipócitos, aumentando a lipólise (Zhang, Halbleib et al. 2002; Tai and Ding 2010). Sugere-se que o efeito lipolítico do EPA seja via TNFα, diminuindo a concentração de perilipina (Tai and Ding 2010). Entretanto, em humanos, estudos transversais e clínicos sugerem que o consumo de AGPI n-3 está inversamente relacionado aos níveis plasmáticos de TNFα (Lopez-Garcia, Schulze et al. 2004; Zampelas, Panagiotakos et al. 2005; Micallef and Garg 2009), bem como dos receptores 1 e 2 dessa citocina (Pischon, Hankinson et al. 2003). Em animais, a suplementação da dieta com EPA reduziu os níveis de mRNA para TNFα (Perez-Matute, Perez-Echarri et al. 2007) e Sierra *et al.* (2008) relataram que a suplementação da dieta de camundongos, durante 3 semanas, com EPA, mas não com DHA, reduziu a produção dessa citocina em macrófagos. Em estudos *in vitro*, verificou-se que a incubação com EPA bloqueou a secreção de TNFα em células endoteliais (Wang, Lim et al. 2008) e em macrófagos (Mickleborough, Tecklenburg et al. 2009). Esses estudos sugerem que, por um lado a presença de EPA

leva à diminuição da secreção e expressão de TNF α , mas que por outro lado esse ácido graxo potencializa os efeitos dessa citocina.

No que condiz à expressão de mRNA este estudo revelou que o EPA é capaz de regular a expressão de genes envolvidos na adipogênese. A expressão de DLK1 está aumentada em preadipócitos e diminui drasticamente durante a adipogênese, devido ao efeito da dexamentasona (Sul, Smas et al. 2000). De acordo com Boney et al. (1996) o TNF α não demonstrou ser um potente estimulador de DLK1. Entretanto, este estudo mostrou que, diferentemente do tratamento somente com TNF α , os cotratamentos de EPA com TNF α estimularam significativamente a expressão de mRNA de DLK1 no quarto dia após a confluência (Tabela 4.2). Esse cotratamento também estimulou a expressão de WNT10b no quarto pós confluência. Sabe-se que o TNF α estimula a expressão de WNT10b (Hammarstedt, Isakson et al. 2007), porém o EPA potencializou significativamente esse efeito (Tabela 4.2). As análises de *cluster* (Quadro 4.1) confirmam que os cotratamentos das doses de EPA e TNF α estimulam a expressão de DLK1 e WNT10b. Os efeitos do EPA sobre a expressão desses genes repressores sugerem um efeito antiadipogênico desse ácido graxo, potencializando a ação do TNF α . Diferentemente, a troglitazona, bem como seu cotratamento com TNF α , reduziu a expressão de mRNA dos genes repressores.

Este estudo mostrou que a dose de 100 μ M de EPA, em ausência de coquetel adipogênico, inibiu a expressão de C/EBP β e δ até quarto dia de diferenciação (Tabela 4.2). Entretanto, o EPA a 200 μ M estimulou a expressão de mRNA de C/EBP β (D2) e inibiu a expressão de C/EBP δ . Tanabe et al. (2008) não observaram efeito significativo na expressão C/EBP β e δ em células 3T3-L1 incubadas por 3 horas com 100 μ M de EPA, em presença de coquetel adipogênico. Os cotratamentos de EPA com TNF α estimularam a expressão de C/EBP β , porém não apresentaram efeitos significativos sobre C/EBP δ . Esse efeito foi estatisticamente maior que a estimulação de mRNA de C/EBP β exercida pelo TNF α . Entretanto, estudos prévios sugerem que o TNF α não suprime a expressão de C/EBP β e δ (Cawthorn and Sethi 2008). Na análise de *cluster* o TNF α e seus cotratamentos com EPA foram incluídos em um mesmo grupo, sugerindo uma similaridade dos efeitos (Quadro 4.1). Em conjunto, esses resultados sugerem que o EPA possa estimular a expressão de C/EBP β , independentemente da ação do TNF α , uma vez que o mesmo efeito foi observado em presença ou ausência dessa citocina. A incubação com troglitazona

acrescida de TNF α apresentou um feito mais importante na expressão de C/EBP β , em relação ao efeito exercido pela troglitazona, em ausência de coquetel de hormônios. Esse efeito pode ser explicado pela expressão de C/EBP β ser dependente de dexametasona, em células 3T3-L1 (Tomlinson, Boudreau et al. 2006).

Estudos prévios sugerem que os AGPI n-3 sejam capazes de estimular a expressão de PPAR γ e C/EBP α (Takahashi, Tsuboyama-Kasaoka et al. 2002; Tai and Ding 2010). Entretanto, o presente estudo verificou que a incubação com EPA, em ausência de coquetel de hormônios, estimulou fracamente a expressão desses genes ($p > 0,05$). Lorente-Cebrián et al. (2006), em um estudo com cultivo primário de adipócitos de ratos *Wistar*, verificaram inibição da expressão de mRNA de PPAR γ após incubação dessas células com 100 ou 200 μ M de EPA, durante 96 horas. Lee et al. (2008) verificaram que o tratamento de 24 horas com 300 μ M de EPA, em adipócitos maduros 3T3-L1 reduziu a expressão de mRNA de PPAR γ em aproximadamente 53%. Ainda, Tanabe et al. (2008), em um estudo com 3T3-L1, verificaram que 100 μ M de EPA inibiu a expressão de mRNA de PPAR γ , porém o mesmo efeito não foi observado na expressão de C/EBP α . Por outro lado, verificou-se que o TNF α , bem como seus cotratamentos, inibiram a expressão de C/EBP α e PPAR γ , sendo estatisticamente significante somente para PPAR γ (Tabela 4.2). Outros estudos mostraram o efeito supressor do TNF α sobre a expressão de PPAR γ e C/EBP α (Guilherme, Tesz et al. 2009; Tai and Ding 2010). Em relação ao efeito da troglitazona, em ausência de coquetel de hormônios, este estudo verificou um estímulo à expressão de mRNA de PPAR γ e C/EBP α , sendo estatisticamente significante somente para este último. De forma semelhante, Lorente-Cebrián et al. (2006) observaram que a incubação com troglitazona (10 μ M) induziu a expressão de PPAR γ . De acordo com a análise de *cluster* os cotratamentos com TNF α , exceto com troglitazona, estimulam a expressão de C/EBP α e inibem a expressão de PPAR γ (Quadro 4.1).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o EPA, em ausência de coquetel de hormônios, induz a diferenciação de preadipócitos 3T3-L1, porém sem alterar significativamente a expressão de genes transcripcionais da adipogênese. Por outro lado, em adipogênese induzida, o EPA acrescido TNF α não foi capaz de alterar o conteúdo lipídico. Entretanto, a análise da expressão gênica sugere um efeito antiadipogênico desse ácido graxo, possivelmente potencializando a ação do TNF α

para os genes DLK1, WNT10b, C/EBP α e PPAR γ e de forma independente ao TNF α para expressão dos genes C/EBP β e δ .

4.5. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo “Ministerio de Educación y Ciencia” (AGL 2006-04716/ALI) da Espanha e pela “Línea Especial – Nutrición, Obesidad y Salud” (LE/97) da “Universidad de Navarra”, Espanha. A. G. V. Costa foi financiado por bolsa de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (201834/2008-1) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Ministério de Educação do Brasil.

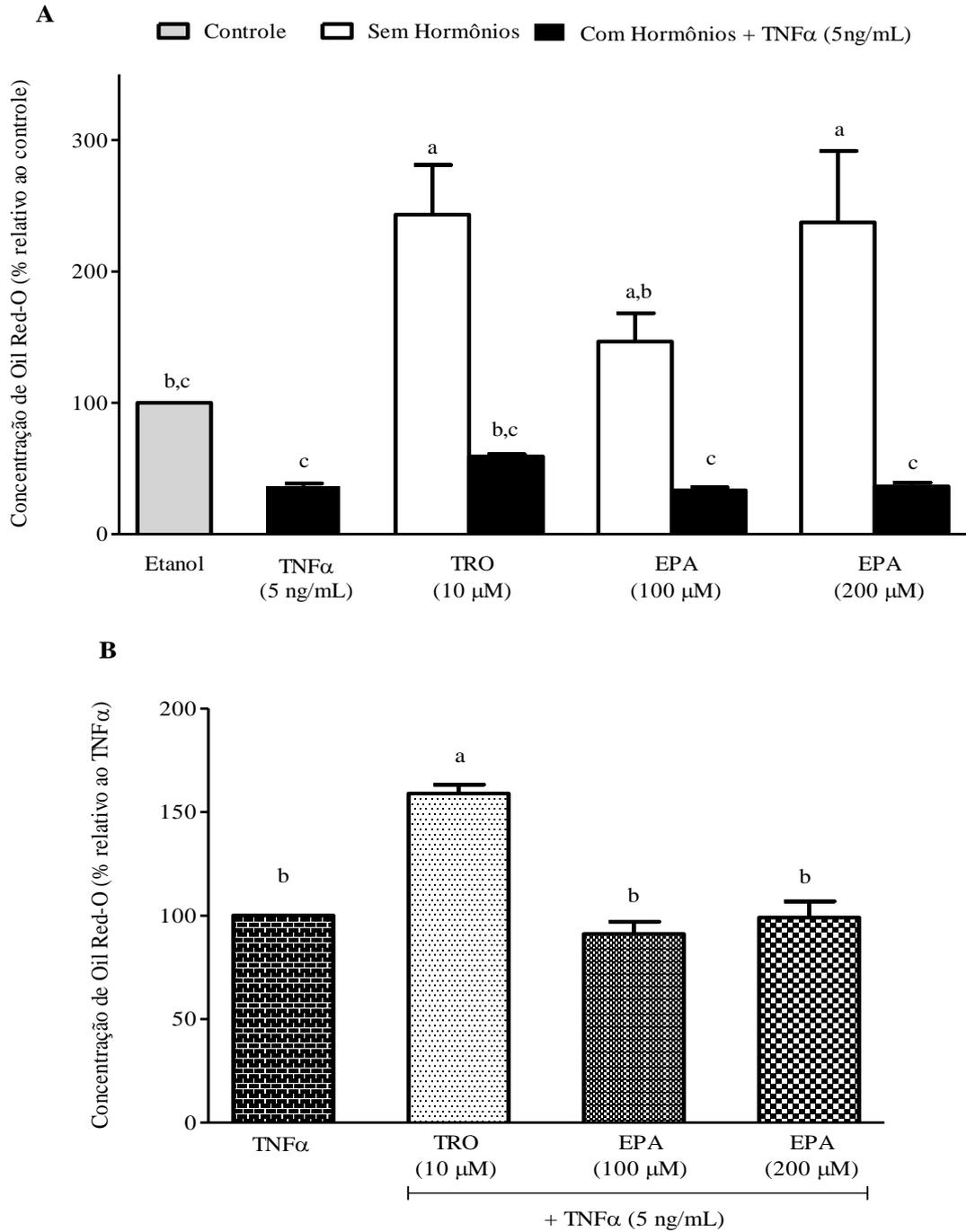


Figura 4.2: Efeito de diferentes tratamentos sobre a concentração de Oil Red-O em adipócitos. EPA: Ácido eicosapentaenóico; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona. A) Análise relativa ao controle (Etanol, ajustado a 100%), em experimentos independentes. B) Análise relativa ao TNF α , ajustado a 100%. EPA: Ácido eicosapentaenóico. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

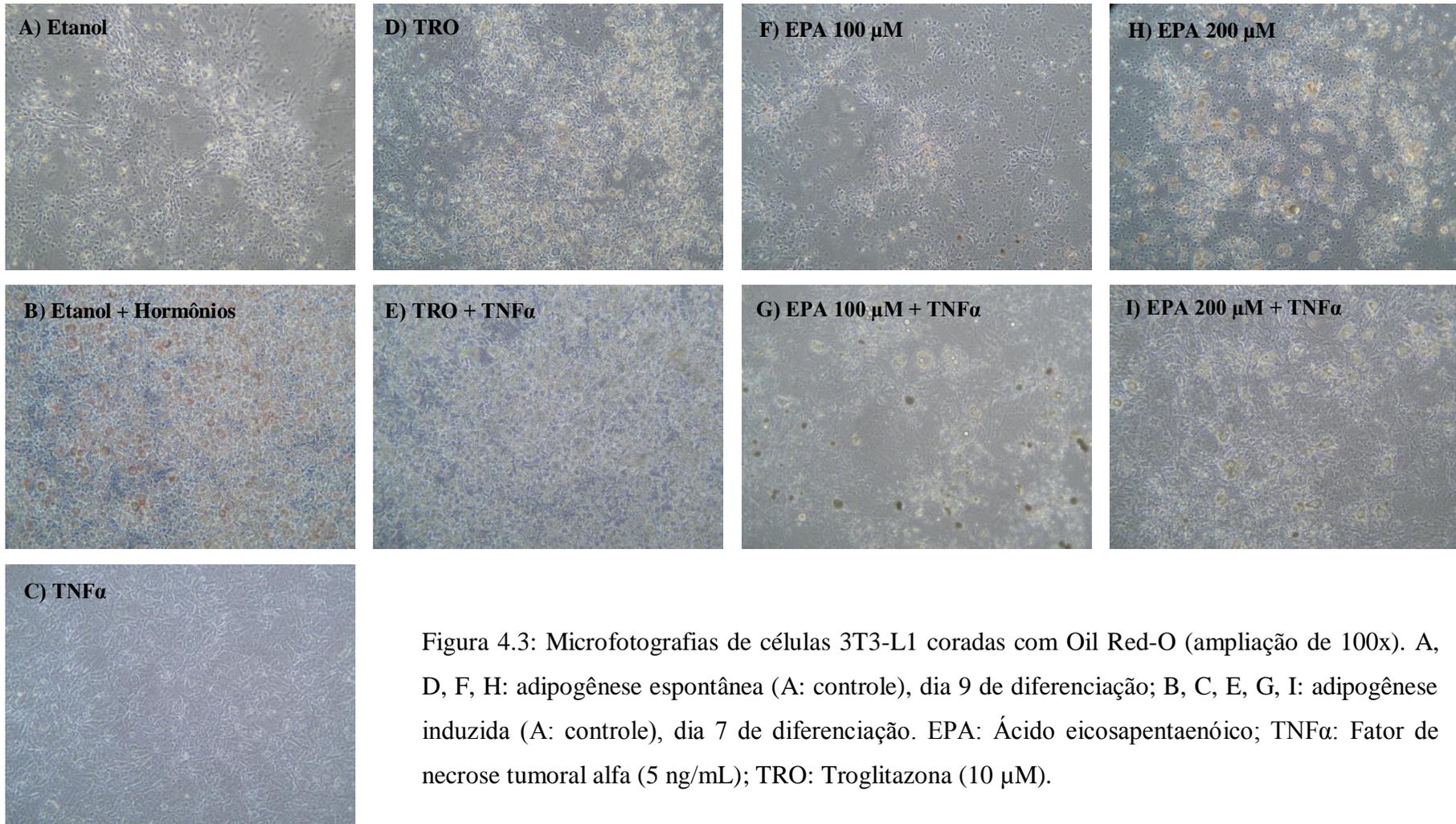


Figura 4.3: Microfotografias de células 3T3-L1 coradas com Oil Red-O (ampliação de 100x). A, D, F, H: adipogênese espontânea (A: controle), dia 9 de diferenciação; B, C, E, G, I: adipogênese induzida (A: controle), dia 7 de diferenciação. EPA: Ácido eicosapentaenóico; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa (5 ng/mL); TRO: Troglitazona (10 μ M).

Tabela 4.2: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os níveis de mRNA de genes reguladores da adipogênese

	CEBP alfa				CEBP beta				CEBP delta			
	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8
Etanol	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^{b,c} ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^{b,c} ± 0,00	1,00 ^c ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^{a,b,c} ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	-
TNFα	0,42 ^b ± 0,02	0,44 ^{a,b} ± 0,02	0,42 ^{b,c} ± 0,05	0,09 ^c ± 0,02	1,07 ^b ± 0,05	1,07 ^{b,c} ± 0,08	1,48 ^b ± 0,03	1,02 ^b ± 0,03	1,25 ^{a,b} ± 0,05	1,29 ^a ± 0,08	0,66 ^{a,b} ± 0,04	-
TRO	0,54 ^{a,b} ± 0,07	0,71 ^{a,b} ± 0,55	0,76 ^{a,b} ± 0,32	4,30 ^a ± 0,24	1,20 ^{a,b} ± 0,23	0,92 ^{b,c} ± 0,21	0,40 ^d ± 0,20	1,33 ^b ± 0,19	0,78 ^c ± 0,20	0,76 ^{a,b} ± 0,26	0,39 ^b ± 0,08	-
TRO + TNFα	0,66 ^{a,b} ± 0,04	0,93 ^a ± 0,06	1,18 ^a ± 0,44	1,53 ^b ± 0,25	1,53 ^{a,b} ± 0,11	1,14 ^{b,c} ± 0,28	1,51 ^b ± 0,03	1,61 ^b ± 0,17	1,39 ^a ± 0,06	0,70 ^{a,b} ± 0,10	0,71 ^{a,b} ± 0,08	-
EPA 100	0,52 ^{a,b} ± 0,23	0,02 ^b ± 0,00	0,46 ^{b,c} ± 0,13	1,74 ^b ± 0,67	2,08 ^a ± 0,19	0,65 ^c ± 0,13	0,23 ^d ± 0,01	2,69 ^a ± 0,24	0,28 ^{d,e} ± 0,11	0,79 ^{a,b} ± 0,24	0,33 ^b ± 0,10	-
EPA100+TNFα	0,52 ^{a,b} ± 0,18	0,59 ^{a,b} ± 0,15	0,49 ^{b,c} ± 0,12	0,10 ^c ± 0,04	0,94 ^b ± 0,31	1,52 ^{a,b} ± 0,35	1,93 ^a ± 0,11	1,00 ^b ± 0,10	0,82 ^{b,c} ± 0,13	1,22 ^a ± 0,21	0,78 ^{a,b} ± 0,21	-
EPA 200	0,71 ^{a,b} ± 0,24	0,02 ^b ± 0,01	0,05 ^c ± 0,01	1,80 ^b ± 0,18	1,06 ^b ± 0,42	2,09 ^a ± 0,12	0,34 ^d ± 0,05	1,20 ^b ± 0,25	0,12 ^e ± 0,03	0,45 ^b ± 0,14	0,42 ^b ± 0,11	-
EPA200+TNFα	0,48 ^{a,b} ± 0,18	0,42 ^{a,b} ± 0,03	0,58 ^{a,b,c} ± 0,10	0,11 ^c ± 0,03	0,78 ^b ± 0,15	1,22 ^{b,c} ± 0,11	2,04 ^a ± 0,14	1,01 ^b ± 0,09	0,71 ^{c,d} ± 0,09	1,10 ^{a,b} ± 0,11	0,87 ^{a,b} ± 0,28	-

Tabela 4.2: Continua

	PPARgama				DLK1				WNT10b			
	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8
Etanol	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{b,c} ± 0,00	1,00 ^{a,b,c,d} ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{c,d,e} ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00
TNFα	0,72 ^a ± 0,01	0,70 ^b ± 0,02	0,63 ^b ± 0,03	0,16 ^c ± 0,01	0,87 ^a ± 0,02	1,31 ^a ± 0,09	1,47 ^{a,b} ± 0,10	1,55 ^{a,b} ± 0,02	1,21 ^b ± 0,02	1,36 ^a ± 0,08	1,59 ^{c,d,e} ± 0,23	1,05 ^a ± 0,08
TRO	0,95 ^a ± 0,28	0,98 ^{a,b} ± 0,15	2,61 ^a ± 1,38	0,47 ^{b,c} ± 0,17	0,94 ^a ± 0,09	1,30 ^a ± 0,24	1,00 ^{b,c} ± 0,03	0,53 ^{c,d} ± 0,19	2,33 ^a ± 0,29	1,39 ^a ± 0,35	0,77 ^{d,e} ± 0,29	0,45 ^{b,c} ± 0,07
TRO+TNFα	0,88 ^a ± 0,02	0,65 ^b ± 0,04	0,57 ^b ± 0,05	0,69 ^{a,b,c} ± 0,02	0,99 ^a ± 0,03	0,81 ^a ± 0,16	0,40 ^d ± 0,03	0,25 ^d ± 0,07	1,06 ^b ± 0,07	0,77 ^a ± 0,09	0,48 ^e ± 0,06	0,34 ^c ± 0,12
EPA 100	0,66 ^a ± 0,31	1,21 ^a ± 0,25	0,90 ^{a,b} ± 0,08	1,27 ^a ± 0,25	1,01 ^a ± 0,10	0,78 ^a ± 0,03	0,95 ^{c,d} ± 0,01	1,33 ^{a,b,c} ± 0,45	1,21 ^b ± 0,12	1,02 ^a ± 0,21	1,26 ^{b,c,d} ± 0,02	0,72 ^{a,b,c} ± 0,06
EPA100+TNFα	0,78 ^a ± 0,09	0,73 ^b ± 0,13	0,65 ^b ± 0,08	0,15 ^c ± 0,04	0,86 ^a ± 0,27	1,39 ^a ± 0,27	1,62 ^a ± 0,33	1,22 ^{a,b,c} ± 0,06	1,02 ^b ± 0,09	0,85 ^a ± 0,16	2,20 ^a ± 0,30	1,01 ^{a,b} ± 0,24
EPA 200	0,60 ^a ± 0,06	0,77 ^{a,b} ± 0,07	1,22 ^{a,b} ± 0,17	0,84 ^{a,b,c} ± 0,46	0,76 ^a ± 0,11	0,71 ^a ± 0,03	0,88 ^{c,d} ± 0,01	1,76 ^a ± 0,25	1,29 ^b ± 0,12	0,71 ^a ± 0,18	1,68 ^{a,b,c} ± 0,03	0,65 ^{a,b,c} ± 0,18
EPA200+TNFα	0,69 ^a ± 0,15	0,63 ^b ± 0,06	0,62 ^b ± 0,06	0,19 ^c ± 0,04	0,74 ^a ± 0,10	1,10 ^a ± 0,14	1,36 ^a ± 0,17	0,86 ^{c,d} ± 0,04	0,86 ^b ± 0,02	0,98 ^a ± 0,14	1,83 ^{a,b} ± 0,30	0,69 ^{a,b,c} ± 0,14

D: dia de diferenciação; EPA: Ácido eicosapentaenóico; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona. Dados expressos em media \pm erro padrão para cada dia de diferenciação e em cada gene. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

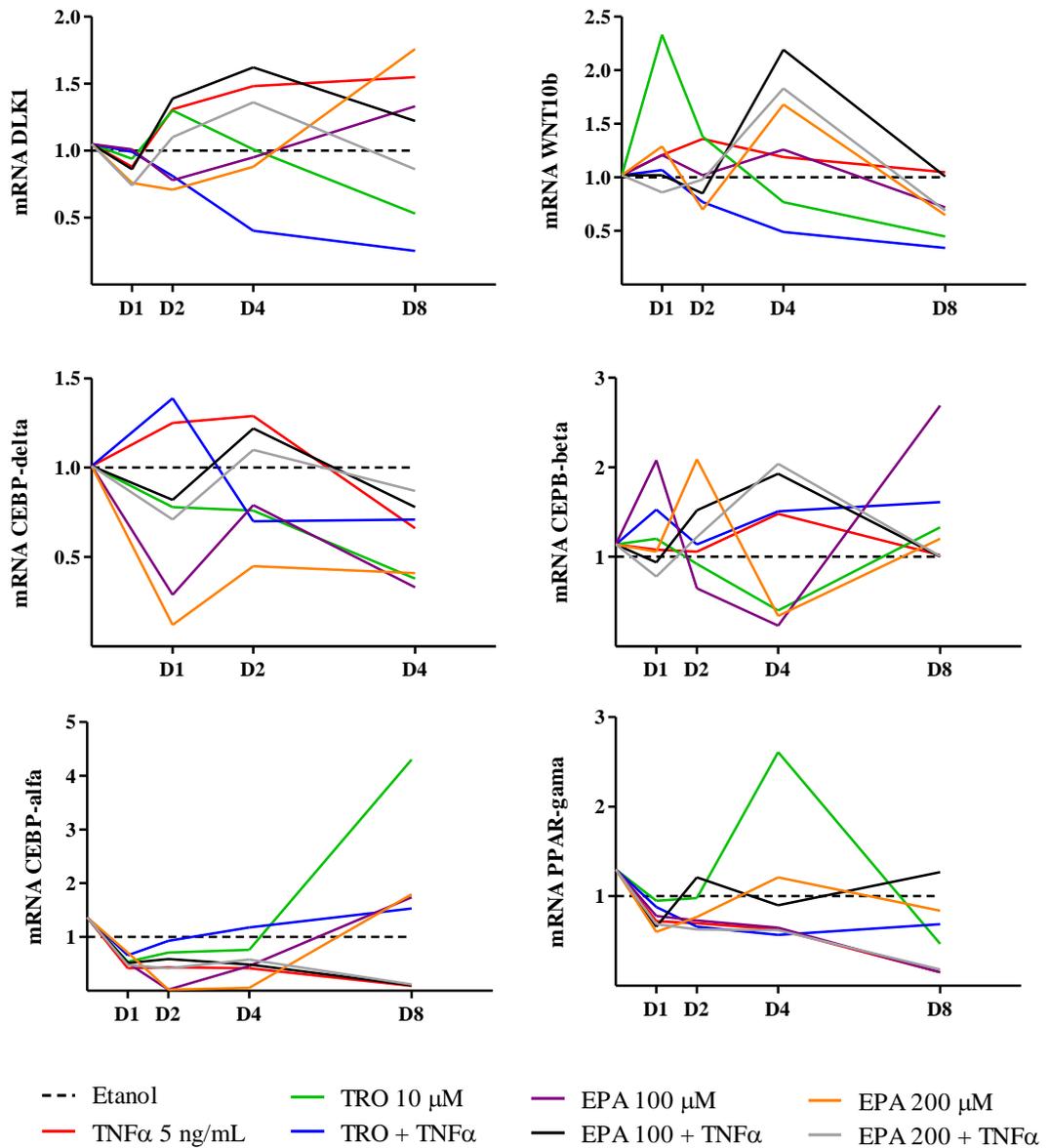


Figura 4.4: Evolução da expressão de mRNA de genes reguladores da adipogênese durante a diferenciação celular em função dos tratamentos. EPA: Ácido eicosapentaenóico; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona.

Quadro 4.1: Análise de *cluster* de tratamentos de acordo com a similaridade na expressão de mRNA em diferentes genes

CLASSE DE GENES REPRESSORES											
DLK1					WNT10b						
Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias			Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias		
			D1	D2	D4				D1	D2	D4
A	TNF α , EPA100+TNF α e EPA200+TNF α	1,05	0,83	1,27	1,49	A	Etanol, EPA100 TNF α e TRO+TNF α	1,01	1,12	1,04	0,98
B	Etanol, EPA100, EPA200, Troglitazona	1,04	0,93	0,95	0,96	B	EPA200 EPA100+TNF α e EPA200+TNF α	1,02	1,06	0,84	1,90
C	TRO+TNF α	1,05	0,99	0,81	0,40	C	Troglitazona	1,02	2,33	1,38	0,77
CLASSE DE GENES INICIADORES											
C/EBP δ					C/EBP β						
Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias			Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias		
			D1	D2	D4				D1	D2	D4
A	Etanol, TNF α , EPA100+TNF α e EPA200+TNF α	1,01	0,94	1,15	0,83	A	Etanol, TNF α , TRO+TNF α , EPA100+TNF α e EPA200+TNF α	1,11	1,07	1,19	1,59
B	EPA100, EPA200 Troglitazona	1,01	0,40	0,67	0,37	B	EPA100 e Troglitazona	1,14	1,64	0,78	0,31
C	TRO+TNF α	1,01	1,39	0,70	0,71	C	EPA200	1,14	1,06	2,09	0,34
CLASSE DE GENES TERMINAIS											
C/EBP α					PPAR γ						
Grupos	Tratamentos	D2	Médias/ Dias			Grupos	Tratamentos	D2	Médias / Dias		
			D4	D8				D4	D8		
A	TNF α , EPA100+TNF α e EPA200+TNF α	0,48	0,50	1,10	A	TNF α , TRO+TNF α EPA100+TNF α e EPA200+TNF α	0,68	0,62	0,29		
B	Etanol, EPA100, EPA200 TRO+TNF α	0,49	0,67	1,52	B	Etanol EPA100 e EPA200	0,99	1,04	1,04		
C	Troglitazona	0,71	0,76	4,30	C	Troglitazona	0,98	2,61	0,47		

EPA100: Ácido eicosapentaenóico a 100 μ M; EPA200: 200 μ M; D: dia de diferenciação; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa (5 ng/mL); TRO: Troglitazona (10 μ M).

4.6. Referências Bibliográficas

Al-Hasani, H. and H. G. Joost (2005). "Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 589-603.

Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. (2006). "Metabolic syndrome--a new world-wide definition: a Consensus Statement from the International Diabetes Federation." Diabet Med **23**(5): 469-480.

Bagga, D., L. Wang, et al. (2003). "Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1751-1756.

Bays, H. E., J. M. González-Campoy, et al. (2008). "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(3): 343-368.

Boney, C. M., F. T. Fiedorek, Jr., et al. (1996). "Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation." Endocrinology **137**(7): 2923-2928.

Burdge, G. C. and P. C. Calder (2006). "Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective." Nutr Res Rev **19**(1): 26-52.

Calder, P. (2006). "n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): S1505-1519.

Cawthorn, W. P. and J. K. Sethi (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology." FEBS Lett **582**(1): 117-131.

Deckelbaum, R. J., T. S. Worgall, et al. (2006). "n-3 fatty acids and gene expression." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): 1520S-1525S.

Fernandez-Real, J. M., J. Vendrell, et al. (2005). "Circulating adiponectin and plasma fatty acid profile." Clin Chem **51**(3): 603-609.

Feve, B. (2005). "Adipogenesis: cellular and molecular aspects." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 483-499.

Fonseca-Alaniz, M. H., J. Takada, et al. (2007). "Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice." J Pediatr (Rio J) **83**(5 Suppl): S192-203.

Galic, S., J. S. Oakhill, et al. (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 129-139.

Goyens, P. L., M. E. Spilker, et al. (2006). "Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio." Am J Clin Nutr **84**(1): 44-53.

Gregoire, F. M. (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 997-1002.

Guilherme, A., G. J. Tesz, et al. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes." J Biol Chem **284**(25): 17082-17091.

Hammarstedt, A., P. Isakson, et al. (2007). "Wnt-signaling is maintained and adipogenesis inhibited by TNFalpha but not MCP-1 and resistin." Biochem Biophys Res Commun **357**(3): 700-706.

Hernandez-Morante, J. J., F. I. Milagro, et al. (2007). "Relationship among Adiponectin, Adiponectin Gene Expression and Fatty Acids Composition in Morbidly Obese Patients." Obes Surg **17**(4): 516-524.

Kato, Y., N. Ozaki, et al. (2007). "H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A." Life Sci **80**(5): 476-483.

Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." J Clin Endocr Metab **89**(6): 2548-2556.

Lee, M. S., I. S. Kwun, et al. (2008). "Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes." Genes Nutr **2**(4): 327-330.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lopez-Garcia, E., M. B. Schulze, et al. (2004). "Consumption of (n-3) Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Activation in Women." J Nutr **134**: 1806-1811.

Lorente-Cebrian, S., P. Perez-Matute, et al. (2006). "Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on adiponectin gene expression and secretion in primary cultured rat adipocytes." J Physiol Biochem **62**(2): 61-69.

Micallef, M. A. and M. L. Garg (2009). "Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals." Atherosclerosis **204**(2): 476-482.

Mickleborough, T. D., S. L. Tecklenburg, et al. (2009). "Eicosapentaenoic acid is more effective than docosahexaenoic acid in inhibiting proinflammatory mediator production and transcription from LPS-induced human asthmatic alveolar macrophage cells." Clin Nutr **28**(1): 71-77.

Moreno-Aliaga, M. J. and F. Matsumura (1999). "Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein- α in 3T3-L1 cells." Molecular Pharmacology **56**(1): 91-101.

Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." J Nutr **130**(12): 3122S-3126S.

Pérez-Echarri, N., P. Pérez-Matute, et al. (2008). "Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats." Br J Nutr: 1-9.

Perez-Matute, P., A. Marti, et al. (2005). "Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(6): R1682-1688.

Perez-Matute, P., N. Perez-Echarri, et al. (2007). "Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha." Br J Nutr **97**(2): 389-398.

Pischon, T., S. E. Hankinson, et al. (2003). "Habitual Dietary Intake of n-3 and n-6 Fatty Acids in Relation to Inflammatory Markers Among US Men and Women." Circulation **108**(2): 155-160.

Robinson, L. E., A. C. Buchholz, et al. (2007). "Inflammation, obesity, and fatty acid metabolism: influence of n-3 polyunsaturated fatty acids on factors contributing to metabolic syndrome." Appl Physiol Nutr Metab **32**(6): 1008-1024.

Saldeen, P. and T. Saldeen (2006). "Omega-3 Fatty acids: structure, function, and relation to the metabolic syndrome, infertility, and pregnancy." Metab Syndr Relat Disord **4**(2): 138-148.

SAS Institute Inc (2002). Version 9.1 SAS Statistical Software. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Schmitz, G. and J. Ecker (2008). "The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids." Prog Lipid Res **47**(2): 147-155.

Sierra, S., F. Lara-Villoslada, et al. (2008). "Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as decosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects." Nutrition **24**(3): 245-254.

Sul, H. S., C. Smas, et al. (2000). "Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 4**: S15-19.

Tai, C. C. and S. T. Ding (2010). "N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention." J Nutr Biochem **21**(5): 357-363.

Tai, C. C. and S. T. Ding (2010). "N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention." The Journal of Nutritional Biochemistry **21**(5): 357-363.

Takahashi, M., N. Tsuboyama-Kasaoka, et al. (2002). "Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR alfa activation and ROS production." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **282**: G338–348.

Tanabe, Y., Y. Matsunaga, et al. (2008). "Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation." J Pharmacol Sci **106**(3): 478-484.

Tomlinson, J. J., A. Boudreau, et al. (2006). "Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids." Endocrinology **147**(11): 5284-5293.

Wang, L., E.-J. Lim, et al. (2008). "The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor [alpha]-induced endothelial cell activation." Metabolism **57**(10): 1328-1339.

Wortman, P., Y. Miyazaki, et al. (2009). "n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes." Nutr Metab (Lond) **6**: 5.

Zampelas, A., D. B. Panagiotakos, et al. (2005). "Fish Consumption Among Healthy Adults Is Associated With Decreased Levels of Inflammatory Markers Related to Cardiovascular Disease: The ATTICA Study." J Am Coll Cardiol **46**(1): 120-124.

Zhang, H. H., M. Halbleib, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP." Diabetes **51**(10): 2929-2935.

5. CAPÍTULO 3

ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA COMO REGULADORES DA ADIPOGÊNESE INDUZIDA E ESPONTÂNEA EM CÉLULAS 3T3-L1

5.1. Introdução

A obesidade é caracterizada pelo aumento dos estoques corporais de lipídios, sendo geralmente associada ao aumento do consumo de lipídios (Kovacs and Mela 2006). O aumento do tecido adiposo envolve a hipertrofia e a hiperplasia de adipócitos (Bays, González-Campoy et al. 2008). Evidências científicas relacionam a obesidade a um processo inflamatório crônico de baixa intensidade, devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a produção anormal de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Browning 2003; Zampelas, Panagiotakos et al. 2005; Calder 2006; Carpentier, Portois et al. 2006; Robinson, Buchholz et al. 2007; Nagao and Yanagita 2008). Assim, o estudo do metabolismo lipídico e da diferenciação adipocitária é crucial para o entendimento da obesidade.

A adipogênese resulta do acúmulo de lipídios nos adipócitos, bem como da formação de novas células a partir de precursores celulares, os preadipócitos (Yang, Della-Fera et al. 2009). A utilização da linhagem celular 3T3-L1, oriundas de embriões de camundongos Swiss 3T3, é ideal para o estudo dos eventos moleculares responsáveis pela conversão de preadipócitos em adipócitos (Ntambi and Young-Cheul 2000). Essas células se diferenciam em adipócitos maduros por meio da suplementação do meio de cultivo com coquetel de hormônios indutores da diferenciação celular (3-isobutil-1-metilxantina, dexametasona e insulina), cujo objetivo é mimetizar o enriquecimento hormonal em estágios iniciais da diferenciação celular (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Yang, Della-Fera et al. 2009). A sequência de eventos da adipogênese envolve a ativação de fatores de transcrição, especialmente a expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-gama), de proteína (α , β e δ) estimuladora de ligação a CCAAT (C/EPB), bem como a inibição de *wingless related MMTV integration site 10b* (WNT10b) e do fator preadipogênico (Pref-1 ou DLK1) (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Fève 2005; Yang, Della-Fera et al. 2009).

Os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são uma classe de lipídios compostos por ácidos graxos de 6 a 12 carbonos. Diferentemente dos ácidos graxos de cadeia longa (mais que 12 carbonos), os TCM são absorvidos pelo trato gastrointestinal de forma mais eficiente e mais rápida, devido ao tamanho da cadeia carbônica, por facilitarem a ação de lipases, por serem mais solúveis em água e por não requererem a formação de quilomícrons (St-Onge 2005; Marten, Pfeuffer et al. 2006; Roynette, Rudkowska et al. 2008; Takeuchi, Sekine et al. 2008). Os TCM podem atingir o tecido adiposo em administração prolongada desses compostos (Marten, Pfeuffer et al. 2006). Além disso, esses compostos sofrem menor ação da acil-CoA sintetase (responsável pela re-esterificação de triacilgliceróis) e não requer a presença da carnitina acil transferase, o que acelera a β -oxidação e limita a estocagem do TCM no tecido (Kovacs and Mela 2006; Marten, Pfeuffer et al. 2006). Estudos sugerem que o ácido octanóico (C8:0) aumentam a diferenciação do adipócitos em presença (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Sanosaka, Minashima et al. 2008) ou em ausência (Yang, Della-Fera et al. 2009) de coquetel adipogênico. Por outro lado, outros estudos sugerem que o octanoato atenua a adipogênese (Guo, Choi et al. 2000; Han, Farmer et al. 2002; Han, Hamilton et al. 2003). Segundo DeLany et al. (2000), o ácido láurico (C12:0) é preferencialmente oxidado em detrimento de outros ácidos graxos saturados e de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. Ding et al. (Ding and Mersmann 2001) verificaram que o C12:0 não apresentou efeitos sobre a diferenciação de adipócitos, de acordo com a coloração por Oil Red-O. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi estudar os efeitos de ácidos graxos cadeia média (C8:0 e C12:0) na regulação da adipogênese espontânea e induzida, em células 3T3-L1, por meio da expressão de fatores transcricionais da adipogênese.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Materiais

Fibroblastos de camundongos 3T3-L1 foram adquiridos da American Type Culture Collection (Rockville, MD). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FSB) e antibióticos foram comprados da Invitrogen GIBCO. Insulina, dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ácido octanóico (C8:0) e Oil Red-O foram da marca Sigma-

Aldrich. O ácido Láurico (C12:0) e Troglitazona foram comprados da Cayman Chemical. Inibidor de ribonuclease (RNAsin® Ribonuclease Inhibitors) foi comprado da Promega. TRIzol, Random *primers*, Desoxi-nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), Buffer 5x (tampão), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) foram adquiridos da Invitrogen. Os *primers* e TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x foram comprados da Applied Biosystems.

5.2.2. Cultivo celular

Preadipócitos 3T3-L1 de passagens 3 a 11 foram cultivados até a confluência como descrito previamente (Moreno-Aliaga and Matsumura 1999). Atingida a confluência (dia zero – D0), as células foram incubadas por 48 horas em meio basal (DMEM a 25 mM de glicose, 10% v/v de FBS, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e divididas em três grupos experimentais (Figura 5.1): A) meio basal suplementado com hormônios indutores de diferenciação (1 µM de dexametasona, 0,5 mM de IBMX e 10 µg/mL de insulina); B) meio basal suplementado com coquetel de hormônios, acrescido de TNF-α (5 ng/mL) ou C) meio basal sem adição de hormônios. Cada grupo experimental recebeu 0,1% de etanol ou uma das seguintes substâncias testadas: Troglitazona (10 µM), C8:0 (250 µM) ou C12:0 (250 µM). No dia 2 (D2) o meio de cultivo foi trocado por um meio basal fresco acrescido de insulina (10 µg/mL), apenas no grupo A, e adicionaram-se os tratamentos descritos anteriormente. Após 48 horas, as células foram mantidas em meio basal e incubadas com o tratamento correspondente até D7 ou D9. O meio de cultivo e os tratamentos foram trocados a cada dois dias (Figura 5.1). Durante todo o processo as células foram mantidas a 37° C e em atmosfera de 5% de CO₂. Nos dias D1, D2, D4 e D8 de diferenciação foram congeladas amostras de células para posterior análise de expressão gênica. A avaliação da incorporação de lipídios foi realizada ao final de 7 dias de diferenciação para os grupos tratados com hormônios e ao final de 9 dias para o grupo em ausência de hormônios.

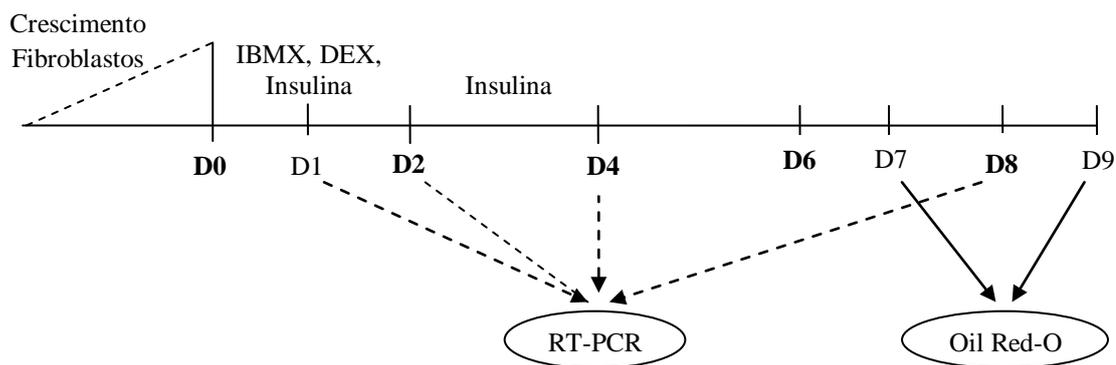


Figura 5.1: Desenho experimental. IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina; DEX: dexametasona; D: dias de diferenciação. Suplementação com coquetel de hormônios não se aplica ao estudo de adipogênese espontânea. Dias em destaque representam a adição de tratamento e troca de meio de cultivo.

5.2.3. Oil Red-O

Após o período experimental as células foram coradas com Oil Red-O como descrito previamente (Moreno-Aliaga and Matsumura 1999). Brevemente, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixadas com formaldeído a 3,7% em PBS por 1 hora. Após, as células foram lavadas com água destilada e coradas com Oil Red-O (6 partes de Oil Red-O saturado a 0,3% em isopropanol e 4 partes de água) durante 15 minutos. O excesso de corante foi removido, utilizando etanol a 70%, e, após, lavadas com água destilada. Foram feitas fotos das células coradas a 100x de ampliação. As gotas lipídicas coradas foram dissolvidas em ICEPAL (4% em isopropanol) e quantificadas por espectrofotometria. A absorbância foi medida a 520 nm.

5.2.4. Extração e análise da concentração de RNA

O RNA total foi isolado utilizando o método TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Inc), seguindo as etapas de homogeneização, separação, precipitação, enxague e dissolução do RNA. Para a homogeneização, lavou-se cada poço com 1 mL de TRIzol, que posteriormente foi removido para um tubo Eppendorf. Para a fase de separação incubou-se o homogeneizado durante 5 minutos a temperatura de 15 a

30° C. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e após vigorosa agitação incubou-se durante 3 minutos a temperatura de 15 a 30° C. Após, centrifugou-se a amostra a 12000 xg a 4° C, durante 15 minutos. Para a precipitação de RNA, transferiu-se a fase aquosa da centrifugação anterior para um tubo Eppendorf contendo 500 µL de isopropanol, incubou-se a temperatura de 15 a 30° C durante 10 minutos e efetuou-se uma nova centrifugação a 12000 xg a 4° C, durante 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* de RNA formado com 1 mL de etanol 75% em água DEPC (Dietil pirocarbonato a 0,01%). Misturou-se a amostra com uma ligeira agitação em vortex e, após, centrifugou-se a 12000 xg a 4° C, durante 5 minutos. Ao final do processo, secou-se o *pellet* de RNA a temperatura ambiente, o qual foi dissolvido em 15 µL de água de biologia molecular livre de RNAses. A concentração e qualidade do RNA foi verificada mediante a absorbância a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Considerou-se puro o RNA quando a razão entre as absorbâncias de 260/280 nm foi próxima a 2,0 e quando a razão 260/230 nm foi entre 2,0 a 2,2. A análise da concentração de RNA foi realizada para as amostras recolhidas nos dias D1, D2, D4 e D8 de diferenciação.

5.2.5. Real Time PCR

A partir da concentração avaliada em NanoDrop foram retrotranscritos a cDNA 2 µg de RNA, os quais foram dissolvidos em água de biologia molecular livre de RNAses, obtendo um total de 10 µL. Então, misturou-se ao conteúdo 1 µL de Random *Primers* e 1 µL de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs). A solução foi incubada a 65° C por 5 minutos. Após, misturou-se à solução 4 µL de buffer 5x, 2 µL de DTT, 1 µL inibidor de ribonuclease e 1 µL de transcriptase reversa (M-MLV RT). Utilizou-se termociclador TC 2700, de acordo com as seguintes condições de reação: 10 minutos a 25° C, 50 minutos a 37° e 15 minutos a 70 °C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA), o qual é constituído por *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Avaliou-se a expressão de mRNA de os seguintes genes (Tabela 6.1): C/EBP-alfa, C/EBP-beta, C/EBP-delta (exceto em D8), DLK-1, PPAR-gama e WNT10b. O gene Ppia (Ciclofilina) foi escolhido como referência (*housekeeping*) para normalizar os níveis de expressão gênica entre as amostras analisadas. As reações de PCR em tempo real

foram realizadas em triplicatas, a partir das diluições de cDNA (Tabela 5.1). Assim, para a reação utilizaram-se: 4,5 µL de cDNA diluído, 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix e 0,5 µL d *primer* de interesse (TaqMan® Gene Expression Assay). As condições de ciclagem utilizadas foram: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7900HT Sequence Detection System, versão 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, California USA). O software calcula o *threshold cycle* (Ct), que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Assim, efetua-se a diferença entre a média do Ct do mRNA teste e a média do Ct do gene padrão (Ppia), o que permite obter o ΔCt para cada amostra. A quantidade relativa de mRNA pôde então ser calculada a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre ΔCt da amostra teste e o ΔCt do amostra controle (Livak and Schmittgen 2001).

5.2.6. Análise estatística

Para avaliar o efeito da incorporação de lipídios utilizou-se teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O número de repetições foi diferente para cada tratamento, sendo no mínimo 6 por tratamento, implicando em delineamento desbalanceado. Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a expressão de mRNA durante a adipogênese utilizou-se o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado em esquema fatorial 8Tx6Px4D, sendo “T” tratamento, “P” *primer* e “D” tempo. Neste último delineamento, o número de repetições também foi diferente para cada fator, implicando em delineamento desbalanceado, no qual foi assumido um número mínimo de 3 repetições. O efeito significativo dos fatores foi verificado por meio do teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$) e uma vez comprovada tal significância as médias dos níveis de cada fator foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas no software SAS® versão 9.1 (SAS Institute Inc 2002), por meio do procedimento GLM (*General Linear Model*). Uma vez realizada a ANOVA e obtidas as médias de interesse, as trajetórias longitudinais de cada tratamento de cada *primer* foram estudadas mediante análise de agrupamento (análise de *cluster*), cujo objetivo residiu em agrupar tratamentos de trajetórias

semelhantes. Para tanto, foi utilizado o procedimento *Cluster* software SAS® (SAS Institute Inc 2002), por meio do método centróide. Como complemento dessa análise, utilizou-se o procedimento *Tree* do SAS® (SAS Institute Inc 2002), com objetivo de visualizar o dendograma e verificar quais tratamentos pertenciam aos diferentes grupos.

Tabela 5.1: Genes analisados (TaqMan® Gene Expression Assays; Applied Biosystems)

Sigla	Nome	Assay
C/EBPα	Proteína alfa estimuladora de ligação a CCAAT	Mm00514283_s1
C/EBPβ	Proteína beta estimuladora de ligação a CCAAT	Mm00843434_s1
C/EBPδ	Proteína delta estimuladora de ligação a CCAAT	Mm00514291_s1
Ciclofilina (Ppia)	Peptidil-prolil isomerase A	Mm02342430_g1
DLK1 (PREF-1)	Delta-like 1 homolog (Drosophila) – Fator preadipogênico	Mm00494477_m1
PPAR-gama	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama	Mm00440945_m1
WNT10b	Wingless related MMTV integration site 10b	Mm00442104_m1

5.3. Resultados

TCMs não promoveram a acumulação de lipídios em ausência de coquetel adipogênico

Para avaliar o efeito dos TCMs sobre a diferenciação de preadipócitos utilizou-se 10% de FBS/DMEM, suplementado com C8:0 ou C12:0, em ausência de coquetel adipogênico. A incorporação de lipídios foi avaliada, por Oil Red-O, 9 dias pósconfluência (Figura 5.2). Os resultados da concentração de Oil Red-O mostraram que, em ausência de indutores de diferenciação celular, a dose de 250 μ M de C8:0 ou C12:0 não promoveu alterações na incorporação lipídios, em relação ao grupo controle (Figura 5.2 A). As células tratadas com troglitazona apresentaram efeito adipogênico ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle e aos demais tratamentos. As microfotografias apresentadas na Figura 5.3 (A,D,F,H) confirmam esses resultados.

C8:0 acrescido de TNF α diminuiu o acúmulo de lipídios em adipogênese induzida

As células foram cultivadas em meio suplementado com coquetel adipogênico (IBMX, dexametasona e insulina), suplementado ou não com TNF α . A incorporação de lipídios foi avaliada 7 dias posconfluência. Os resultados da concentração de Oil Red-O mostraram que as células suplementadas com coquetel adipogênico, em ausência de TNF α , e acrescidas das substâncias testadas não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a incorporação de lipídios, em relação ao controle (etanol) (dados não apresentados). De forma semelhante ocorreu quando células tratadas com hormônios em presença de TNF α foram comparadas ao controle (Figura 5.2 A). No entanto, C8:0 e C12:0, acrescidos de TNF α , apresentaram menor incorporação de lipídios, em relação aos mesmos tratamentos em ausência de coquetel de hormônios. Ajustando o conteúdo de TNF α para 100% (Figura 5.2 B), o cotratamento de C8:0 e TNF α promoveu efeito antiadipogênico mais importante, em relação ao grupo tratado somente com TNF α e em relação ao cotratamento troglitazona e TNF α (Figura 5.3 E).

TCMs regulam a expressão de fatores adipogênicos transcricionais

Para avaliar o papel dos ácidos graxos de cadeia média na regulação da adipogênese avaliou-se por RT-PCR a expressão dos seguintes genes: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ , DLK1 e WNT10b. Os resultados sugerem que, em relação às células tratadas com etanol (controle), o ácido octanóico apresentou um efeito semelhante ao exercido pelo ácido láurico (Tabela 5.2). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para células tratadas com C8:0 e C12:0, em ausência do coquetel adipogênico, bem como entre os cotratamentos desses ácidos graxos com TNF α . Os tratamentos e cotratamentos não promoveram, de uma forma geral, alterações significativas na expressão de mRNA dos genes repressores da adipogênese: DLK1 e WNT10b. Entretanto, observa-se uma inibição ($p > 0,05$) da expressão de mRNA de DLK1 e WNT10b em células tratadas com troglitazona, bem como um maior estímulo ($p > 0,05$) à expressão desses genes em células tratadas com TNF α e com os cotratamentos com ácidos graxos (C8:0+TNF α e C12:0+TNF α) (Figura 5.4). Em relação à expressão de mRNA de C/EBP β o C8:0, em ausência de TNF α , apresentou

uma maior inibição ($p < 0,05$) em D1 e D4 e maior estímulo em D2 e D8, quando comparado ao etanol. Observou-se que o C8:0 exerceu uma maior inibição da expressão de mRNA de C/EBP δ durante a adipogênese, em relação ao etanol. O tratamento com C8:0 a 250 μ M, em ausência de coquetel adipogênico, promoveu menor expressão de mRNA de C/EBP α nos estágios iniciais da adipogênese: D1 ($0,10 \pm 0,04$; $p < 0,05$) e D2 ($0,16 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Por outro lado, em células tratadas com C8:0 acrescido de TNF α observou-se que o efeito inibitório sobre a expressão de C/EBP α ocorreu de forma mais tardia que em células tratadas somente com C8:0, sendo as menores expressões em D8 ($0,07 \pm 0,02$; $p < 0,05$). De forma semelhante, ao final da diferenciação (D8), observou-se uma significativa inibição ($p < 0,05$) da expressão de mRNA de C/EBP α em células tratadas com TNF α , bem como para os cotratamentos dos ácidos graxos com TNF α . Em oposição, o tratamento com troglitazona promoveu uma maior expressão de mRNA de C/EBP α em D8 ($4,30 \pm 0,24$; $p < 0,05$). No que diz respeito à expressão de mRNA de PPAR γ , os tratamentos com TNF α , bem como os cotratamentos com os ácidos graxos promoveram a inibição da expressão desse gene ao final da diferenciação celular (D8). Entretanto, nos dias D2 e D8, os ácidos graxos promoveram maior estimulação da expressão de mRNA de PPAR γ ($p < 0,05$), em relação aos cotratamentos com TNF α . Comparado ao efeito exercido pela troglitazona, o C8:0, em ausência de coquetel de hormônios, desempenhou um efeito mais intenso sobre a expressão de PPAR γ nos dias D2 e D8. Ainda, observa-se que o tratamento com TNF α , bem como os cotratamentos com ácidos graxos apresentaram uma tendência semelhante para a inibição ou estimulação dos genes avaliados (Figura 5.4).

Na análise de agrupamento (Quadro 5.1), os genes foram classificados, de acordo com suas características: repressores (DLK1 e WNT10b), iniciadores (C/EBP δ e β) e terminais (C/EBP α e PPAR γ). Os efeitos dos tratamentos foram reunidos em três *clusters* para cada gene (Anexos 7.2). Os agrupamentos foram realizados utilizando-se as médias das expressões de mRNA obtidas nos dias D0 a D4 para as classes de genes repressores e iniciadores e de D2 a D8 para os genes terminais. De uma forma geral, verificou-se que a troglitazona exerceu um efeito diferente dos demais agrupamentos, uma vez que se manteve em um *cluster* isolado, exceto para DLK1 e PPAR γ . Os cotratamentos de TNF α com os ácidos graxos mantiveram-se em um mesmo *cluster*, sugerindo um efeito similar desses

tratamentos. Observou-se o TNF α e seus cotratamentos com ácidos graxos desempenharam um efeito inibitório e decrescente na expressão de C/EBP α e de PPAR γ , sendo agrupados em um mesmo *cluster*. Os tratamentos isolados com os ácidos graxos C8:0 e C12:0 foram agrupados em um mesmo *cluster* na expressão de C/EBP β , devido ao estímulo exercido na expressão desse gene em D2. De forma semelhante, esses tratamentos foram mantidos em um mesmo *cluster* na expressão de C/EBP δ , porém houve uma tendência para a inibição da expressão desse gene. Os tratamentos com C12:0 e os cotratamentos dos ácidos graxos com TNF α foram incluídos em um mesmo agrupamento na classe de genes repressores, uma vez que tiveram a tendência de estimular a expressão de mRNA desses genes.

5.4. Discussão

Este estudo objetivou avaliar a regulação de ácidos graxos de cadeia média, acrescidos ou não de TNF α , durante a adipogênese espontânea e induzida por hormônios, em células 3T3-L1. O método clássico de indução da diferenciação celular em células 3T3-L1 é por meio da suplementação do meio de cultivo com coquetel de hormônios (3-isobutil-1-metilxantina, dexametasona e insulina) (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Yang, Della-Fera et al. 2009). Esses hormônios ativam os genes C/EBP β e C/EBP δ , promotores iniciais da diferenciação celular (Ntambi and Young-Cheul 2000), além de promoverem a inibição de DLK1 e WNT10b (Gregoire 2001).

Os resultados do presente estudo demonstraram que células tratadas com C8:0 ou C12:0 a 250 μ M, em presença ou ausência de coquetel adipogênico, não promoveram alterações na incorporação de lipídios, quando comparado ao controle. Os ácidos graxos de cadeia média podem atingir o tecido adiposo em situação de administração prolongada (Marten, Pfeuffer et al. 2006) e, uma vez incorporados na célula, esses compostos são especialmente direcionados para a produção de energia, pois sofrem menor ação da acil-CoA sintetase e não requerem a presença da carnitina acil transferase, o que acelera a β -oxidação e limita sua estocagem (Guo, Xie et al. 2006; Kovacs and Mela 2006; Marten, Pfeuffer et al. 2006). Dessa forma, sugere-se que os TCM desempenham um efeito antiobesidade por serem preferencialmente oxidados (DeLany, Windhauser et al. 2000; St-Onge and Bosarge 2008) e por aumentarem a termogênese (Traul, Driedger et al. 2000; St-Onge 2005; Nagao and

Yanagita 2008). No presente estudo não se verificou efeito dos ácidos graxos de cadeia média na adipogênese espontânea. Yang et al. (2009) verificaram que as doses de 500 μ M e 1mM de C8:0 e C10:0 (ácido cáprico), duas a quatro vezes mais altas que a utilizada no presente estudo, induziram a diferenciação de preadipócitos 3T3-L1. Esses autores verificaram que a indução da adipogênese foi dose dependente. Por outro lado, os resultados do presente estudo corroboram os achados de outros autores, os quais também não evidenciaram efeito adipogênico em células 3T3-L1 após 9 dias de suplementação de 1 mM (Guo, Choi et al. 2000) e 5 mM (Takenouchi, Takayama et al. 2004) de C8:0, em ausência de coquetel de hormônios. Assim, o efeito dos ácidos graxos de cadeia média sobre a incorporação de lipídios parece depender da presença de hormônios promotores da diferenciação celular.

No que diz respeito à adipogênese induzida por hormônios (dexametasona, IBMX e insulina), o presente estudo não evidenciou efeitos dos ácidos graxos de cadeia média. Esse efeito é controverso, uma vez que estudos demonstraram efeito proadipogênico (Takenouchi, Takayama et al. 2004) e antiadipogênico (Han, Farmer et al. 2002; Guo, Lei et al. 2003), utilizando C8:0 em presença de coquetel de hormônios. Yang et al. (2009) sugeriram que o efeito dos ácidos graxos de cadeia média sobre a adipogênese seja devido ao tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. Entretanto, os resultados verificados não confirmam tal efeito, uma vez que o ácido C12:0 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, bem como ao efeito exercido pelo C8:0. Ainda, Ding & Mersmann (2001) não verificaram indução da adipogênese em um estudo com C12:0 ou C16:0 (ácido palmítico).

Por outro lado, neste estudo evidenciou-se que o tratamento de C8:0, acrescido de TNF α , em presença de coquetel de hormônios (Figura 5.2 A) foi efetivo na inibição da adipogênese ($p < 0,05$), quando comparado ao efeito exercido pelo TNF α (Figura 5.2 B). A ação inibitória do TNF α no processo de diferenciação celular de adipócitos está bem estabelecida (Ruan, Hacoheh et al. 2002; Feve 2005). Esse efeito ocorre devido à inibição de fatores transcricionais chave do processo de diferenciação celular, como PPAR γ e C/EBP α (Cawthorn and Sethi 2008; Guilherme, Tesz et al. 2009). Ainda, o TNF α promove diminuição da sensibilidade à insulina, via estimulação de proteína quinase B (AKT) (Medina, Afsari et al. 2005) e quinase c-Jun N-terminal (JNK) (Nguyen, Satoh et al. 2005), o que dificulta à

captação de glicose. Não obstante, ácidos graxos livres podem estimular JNK, por meio de mecanismos dependentes de TNF α (Nguyen, Satoh et al. 2005). De acordo com Lee et al. (2003) o ácido láurico estimula a fosforilação de AKT e de JNK. Esse efeito sugere uma possível estimulação dessas vias pelo C8:0, bem como uma amplificação do efeito do TNF α , devido a similaridade química e biológicas desses ácidos graxos. Entretanto, a confirmação dessa via necessita de confirmação por pesquisas futuras. De acordo com os resultados deste estudo, a troglitazona acrescida de TNF α não foi capaz de reverter os efeitos inibitórios do TNF α , quando comparado ao controle (Figura 5.2 A). Entretanto, quando comparado ao TNF α o cotratamento de troglitazona e TNF α foi mais efetivo que os demais tratamentos (Figura 5.2 B). De forma semelhante ocorreu para as células tratadas unicamente com troglitazona, em ausência de coquetel adipogênico, no qual somente a presença desse composto foi capaz de exercer um potente efeito adipogênico (Figura 5.2 A). Esses resultados eram esperados, uma vez que a troglitazona, um membro da tiazolidinedionas, é um potente estimulador de PPAR γ e um antagonista de TNF α , que, por conseguinte estimula a adipogênese (Ruan, Pownall et al. 2003; Cawthorn and Sethi 2008).

Em relação aos efeitos exercidos sobre a expressão de genes envolvidos na adipogênese, os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento com TNF α , bem como os cotratamentos dessa citocina com os ácidos graxos promoveram uma significativa ($p < 0,05$) inibição da expressão de mRNA de C/EBP α e PPAR γ ao final da adipogênese (D8; Tabela 5.2). Esses resultados corroboram os achados de estudos anteriores (Ruan, Hacoheh et al. 2002; Cawthorn and Sethi 2008; Guilherme, Tesz et al. 2009). Estudos prévios sugerem que o TNF α não promove a supressão dos promotores iniciais do processo adipogênico, C/EBP β e C/EBP δ (Cawthorn and Sethi 2008). No presente estudo verificou-se que essa citocina estimulou a expressão de C/EBP β no quarto dia de diferenciação (Tabela 5.2). As análises de agrupamentos (Quadro 5.1) sugerem que os *clusters* em que o TNF α foi agrupado apresentaram uma tendência para a inibição de C/EBP α e PPAR γ e não se observou variação na expressão de C/EBP β e C/EBP δ entre os tempos D0 e D2.

O tratamento com C8:0, em ausência de coquetel de hormônios, inibiu ($p < 0,05$) a expressão de mRNA de C/EBP δ no processo de diferenciação, além de inibir a expressão de C/EBP β nos dias 1 e 4. Esse efeito sugere uma ação antiadipogênica exercida pelo C8:0. Yang et al. (2009) verificaram aumento da

expressão de mRNA de PPAR γ e C/EPB α em células tratadas com ácidos graxos de cadeia média, em ausência de coquetel de hormônios, em especial na dose de 1 mM desses ácidos graxos. Esse efeito também foi verificado por Sanosaka et al. (2008), os quais utilizaram 2 mM de C8:0. Por outro lado, Han et al. (2002) verificaram uma significativa inibição da expressão de mRNA de PPAR γ e C/EPB α , em células tratadas com C8:0 (1, 2 e 3 mM) e em presença de coquetel de hormônios. Esses efeitos podem ser atribuídos à presença de coquetel de hormônios, os quais desempenham um papel chave no processo de diferenciação celular. Especula-se que o efeito inibitório do C8:0 esteja relacionado a um passo entre a indução inicial da expressão de C/EBP β e δ e a estimulação de PPAR γ e C/EPB α (Han, Farmer et al. 2002). Entretanto, os resultados do presente estudo não corroboram tal efeito, uma vez que o C8:0 testado, embora em dose mais modesta, promoveu uma inibição da expressão de C/EBP δ e β (D1 e D4) e estimulou a expressão de PPAR γ em D2. Esse efeito foi também verificado nos *clusters* em que o C8:0 foi inserido (Quadro 5.1).

Por outro lado, os resultados não demonstraram que o C12:0 promoveu efeitos sobre a expressão de PPAR γ e C/EBP α . De forma semelhante, Ding et al. (2001) não verificaram efeitos sobre a expressão de PPAR γ e C/EBP α com a adição de 100 μ M de C12:0. Sugere-se que os ácidos graxos de cadeia média possam estimular a expressão de outros genes inibidores da adipogênese, diferentes dos clássicos genes envolvidos. Além disso, a concentração de ácido graxo testada e a presença de hormônios indutores da diferenciação celular podem apresentar um importante papel nesses efeitos. Assim, outros estudos são necessários para investigar o efeito desses ácidos graxos sobre a regulação da adipogênese, em presença ou ausência de coquetel de hormônios.

Com relação à expressão de genes repressores da diferenciação adipocitária, estudos sugerem que a expressão de DLK1 e de WNT10b, ambos supressores de C/EBP α e PPAR γ , estão aumentados em preadipócitos, mas reprimidos durante a adipogênese (Fève 2005; Gustafson, Hammarstedt et al. 2007). Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Han et al. (Han, Farmer et al. 2002), os quais também não verificaram efeito significativo de C8:0 sobre a expressão de mRNA de DLK1 (Pref-1). Entretanto, observa-se uma tendência dos ácidos graxos de cadeia média, em ausência ou presença de coquetel adipogênico ou de TNF α , em estimular a expressão de DLK1 (Figura 5.4). A análise de *cluster* identificou o

tratamento com C12:0 como estimulador dos genes repressores avaliados (Quadro 5.1). De acordo com Feve (2005) a supressão de WNT em adipogênese espontânea promove a diferenciação celular. Os resultados deste estudo corroboram tal afirmativa, uma vez que o tratamento com troglitazona apresentou uma tendência para tal inibição durante a adipogênese (Figura 5.4) e promoveu a incorporação de lipídios (Figura 5.2). Os ácidos graxos testados apresentaram uma tendência para estimulação de DLK1 e WNT10b, o que sugerem um possível efeito antiadipogênico desses ácidos graxos. Entretanto, tal efeito necessita de estudos comprobatórios.

Em resumo, este estudo mostrou que a incubação de 3T3-L1 de preadipócitos posconfluência com 250 μ M de ácido octanóico e láurico, em ausência de coquetel adipogênico, não promoveram a acumulação de lipídios. Entretanto, o ácido octanóico diminuiu a incorporação de lipídios durante a adipogênese induzida, quando acrescido de TNF α . Neste caso, o C8:0 foi capaz de potencializar o efeito inibitório do TNF α . Este efeito possivelmente foi devido a um efeito sinérgico do TNF α e do C8:0 no sentido de interferir negativamente na expressão de genes reguladores da adipogênese. Os ácidos graxos de cadeia média foram capazes de regular a expressão de fatores adipogênicos transcricionais clássicos (C/EPB β , δ e α e PPAR γ), com destaque especial aos efeitos desempenhados pelo ácido octanóico. Entretanto, é possível que esses ácidos graxos possam promover a expressão de outros genes inibidores da adipogênese, diferentes dos clássicos genes envolvidos.

5.5. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo “Ministerio de Educación y Ciencia” (AGL 2006-04716/ALI) da Espanha e pela “Línea Especial – Nutrición, Obesidad y Salud” (LE/97) da “Universidad de Navarra”, Espanha. A. G. V. Costa foi financiado por bolsa de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (201834/2008-1) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Ministério de Educação do Brasil.

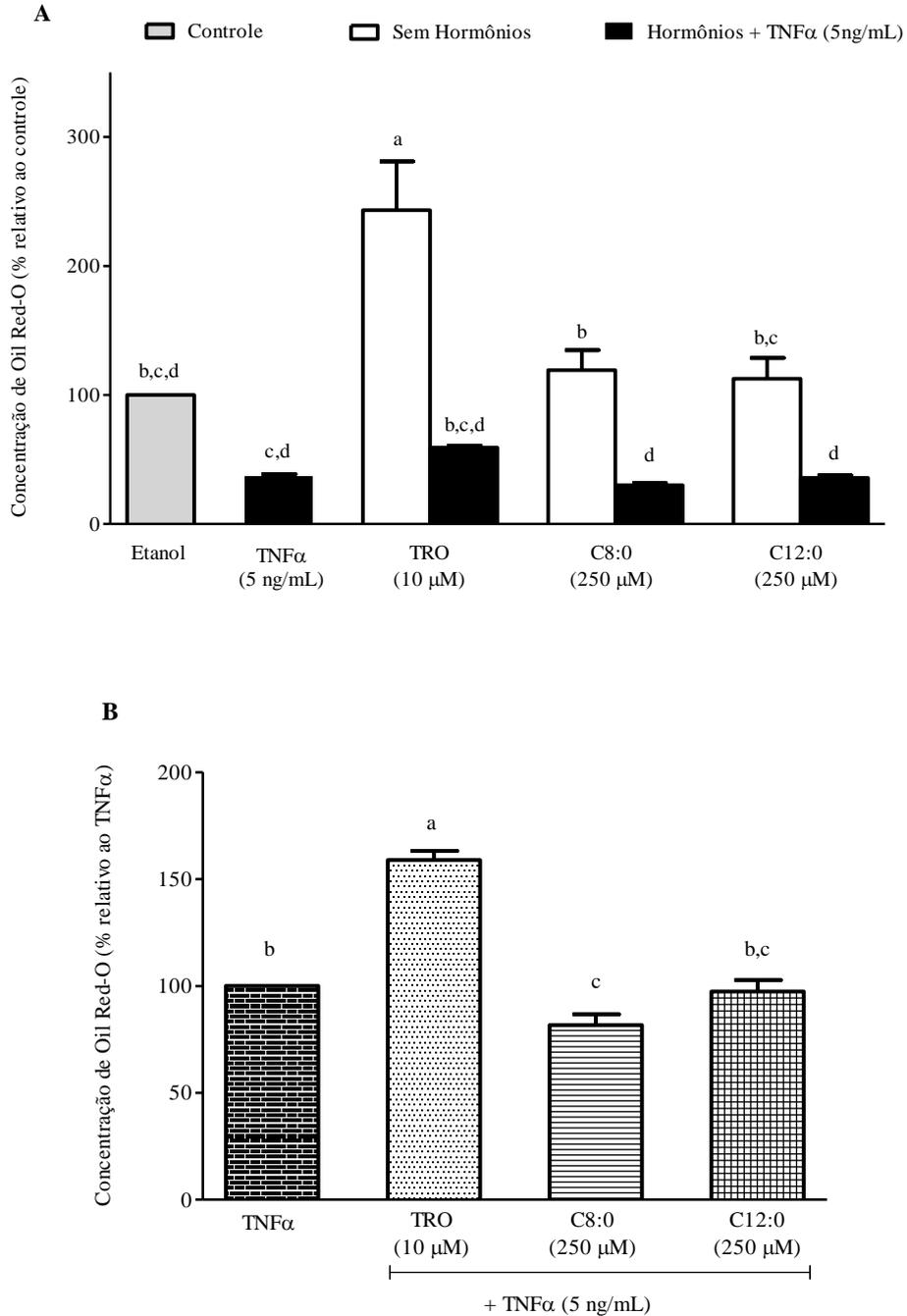


Figura 5.2: Efeito de diferentes tratamentos sobre a concentração de Oil Red-O em adipócitos. TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; A incorporação de lipídios foi avaliada 7 dias posconfluência em células suplementadas com coquetel de hormônios e 9 dias em células tratadas em ausência de hormônios. TRO: Troglitazona. A) Análise relativa ao controle (Etanol, ajustado a 100%) em experimentos independentes. B) Análise relativa ao TNF α , ajustado a 100%. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

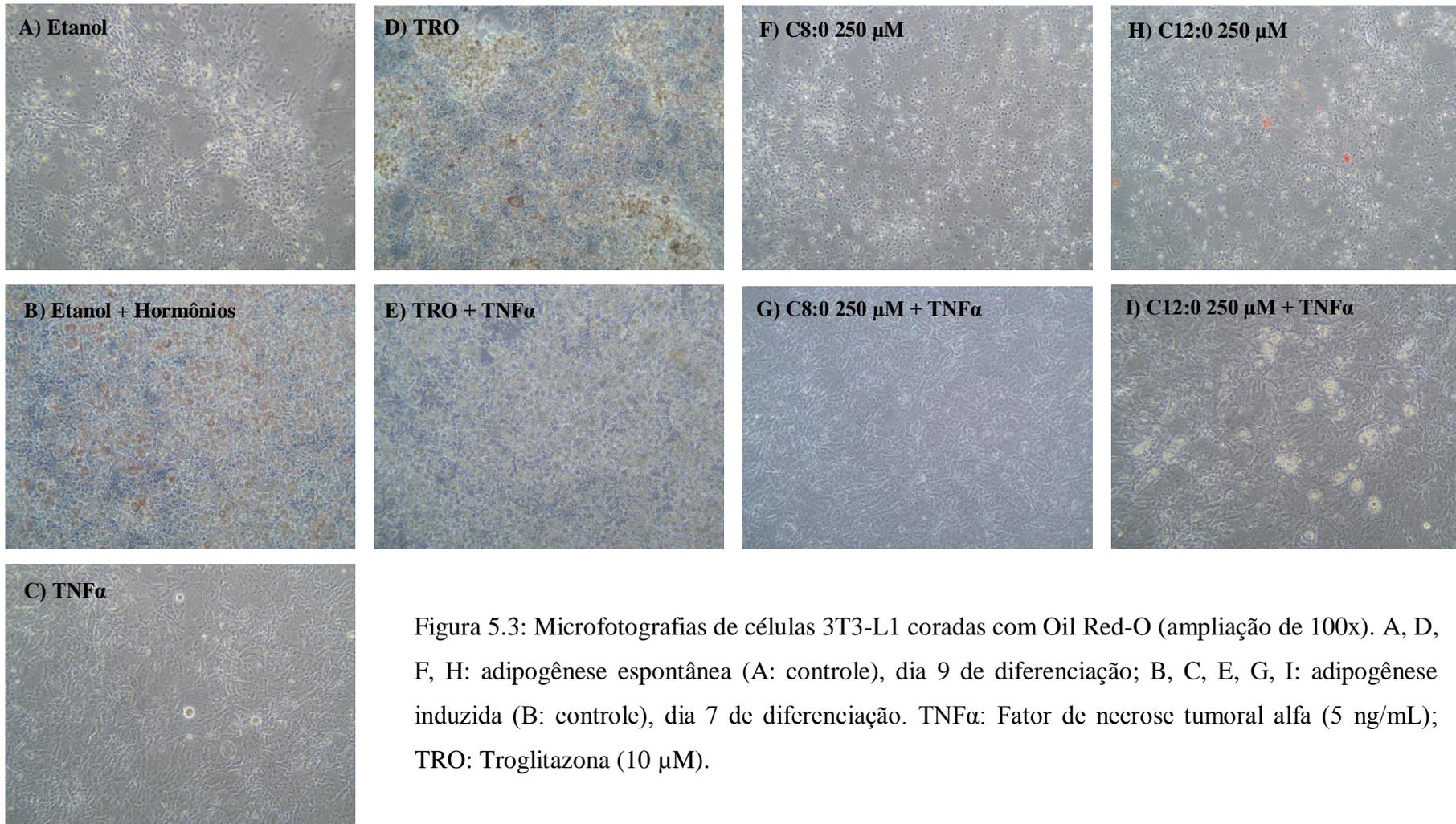


Figura 5.3: Microfotografias de células 3T3-L1 coradas com Oil Red-O (ampliação de 100x). A, D, F, H: adipogênese espontânea (A: controle), dia 9 de diferenciação; B, C, E, G, I: adipogênese induzida (B: controle), dia 7 de diferenciação. TNF α : Fator de necrose tumoral alfa (5 ng/mL); TRO: Troglitazona (10 μ M).

Tabela 5.2: Efeitos de diferentes tratamentos sobre os níveis de mRNA de genes reguladores da adipogênese

	C/EBP alfa				C/EBP beta				C/EBP delta			
	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8
Etanol	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^{b,c} ± 0,00	1,00 ^{a,b,c} ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	-
TNFα	0,42 ^{b,c} ± 0,02	0,44 ^{a,b} ± 0,02	0,42 ^{a,b} ± 0,05	0,09 ^c ± 0,02	1,07 ^{a,b} ± 0,05	1,07 ^b ± 0,08	1,48 ^a ± 0,03	1,02 ^{b,c} ± 0,03	1,25 ^{a,b} ± 0,05	1,29 ^a ± 0,08	0,66 ^{a,b,c} ± 0,04	-
TRO	0,54 ^{a,b,c} ± 0,07	0,71 ^{a,b} ± 0,55	0,76 ^{a,b} ± 0,32	4,30 ^a ± 0,24	1,20 ^{a,b} ± 0,23	0,92 ^b ± 0,21	0,40 ^c ± 0,20	1,33 ^{a,b,c} ± 0,19	0,78 ^{c,d} ± 0,20	0,76 ^{a,b,c} ± 0,26	0,39 ^{b,c} ± 0,08	-
TRO + TNFα	0,66 ^{a,b} ± 0,04	0,93 ^{a,b} ± 0,06	1,18 ^{a,b} ± 0,44	1,53 ^b ± 0,25	1,53 ^a ± 0,11	1,14 ^{a,b} ± 0,28	1,51 ^a ± 0,03	1,61 ^a ± 0,17	1,39 ^a ± 0,06	0,70 ^{a,b,c} ± 0,10	0,71 ^{a,b,c} ± 0,08	-
C8:0	0,10 ^c ± 0,04	0,16 ^b ± 0,02	0,67 ^{a,b} ± 0,50	1,50 ^b ± 0,41	0,49 ^b ± 0,11	2,69 ^a ± 0,74	0,32 ^c ± 0,06	1,76 ^a ± 0,13	0,21 ^e ± 0,04	0,21 ^c ± 0,04	0,27 ^c ± 0,12	-
C8:0 + TNFα	0,54 ^{a,b,c} ± 0,16	0,43 ^{a,b} ± 0,07	0,25 ^b ± 0,09	0,07 ^c ± 0,02	1,05 ^{a,b} ± 0,16	1,22 ^{a,b} ± 0,25	1,51 ^a ± 0,05	0,94 ^c ± 0,03	0,83 ^{b,c} ± 0,18	1,10 ^{a,b} ± 0,23	0,87 ^{a,b} ± 0,12	-
C12:0	0,48 ^{a,b,c} ± 0,26	0,23 ^{a,b} ± 0,09	2,09 ^a ± 1,02	1,33 ^b ± 0,15	1,20 ^{a,b} ± 0,56	2,68 ^a ± 0,27	0,70 ^{b,c} ± 0,15	1,39 ^{a,b} ± 0,08	0,35 ^{d,e} ± 0,11	0,56 ^{b,c} ± 0,21	0,65 ^{a,b,c} ± 0,24	-
C12:0 + TNFα	0,55 ^{a,b,c} ± 0,18	0,44 ^{a,b} ± 0,02	0,31 ^{a,b} ± 0,08	0,10 ^c ± 0,04	1,11 ^{a,b} ± 0,12	1,36 ^{a,b} ± 0,20	1,66 ^a ± 0,10	0,94 ^c ± 0,06	0,73 ^{c,d} ± 0,09	1,05 ^{a,b} ± 0,15	0,95 ^a ± 0,19	-

D: dia de diferenciação; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona. Dados expressos em média ± erro padrão para cada dia de diferenciação e em cada gene. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5.2: Continua

	PPAR γ				DLK1				WNT10b			
	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8	D1	D2	D4	D8
Etanol	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{b,c} ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00	1,00 ^c ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^{a,b,c} ± 0,00	1,00 ^{a,b} ± 0,00
TNFα	0,72 ^a ± 0,01	0,70 ^{b,c} ± 0,02	0,63 ^a ± 0,03	0,16 ^d ± 0,01	0,87 ^a ± 0,02	1,31 ^a ± 0,09	1,47 ^a ± 0,10	1,55 ^a ± 0,02	1,21 ^{b,c} ± 0,02	1,36 ^a ± 0,08	1,59 ^{a,b,c} ± 0,23	1,05 ^{a,b} ± 0,08
TRO	0,95 ^a ± 0,28	0,98 ^{b,c} ± 0,15	2,61 ^a ± 1,38	0,47 ^{c,d} ± 0,17	0,94 ^a ± 0,09	1,30 ^a ± 0,24	1,00 ^a ± 0,03	0,53 ^{a,b} ± 0,19	2,33 ^a ± 0,29	1,39 ^a ± 0,35	0,77 ^{b,c} ± 0,29	0,45 ^b ± 0,07
TRO + TNFα	0,88 ^a ± 0,02	0,65 ^c ± 0,04	0,57 ^a ± 0,05	0,69 ^{b,c} ± 0,02	0,99 ^a ± 0,03	0,81 ^a ± 0,16	0,40 ^b ± 0,03	0,25 ^b ± 0,07	1,06 ^c ± 0,07	0,77 ^a ± 0,09	0,48 ^c ± 0,06	0,34 ^b ± 0,12
C8:0	0,36 ^a ± 0,05	1,77 ^a ± 0,28	2,43 ^a ± 0,55	1,24 ^a ± 0,19	0,91 ^a ± 0,06	0,81 ^a ± 0,07	1,36 ^a ± 0,11	1,28 ^{a,b} ± 0,26	1,22 ^{b,c} ± 0,22	1,27 ^a ± 0,12	0,52 ^c ± 0,21	1,43 ^a ± 0,44
C8:0 + TNFα	0,99 ^a ± 0,20	0,72 ^{b,c} ± 0,09	0,62 ^a ± 0,08	0,17 ^d ± 0,01	0,81 ^a ± 0,19	1,33 ^a ± 0,36	1,48 ^a ± 0,10	1,59 ^a ± 0,00	0,88 ^c ± 0,12	1,70 ^a ± 0,22	1,96 ^a ± 0,48	1,24 ^{a,b} ± 0,24
C12:0	1,07 ^a ± 0,47	1,26 ^{a,b} ± 0,20	1,75 ^a ± 0,17	1,10 ^{a,b} ± 0,21	0,81 ^a ± 0,04	0,90 ^a ± 0,12	1,35 ^a ± 0,13	1,19 ^{a,b} ± 0,55	1,67 ^b ± 0,12	1,57 ^a ± 0,59	1,84 ^{a,b} ± 0,43	0,79 ^{a,b} ± 0,35
C12:0 + TNFα	0,68 ^a ± 0,08	0,65 ^c ± 0,07	0,66 ^a ± 0,05	0,17 ^d ± 0,03	0,72 ^a ± 0,13	1,08 ^a ± 0,25	1,35 ^a ± 0,31	1,50 ^a ± 0,04	0,93 ^c ± 0,04	1,54 ^a ± 0,26	1,98 ^a ± 0,31	1,15 ^{a,b} ± 0,23

D: dia de diferenciação; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona. Dados expressos em media \pm erro padrão para cada dia de diferenciação e em cada gene. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

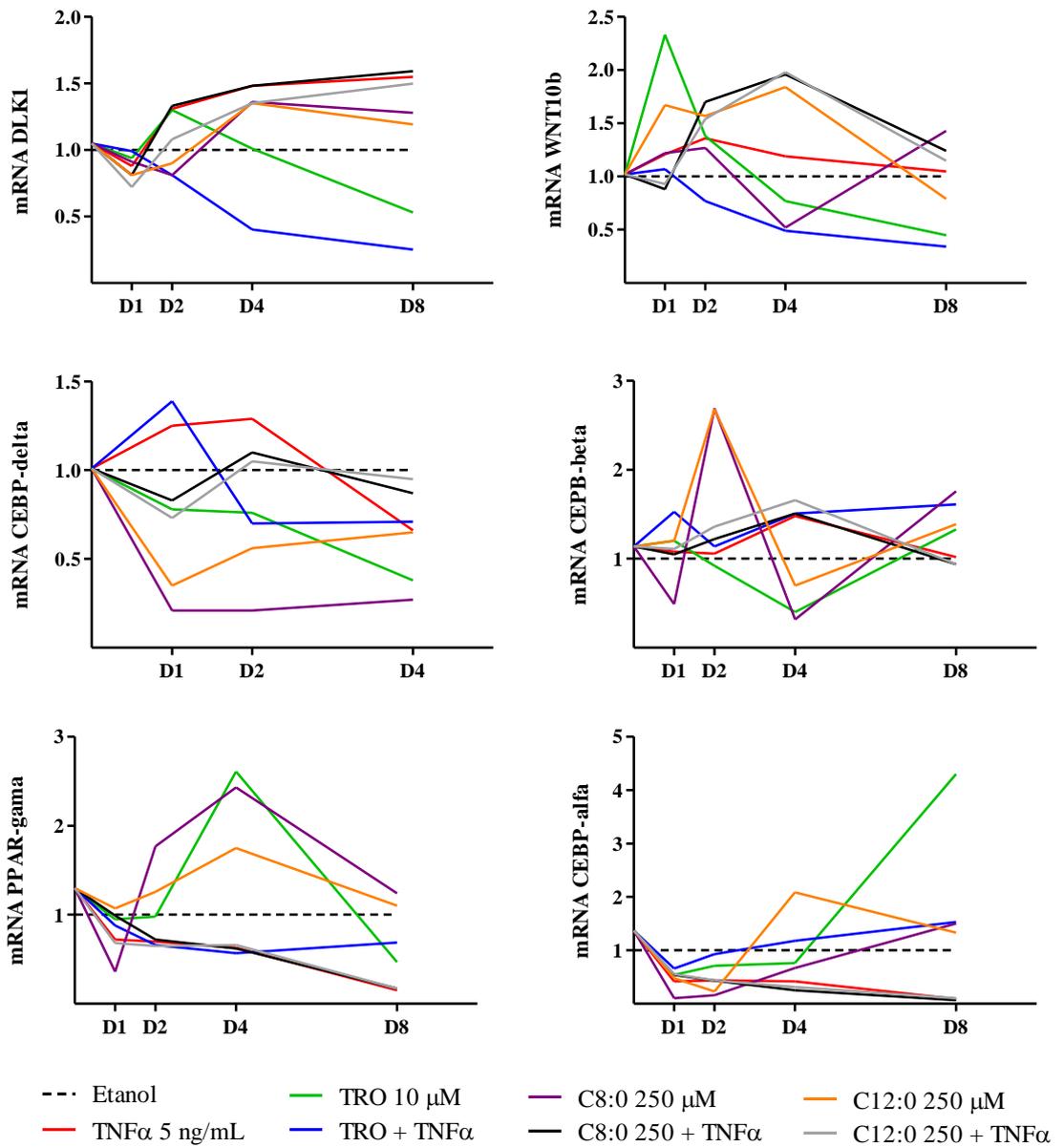


Figura 5.4: Evolução da expressão de mRNA de genes reguladores da adipogênese durante a diferenciação celular em função dos tratamentos. D: dias de tratamento; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona.

Quadro 5.1: Análise de *cluster* de tratamentos de acordo com a similaridade na expressão de mRNA em diferentes genes

CLASSE DE GENES REPRESSORES											
DLK1					WNT10b						
Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias			Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias		
			D1	D2	D4				D1	D2	D4
A	C8:0, C12:0, TNF α , C8:0+TNF α , C12:0+TNF α	1,05	0,83	1,09	1,40	A	C12:0, C8:0+TNF α , C12:0+TNF α	1,02	1,16	1,60	1,93
B	Etanol, Troglitazona	1,02	0,97	1,15	1,00	B	Etanol, C8:0, TNF α , TRO+TNF α	1,01	1,12	1,10	0,80
C	TRO+TNF α	1,05	0,99	0,81	0,40	C	Troglitazona	1,02	2,33	1,38	0,77
CLASSE DE GENES INICIADORES											
C/EBP δ					C/EBP β						
Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias			Grupos	Tratamentos	D0	Médias / Dias		
			D1	D2	D4				D1	D2	D4
A	Etanol, TNF α , TRO+TNF α , C8:0+TNF α , C12:0+TNF α	1,01	1,04	1,03	0,84	A	Etanol, TNF α , TRO+TNF α , C8:0+TNF α , C12:0+TNF α	1,11	1,15	1,16	1,43
B	C8:0, C12	1,01	0,28	0,38	0,46	B	C8:0, C12	1,14	0,84	2,68	0,51
C	Troglitazona	1,01	0,78	0,76	0,38	C	Troglitazona	1,14	1,20	0,92	0,40
CLASSE DE GENES TERMINAIS											
C/EBP α					PPAR γ						
Grupos	Tratamentos	D2	Médias/ Dias			Grupos	Tratamentos	D2	Médias / Dias		
			D4	D8				D4	D8		
A	TNF α , C8:0+TNF α , C12:0+TNF α	0,44	0,33	0,09	A	TNF α , C8:0+TNF α , C12:0+TNF α , TRO+TNF α	0,68	0,62	0,29		
B	Etanol, C8:0, C12:0, TRO+TNF	0,58	1,23	1,34	B	Etanol, C12:0	1,13	1,37	1,05		
C	Troglitazona	0,71	0,76	4,30	C	Troglitazona, C8:0	1,37	2,52	0,85		

C8:0 a 250 μ M, C12:0 a 250 μ M. D: dia de diferenciação; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa (5 ng/mL); TRO: Troglitazona (10 μ M).

5.6. Referências Bibliográficas

Bays, H. E., J. M. González-Campoy, et al. (2008). "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(3): 343-368.

Browning, L. M. (2003). "n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease." Proc Nutr Soc **62**(2): 447-453.

Calder, P. (2006). "n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): S1505-1519.

Carpentier, Y. A., L. Portois, et al. (2006). "n-3 fatty acids and the metabolic syndrome." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): 1499S-1504S.

Cawthorn, W. P. and J. K. Sethi (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology." FEBS Lett **582**(1): 117-131.

DeLany, J. P., M. M. Windhauser, et al. (2000). "Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans." Am J Clin Nutr **72**(4): 905-911.

Ding, S. and H. J. Mersmann (2001). "Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins*." J Nutr Biochem **12**(2): 101-108.

Feve, B. (2005). "Adipogenesis: cellular and molecular aspects." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 483-499.

Gregoire, F. M. (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 997-1002.

Guilherme, A., G. J. Tesz, et al. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes." J Biol Chem **284**(25): 17082-17091.

Guo, W., J. K. Choi, et al. (2000). "Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate." Biochem J **349**(Pt 2): 463-471.

Guo, W., T. Lei, et al. (2003). "Octanoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and human adipocytes." J Nutr **133**(8): 2512-2518.

Guo, W., W. Xie, et al. (2006). "Modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: involvement of reactive oxygen species." Nutr Metab (Lond) **3**: 30.

Gustafson, B., A. Hammarstedt, et al. (2007). "Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2276-2283.

Han, J., S. R. Farmer, et al. (2002). "Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes." J Nutr **132**(5): 904-910.

Han, J., J. A. Hamilton, et al. (2003). "Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats." Obes Res **11**(6): 734-744.

Kovacs, E. M. and D. J. Mela (2006). "Metabolically active functional food ingredients for weight control." Obes Rev **7**(1): 59-78.

Lee, J. Y., J. Ye, et al. (2003). "Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids." J Biol Chem **278**(39): 37041-37051.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method." Methods **25**(4): 402-408.

Marten, B., M. Pfeuffer, et al. (2006). "Medium-chain triglycerides." International Dairy Journal **16**(11): 1374-1382.

Medina, E. A., R. R. Afsari, et al. (2005). "Tumor necrosis factor- α decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt." Endocrinology **146**(6): 2726-2735.

Moreno-Aliaga, M. J. and F. Matsumura (1999). "Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein- α in 3T3-L1 cells." Molecular Pharmacology **56**(1): 91-101.

Nagao, K. and T. Yanagita (2008). "Bioactive lipids in metabolic syndrome." Prog Lipid Res **47**(2): 127-146.

Nguyen, M. T., H. Satoh, et al. (2005). "JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **280**(42): 35361-35371.

Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." J Nutr **130**(12): 3122S-3126S.

Robinson, L. E., A. C. Buchholz, et al. (2007). "Inflammation, obesity, and fatty acid metabolism: influence of n-3 polyunsaturated fatty acids on factors contributing to metabolic syndrome." Appl Physiol Nutr Metab **32**(6): 1008-1024.

Roynette, C. E., I. Rudkowska, et al. (2008). "Structured medium and long chain triglycerides show short-term increases in fat oxidation, but no changes in adiposity in men." Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases **18**(4): 298-305.

Ruan, H., N. Hacoen, et al. (2002). "Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory." Diabetes **51**(5): 1319-1336.

Ruan, H., H. J. Pownall, et al. (2003). "Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the

transcriptional regulatory functions of NF-kappaB." J Biol Chem **278**(30): 28181-28192.

Sanosaka, M., T. Minashima, et al. (2008). "A combination of octanoate and oleate promotes in vitro differentiation of porcine intramuscular adipocytes." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **149**(2): 285-292.

SAS Institute Inc (2002). Version 9.1 SAS Statistical Software. SAS Institute Inc. Cary, NC.

St-Onge, M. P. (2005). "Dietary fats, teas, dairy, and nuts: potential functional foods for weight control?" Am J Clin Nutr **81**(1): 7-15.

St-Onge, M. P. and A. Bosarge (2008). "Weight-loss diet that includes consumption of medium-chain triacylglycerol oil leads to a greater rate of weight and fat mass loss than does olive oil." Am J Clin Nutr **87**(3): 621-626.

Takenouchi, T., Y. Takayama, et al. (2004). "Co-treatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells." Cell Biol Int **28**(3): 209-216.

Takeuchi, H., S. Sekine, et al. (2008). "The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation." Asia Pac J Clin Nutr **17**(S1): 320-323.

Traul, K. A., A. Driedger, et al. (2000). "Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides." Food and Chemical Toxicology **38**(1): 79-98.

Yang, J.-Y., M. A. Della-Fera, et al. (2009). "Regulation of adipogenesis by medium-chain fatty acids in the absence of hormonal cocktail." J Nutr Biochem **20**(7): 537-543.

Zampelas, A., D. B. Panagiotakos, et al. (2005). "Fish Consumption Among Healthy Adults Is Associated With Decreased Levels of Inflammatory Markers Related to Cardiovascular Disease: The ATTICA Study." J Am Coll Cardiol **46**(1): 120-124.

6. CAPÍTULO 4

QUEMERINA, UMA NOVA ADIPOCINA ENVOLVIDA NA ADIPOGÊNESE, É REGULADA PELO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM CÉLULAS 3T3-L1

6.1. Introdução

O tecido adiposo é caracterizado como um importante órgão endócrino que não somente estoca energia, mas também regula a homeostase e metabolismo energético (Bays, González-Campoy et al. 2008). Esse tecido secreta importantes substâncias, chamadas adipocinas, que tem como objetivo comunicar com fígado, musculatura esquelética e cérebro (Bozaoglu, Bolton et al. 2007). As adipocinas exercem diversos papéis autócrinos e parácrino, atuando na regulação do balanço energético, efetuado pela leptina (Perez-Matute, Martinez et al. 2007), na sensibilidade à insulina, desempenhado pela adiponectina e apelina (Perez-Matute, Perez-Echarri et al. 2007; Lorente-Cebrian, Bustos et al. 2010) e no processo inflamatório, devido à produção de fator de necrose tumoral alfa (Cawthorn and Sethi 2008). Neste sentido, o tecido adiposo é considerado como peça fundamental na resistência insulínica e no processo inflamatório crônico de baixa intensidade, que caracteriza a obesidade.

Quemerina, também conhecida como *retinoic acid receptor responder 2* (*RARRES2*), é uma proteína produzida em vários órgãos e tecidos, como o fígado, pulmão, rim e, recentemente, foi descoberta no tecido adiposo (Bozaoglu, Bolton et al. 2007; Roh, Song et al. 2007). Essa adipocina é o ligante natural do receptor para quemerina (quemerinaR), também conhecido como receptor 1 semelhante a quimocina (ChemR23 ou CMKLR1), que é um membro da família dos receptores órfãos acoplados à proteína G. Estudos recentes sugerem que essa adipocina esteja envolvida na regulação da adipogênese (Bozaoglu, Bolton et al. 2007; Roh, Song et al. 2007; Sell, Laurencikiene et al. 2009), podendo ser modulada pelos níveis de fator de necrose tumoral alfa – TNF α (Sell, Laurencikiene et al. 2009; Parlee, Ernst et al. 2010).

Por outro lado, o metabolismo do ácido eicosapentaenóico – EPA (C20:5 n-3) é capaz de produzir eicosanóides e resolvinas, uma substância com efeito anti-

inflamatório (Burdge 2006). A resolvina (RevE1) compete com a quemerina pelo mesmo receptor ChemR23; embora ambas substâncias reduzam a produção de fator nuclear κ B (NF- κ B) (Arita, Bianchini et al. 2005), parece que a quemerina atua na quimiotaxia de macrófagos (MacDougald and Burant 2007). Não obstante, os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são compostos por ácidos graxos saturados contendo 6 a 12 átomos de carbono. Sugere-se que os TCM sejam capazes de regular a resposta inflamatória, por meio da ativação do receptor GPR84, um receptor órfão acoplado à proteína G (Wang, Wu et al. 2006).

Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito do EPA e de ácidos graxos de cadeia média (ácido octanóico – C8:0 e ácido láurico – C12:0) na expressão de mRNA de quemerina durante a adipogênese espontânea e durante a adipogênese induzida, porém inibida por TNF α , em células 3T3-L1. Ainda, avaliou-se o efeito dos ácidos graxos sobre a secreção e expressão de quemerina em adipócitos maduros 3T3-L1.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Reagentes e anticorpo

Fibroblastos de camundongos 3T3-L1 foram adquiridos da American Type Culture Collection (Rockville, MD). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FSB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) foram comprados da Invitrogen GIBCO. Insulina, dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ácido octanóico (C8:0), albumina bovina livre de ácidos graxos (BSA) e DEPC (Diethyl pirocarbonato) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O ácido láurico (C12:0) e eicosapentaenóico (EPA – C20:5 n-3) e Troglitazona foram adquiridos da Cayman Chemical. Inibidor de ribonuclease (RNAsin® Ribonuclease Inhibitors) da Promega e demais produtos TRIzol®, Random *primers*, Desoxi-nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), Buffer 5x (tampão), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) adquiridos da Invitrogen. Os *primers* e TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x foram adquiridos da Applied Biosystems. Os componentes AICAR (5-amino-4-imidazolecarboxamide-1- β -d-ribofuranoside), H-89, LY294002, PD98059 foram adquiridos de Sigma-Aldrich. Compound C foi da marca Calbiochem e SP600125 da Biomol. O Kit ELISA contendo o anticorpo

monoclonal específico para quemerina (RARRES2) de camundongos foi adquirido da R&D Systems.

6.2.2. Experimento 1

Preadipócitos 3T3-L1 (passagens 3 a 11) foram cultivado até a confluência, como descrito anteriormente (Moreno-Aliaga and Matsumura 1999). Após a confluência, as células foram cultivadas por 48 horas (dia zero – D0 a dia 2 – D2) em meio basal (DMEM a 25 mM de glicose; 10% v/v de FBS; 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e suplementado ou não com coquetel de hormônios (1 µM de dexametasona; 0,5 mM de IBMX e 10 µg/mL de insulina). Posteriormente, as células foram cultivadas em meio basal em presença ou ausência de insulina (10 µg/mL), durante 48 horas (D3 e D4). Após esse período, as células foram cultivadas em meio basal, porém sem insulina, até o dia 7 (D7) ou 9 (D9); período em que as células apresentavam fenótipo de adipócitos. Durante todo o processo as células foram mantidas a 37° C e em atmosfera de 5% de CO₂. A troca de meio de cultivo por um meio fresco ocorreu a cada dois dias. Nos dias D0, D2, D4, D6 e D8 as células foram incubadas com 0,1% de etanol (controle), TNF-α (5 ng/mL; somente para o grupo suplementado com coquetel de hormônios) e/ou com um dos seguintes tratamentos: Troglitazona (10 µM), EPA (100 ou 200 µM), C8:0 (250 µM) ou C12:0 (250 µM). Ao final dos períodos experimentais, quantificou-se a expressão de mRNA de RARRES2 (quemerina), por Real Time PCR, para as amostras coletadas nos dias D1, D2, D4 e D8.

6.2.3. Experimento 2

Os preadipócitos 3T3-L1 foram diferenciados como descritos previamente (Lorente-Cebrian, Bustos et al. 2010). No dia D8, 3 horas antes da adição dos tratamentos, os adipócitos maduros foram privados de soro FBS. Para isso, adicionou-se ao meio de cultivo (DMEM a 25 mM de glicose e antibiótico; isento de FBS) 0,34% de BSA com o objetivo de manter a proporção de ácido graxo:BSA em 5:1 (Nguyen, Satoh et al. 2005; Patsouris, Neels et al. 2009). A adição de albumina é importante para reduzir a possibilidade de toxicidade dos ácidos graxos. Após o período de deprivação, adicionaram-se os seguintes tratamentos ao meio de cultivo: Etanol (0,1%; controle), Troglitazona (10 µM), TNF-α (5 ng/mL), Insulina (100

nM), EPA (100 ou 200 μ M), C8:0 (250 μ M) ou C12:0 (250 μ M). Os adipócitos permaneceram em contato com os tratamentos durante 24 horas. Após esse período, recolheu-se o meio de cultivo para posterior análise da expressão da proteína expressa pelo gene RARRES2 (quemerina), pelo método imunoenzimático ELISA. Ainda, quantificou-se a expressão de mRNA de quemerina.

6.2.4. Experimento 3

Os preadipócitos 3T3-L1 foram diferenciados como descritos previamente (Lorente-Cebrian, Bustos et al. 2010). No dia D8, 3 horas antes da adição dos tratamentos, os adipócitos maduros foram privados de soro FBS. Adicionou-se ao meio de cultivo (DMEM a 25 mM de glicose e antibiótico; isento de FBS) 0,34% de BSA (5:1 ácido graxo:BSA). Após o período de deprivação, adicionaram-se os seguintes tratamentos ao meio de cultivo: Etanol (0,1%; controle), TNF- α (5 ng/mL) ou Insulina (100 nM). Uma hora antes da adição dos tratamentos os adipócitos foram preincubados com os seguintes componentes: AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide-1- β -d-ribofuranoside), Compound C, H-89, LY294002, PD98059 ou SP600125. O AICAR e TNF- α foram dissolvidos em água e LY294002, Compound C, SP600125, PD98059, H89 e Troglitazona foram dissolvidos em DMSO. Os inibidores de PI3K (LY294002 – 50 μ M), AMPK (Compound C – 20 μ M), JNK (SP600125 – 20 μ M), MAPK (PD98059 – 50 μ M) e de PKA (H89 – 20 μ M). O estimulador de AMPK (AICAR – 2 mM) foi adicionado ao meio de cultivo juntamente com os demais tratamentos. As células permaneceram em contato com os tratamentos durante 24 horas. Após esse período, recolheu-se o meio de cultivo para análise da expressão da proteína expressa pelo gene RARRES2 (quemerina), pelo método imunoenzimático ELISA.

6.2.5. Real Time PCR

O RNA total foi extraído utilizando o método TRIzol®, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen). A concentração e qualidade do RNA foi verificada mediante a absorbância a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Um total de 2 μ g foram retrotranscritos a cDNA, por meio de transcriptase reversa MMLV (Moloney-murine-leukaemia vírus; Invitrogen), de acordo com as seguintes condições: 60 minutos a 37° C e 5 minutos a 95° C. Utilizou-se Real Time

PCR para avaliar a expressão do gene *quemerina* (*Rarres2*; Retinoic acid receptor responder – tazarotene induced – 2). O gene *Ppia* (Peptidil-prolil isomerase A) – Ciclofilina foi escolhido como referência (*housekeeping*) para normalizar os níveis de expressão gênica entre as amostras analisadas. Utilizaram-se *primers* TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems): *Rarres2* (Mm00503579_m1) e *Ppia* (Mm02342430_g1). As condições de ciclagem utilizadas foram: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System, versão 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, California USA). As modificações da expressão de mRNA foram avaliadas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001).

6.2.6. Imunoensaio enzimático – ELISA

Os níveis totais de *quemerina* foram mensurados em meio de cultivo, por meio do kit comercial de ELISA, segundo a indicação do fabricante. A curva dose-resposta do padrão de *quemerina* (46,9 a 3000 pg/mL), por meio do modelo quadrático, foi utilizada para calcular o total da concentração de *quemerina* nas amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL.

6.2.7. Análise estatística

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a expressão de mRNA durante a adipogênese (Experimento 1) utilizou-se o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12Tx4D, sendo “T” tratamento e “D” tempo. O número de repetições foi diferente para cada fator, implicando em delineamento desbalanceado, no qual foi assumido um número mínimo de 3 repetições. O efeito significativo dos fatores foi verificado por meio do teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$) e uma vez comprovada tal significância as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas no software SAS® versão 9.1 (SAS Institute Inc 2002), por meio do procedimento GLM (*General Linear Model*).

Para as análises do experimento 2 utilizou-se o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado. A expressão de mRNA e a secreção de *quemerina* foram avaliadas mediante teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$), sendo as médias

comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O número de repetições foi diferente para cada tratamento, sendo no mínimo 3 por tratamento, implicando em delineamento desbalanceado. Todas as análises foram conduzidas no software SAS® versão 9.1 (SAS Institute Inc 2002), por meio do procedimento GLM (*General Linear Model*).

Para avaliar a secreção de quemerina, no experimento 3, utilizou-se o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado. Os tratamentos acrescidos de inibidores frente aos respectivos controles (etanol, insulina e TNF α) foram comparados por meio do teste “F” na ANOVA ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. O número de repetições foi diferente para cada tratamento, sendo no mínimo 3 por tratamento, implicando em delineamento desbalanceado. Todas as análises foram conduzidas no software SAS® versão 9.1 (SAS Institute Inc 2002), por meio do procedimento GLM (*General Linear Model*).

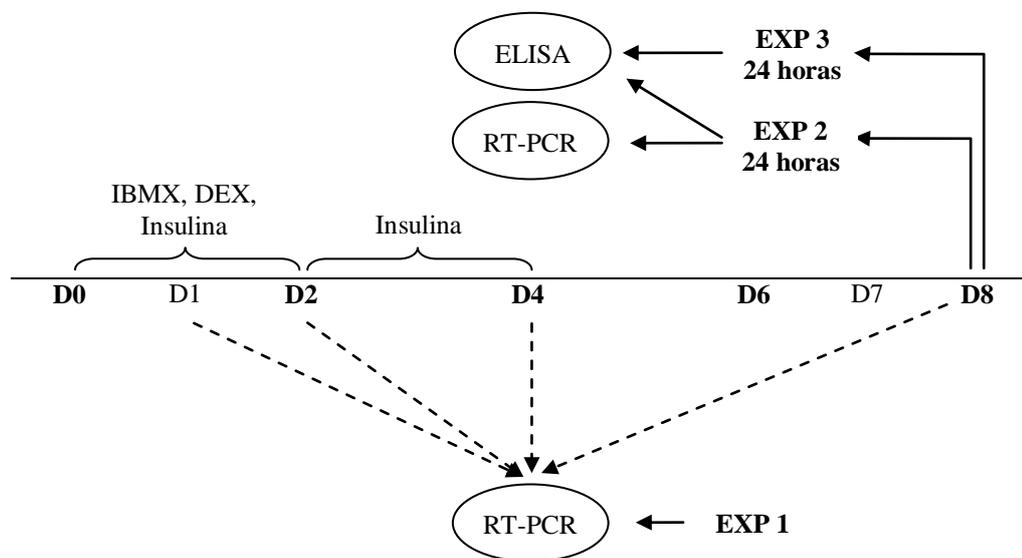


Figura 6.1: Desenho experimental. IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina; DEX: dexametasona; D: dias de diferenciação; EXP: Experimento. Dias em destaque representam a adição de tratamento do Experimento 1. Suplementação com coquetel de hormônios não se aplica ao estudo de adipogênese espontânea do Experimento 1.

6.3. Resultados

Experimento 1

Este estudo verificou que, em células 3T3-L1, os tratamentos com os ácidos graxos (EPA, C8:0 e C12:0), durante a adipogênese espontânea, bem como os cotratamentos com TNF α , durante a adipogênese induzida, não foram capazes de alterar a expressão de mRNA de quemerina até o quarto dia posconfluência. Entretanto, verificou-se que em D8 esses tratamentos provocaram uma significativa inibição na expressão de quemerina, independentemente do tipo de adipogênese avaliado, em relação ao controle (Tabela 6.1). Verificou-se que de EPA a 100 μ M e de C12:0 a 250 μ M estimularam inicialmente (D1) a expressão de mRNA de quemerina, diferentemente do tratamento com C8:0 a 250 μ M, que promoveu uma maior estimulação em D4 (Figura 6.1 A). Ao longo da adipogênese, observou-se um aumento na expressão desse gene em células tratadas com ácidos graxos acrescidos de TNF α , obtendo um pico de máxima estimulação em D2 (Figura 6.2 B). Por outro lado, os tratamentos com ácidos graxos acrescidos de TNF α promoveram uma maior estimulação na expressão de mRNA de quemerina, embora não significativa, em relação aos mesmos tratamentos sem adição dessa citocina. A troglitazona, durante a adipogênese induzida, estimulou fortemente a expressão de quemerina até D4 ($2,25 \pm 0,30$; $p < 0,05$). O cotratamento de troglitazona e TNF α estimulou significativamente a expressão desse gene em D1 ($4,44 \pm 0,96$; $p < 0,05$) e em D4 ($,38 \pm 0,31$; $p < 0,05$). Comparando-se os efeitos de troglitazona nos dois modelos de adipogênese, verificou-se que o cotratamento com TNF α promoveu maior estímulo à expressão de quemerina que o tratamento isolado de troglitazona, durante a adipogênese espontânea, sendo esse efeito significativamente diferente ($p < 0,05$) em D1, D4 e D8 (Tabela 6.1).

Experimento 2

Este estudo também verificou o efeito na secreção de quemerina, bem como na expressão de mRNA, em adipócitos maduros tratados por 24 horas com ácidos graxos acrescidos ou não de insulina (100 nM) ou de TNF α (5 ng/mL). Verificou-se que o tratamento com TNF α estimulou significativamente a secreção (Figura 6.3 A) e a expressão de quemerina (Figura 6.4 A), em relação ao controle. O tratamento com insulina ou os cotratamentos de ácidos graxos (C8:0 e C12:0) acrescidos de

insulina não foram capazes de alterar a secreção (Figura 6.3 B) e a expressão de quemerina (Figura 6.4 B), em relação ao controle. Entretanto, observa-se que a insulina estimulou ligeiramente a secreção dessa proteína, embora não tenha sido estatisticamente diferente do controle (Figura 6.3 A). Embora o TNF α isoladamente tenha estimulado a secreção e expressão de mRNA de quemerina, os cotratamentos com essa citocina não foram capazes de promover alterações (Figura 6.3 C; Figura 6.4 C).

Experimento 3

Devido aos efeitos desempenhados pela insulina e pelo TNF α , sobretudo por este último, na secreção e expressão de mRNA de quemerina, este estudo avaliou possíveis rotas metabólicas envolvidas nesse estímulo. Para isso, os adipócitos 3T3-L1 foram incubados por 24 horas com etanol (controle), insulina (100 nM) ou TNF α (5 ng/mL), acrescidos de diferentes inibidores ou do estimulador de AMPK (AICAR). Comparado ao etanol, verificou-se o TNF α estimulou significativamente a secreção de quemerina, diferentemente da insulina. Entre as amostras tratadas com etanol, observou-se que a presença dos inibidores de JNK (SP600125), de PKA (H89) e de PI3K (LY294002) reduziu significativamente a secreção de quemerina (Figura 6.5). Em relação às possíveis vias metabólicas relativas à insulina, somente a adição do inibidor de JNK (SP600125) não promoveu alteração significativa. Por outro lado, quando comparado ao TNF α , as presenças de Compound C, SP600125, H89 e LY294002 reduziram significativamente a secreção de quemerina. Este efeito sugere que o TNF α possa estimular a secreção de quemerina pelas vias de AMPK, JNK, PKA e PI3K. Em conjunto, esses resultados mostraram que a principal rota de estimulação da secreção de quemerina ocorre via PI3K.

6.4. Discussão

A obesidade é uma enfermidade intimamente associada à resistência insulínica e ao aumento de substâncias inflamatórias, como o TNF α (Kahn, Hull et al. 2006; Bays, González-Campoy et al. 2008). Estudos prévios sugerem que o EPA apresenta atividade antiobesidade, promovendo a lipólise (Hernandez-Morante, Milagro et al. 2007; Lee, Kwun et al. 2008; Pérez-Echarri, Pérez-Matute et al. 2008), podendo potencializar a ação antiadipogênica do TNF α (Tai and Ding 2010). Por

outro lado, sugere-se que ácidos graxos de cadeia média possam induzir a diferenciação celular em presença (Takenouchi, Takayama et al. 2004; Sanosaka, Minashima et al. 2008) ou em ausência (Yang, Della-Fera et al. 2009) de coquetel adipogênico. Entretanto, outros estudos sugerem que o ácido octanóico atenua a adipogênese (Guo, Choi et al. 2000; Han, Farmer et al. 2002; Han, Hamilton et al. 2003). Em nossos estudos verificamos que a presença de EPA a 200 μM , durante a adipogênese espontânea em células 3T3-L1, é capaz de induzir a diferenciação celular (dados não apresentados). Por outro lado, em modelos de adipogênese induzida em células 3T3-L1, a presença de C8:0 a 250 μM , acrescido de TNF α , potencializou o efeito antiadipogênico dessa citocina (dados não apresentados). Portanto, o estudo dos efeitos de ácidos graxos no contexto da obesidade é de grande importância para o entendimento e tratamento dessa enfermidade.

Diversos estudos clínicos tem demonstrado uma positiva correlação entre os níveis plasmáticos de quemerina com a obesidade e inflamação (Bozaoglu, Bolton et al. 2007; Stejskal, Karpisek et al. 2008). Ainda, sugere-se que a quemerina esteja envolvida na regulação da adipogênese (Bozaoglu, Bolton et al. 2007; Roh, Song et al. 2007; Sell, Laurencikiene et al. 2009), sendo regulada pelo TNF α (Sell, Laurencikiene et al. 2009; Parlee, Ernst et al. 2010). Nesse sentido, no presente estudo verificamos se a presença de EPA e de ácidos graxos de cadeia média (C8:0 e C12:0) são capazes de alterar a expressão de quemerina, durante a adipogênese espontânea e induzida, uma vez que estudos prévios identificaram que essa proteína está envolvida na adipogênese (Roh, Song et al. 2007; Sell, Laurencikiene et al. 2009; Parlee, Ernst et al. 2010). Os resultados evidenciaram que o EPA, C8:0 e C12:0, comparados ao controle, não alteraram a expressão de mRNA de quemerina durante a adipogênese espontânea. De forma semelhante, os cotratamentos dos ácidos graxos e TNF α , durante a adipogênese induzida, não mostraram aumento ou inibição na expressão desse gene. Em células 3T3-L1, a expressão de mRNA de quemerina parece aumentar durante a adipogênese induzida, em comparação ao dia zero (Bozaoglu, Bolton et al. 2007; Roh, Song et al. 2007). O presente estudo mostrou que a expressão de quemerina decresce durante a adipogênese espontânea e durante a adipogênese induzida, porém inibida por TNF α . Especula-se que a estimulação de quemerina seja dependente de hormônio adipogênicos, como insulina, dexametasona ou IBMX. Entretanto, estudos futuros devem ser

direcionados para elucidar esse efeito. Por outro lado, o presente estudo mostrou que troglitazona, um agonista de PPAR γ , estimulou fortemente a expressão de quemerina durante a adipogênese espontânea (Tabela 6.1). Sell et al. (2009) não verificaram efeito de 5 μ M de troglitazona em um estudo com adipócitos humanos maduros, durante 48 horas. Ressalta-se que o tipo celular e distintos protocolos poderiam influenciar a expressão de mRNA de quemerina.

Corroborando os resultados de outros estudos (Roh, Song et al. 2007; Sell, Laurencikiene et al. 2009; Parlee, Ernst et al. 2010), observamos que o TNF α é capaz de estimular a secreção (Figura 6.3 A) e a expressão de mRNA de quemerina (Figura 6.4 A), em adipócitos maduros 3T3-L1. Por outro lado, no presente estudo, verificamos que o tratamento de adipócitos maduros 3T3-L1, durante 24 horas, com ácidos graxos (EPA, C8:0 e C12:0) não alterou a secreção e a expressão de mRNA de quemerina. O mesmo efeito foi observado em cotratamentos desses ácidos graxos com TNF α ou com insulina. Em um recente estudo (Parlee, Ernst et al. 2010), verificou-se que o tratamento com 20 ng/mL de TNF α estimulou a secreção e expressão de mRNA de quemerina em adipócitos 3T3-L1, além disso, verificou-se que 14 horas após o tratamento com 10 ng/mL de TNF α houve uma maior expressão, em relação ao tempo zero. O presente estudo verificou que o tratamento com insulina produziu apenas um moderado aumento na secreção de quemerina, não sendo estatisticamente diferente do controle (Figura 6.3 A). Em células musculares esquelética verificou-se um efeito inibitório da quemerina na captação de glicose (Sell, Laurencikiene et al. 2009), diferentemente de estudos em 3T3-L1 (Takahashi, Takahashi et al. 2008). Bozaoglu et al. (2007) não observaram diferenças nos níveis de quemerina em indivíduos diabéticos ou controle. Portanto, ainda são necessários novos estudos para determinar se a secreção e a expressão de mRNA de quemerina podem ser influenciadas pela ação da insulina.

Atualmente já são conhecidas várias rotas de sinalização celular em adipócitos assim, neste estudo foram testados potenciais alvos intracelulares do metabolismo da insulina e do TNF α , utilizando-se inibidores específicos. Em células tratadas com insulina e bloqueando a via PI3K, uma importante enzima envolvida no metabolismo de glicose e na expressão de genes influenciados pela insulina (Saltiel and Kahn 2001), a secreção de quemerina foi inibida (Figura 6.5). De forma semelhante, o bloqueio das vias MAPK, AMPK e PKA inibiu a secreção de

quemerina, em relação ao controle. Em células tratadas com TNF α , observou-se que bloqueando as vias de AMPK, JNK, PKA e PI3K a secreção de quemerina também foi inibida. Em conjunto, os resultados sugerem que a principal rota de sinalização celular da quemerina seja via PI3K, a qual regula a captação de glicose.

Em conjunto, o presente estudo mostrou que a expressão de quemerina decresce durante a adipogênese espontânea e durante a adipogênese induzida, porém inibida por TNF α . Observou-se que o EPA, o C8:0 e o C12:0 aparentemente não participam da secreção e expressão de quemerina. Entretanto, este estudo apresenta uma limitação, uma vez que não avaliou o efeito dos ácidos graxos durante a adipogênese induzida, em ausência de TNF α . Não obstante, esses resultados sugerem que a expressão de mRNA de quemerina seja dependente de hormônios indutores da diferenciação celular. Entretanto, verificou-se que o TNF α estimula a secreção e expressão de mRNA de quemerina, possivelmente via PI3K. Aparentemente, a insulina desempenha um fraco papel nessa estimulação. Neste sentido, outra limitação desse estudo foi não avaliar a expressão de quemerina após a utilização de bloqueadores das vias metabólicas. Portanto, outros estudos são necessários para confirmar as vias de expressão e de metabolismo da quemerina.

6.5. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo “Ministerio de Educación y Ciencia” (AGL 2006-04716/ALI) da Espanha e pela “Línea Especial – Nutrición, Obesidad y Salud” (LE/97) da “Universidad de Navarra”, Espanha. A. G. V. Costa foi financiado por bolsa de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (201834/2008-1) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Ministério de Educação do Brasil.

Tabela 6.1: Efeitos de diferentes tratamentos sobre a expressão de mRNA de quemerina durante a adipogênese

	D1	D2	D4	D8
Etanol	1,00 ^b ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	1,00 ^c ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00
TNFα (5 ng/mL)	1,72 ^b ± 0,26	1,72 ^a ± 0,27	0,84 ^c ± 0,09	0,12 ^d ± 0,00
TRO (10 μM)	1,32 ^b ± 0,08	1,74 ^a ± 0,23	2,15 ^b ± 0,30	0,45 ^c ± 0,19
TRO + TNFα	4,44 ^a ± 0,96	1,70 ^a ± 0,18	3,38 ^a ± 0,31	1,34 ^a ± 0,09
EPA (100 μM)	1,90 ^b ± 0,49	0,47 ^a ± 0,05	0,75 ^c ± 0,15	0,18 ^{c,d} ± 0,12
EPA 100 + TNFα	1,08 ^b ± 0,43	1,27 ^a ± 0,42	1,26 ^{b,c} ± 0,24	0,12 ^d ± 0,03
EPA (200 μM)	0,50 ^b ± 0,12	0,55 ^a ± 0,06	0,75 ^c ± 0,03	0,02 ^d ± 0,02
EPA 200 + TNFα	0,57 ^b ± 0,24	1,41 ^a ± 0,32	1,30 ^{b,c} ± 0,19	0,13 ^d ± 0,01
C8:0 (250 μM)	0,92 ^b ± 0,04	0,43 ^a ± 0,05	1,18 ^c ± 0,45	0,07 ^d ± 0,03
C8:0 250 + TNFα	0,72 ^b ± 0,30	1,65 ^a ± 0,30	1,10 ^c ± 0,20	0,12 ^d ± 0,02
C12:0 (250 μM)	1,95 ^b ± 0,24	1,23 ^a ± 0,42	0,88 ^c ± 0,07	0,04 ^d ± 0,01
C12:0 250 + TNFα	1,02 ^b ± 0,48	1,50 ^a ± 0,46	1,19 ^{b,c} ± 0,13	0,12 ^d ± 0,02

D: dia de diferenciação; EPA: Ácido eicosapentaenóico; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRO: Troglitazona. Dados expressos em media \pm erro padrão para cada dia de diferenciação. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

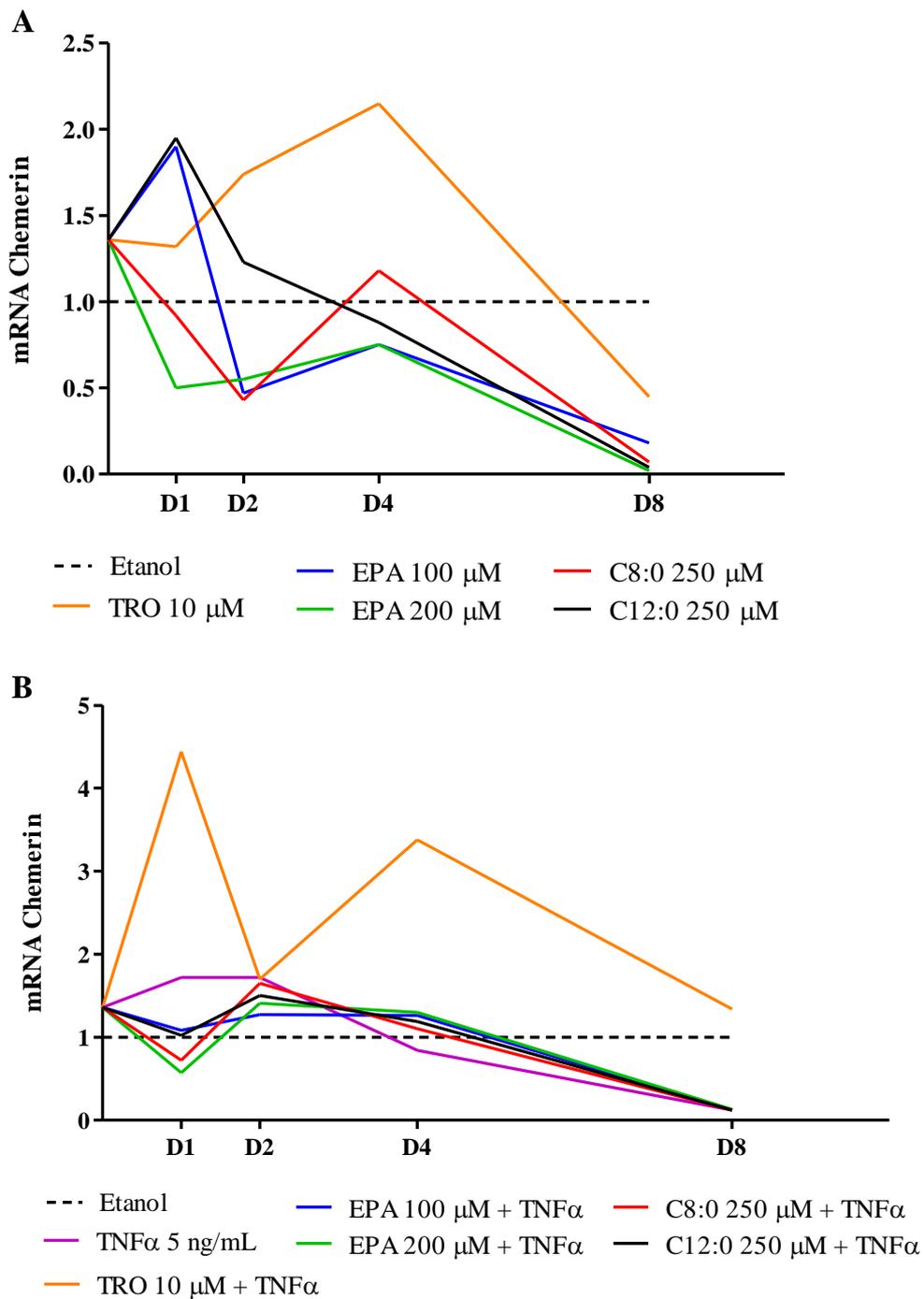


Figura 6.2: Evolução da expressão de mRNA de quemerina durante a diferenciação celular em função dos tratamentos. A) Efeito de tratamentos em ausência de coquetel de hormônios. B) Efeito de tratamentos, acrescidos de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), em presença de coquetel. O tratamento com etanol não foi acrescido de TNF α . EPA: Ácido eicosapentaenóico; TRO: Troglitazona.

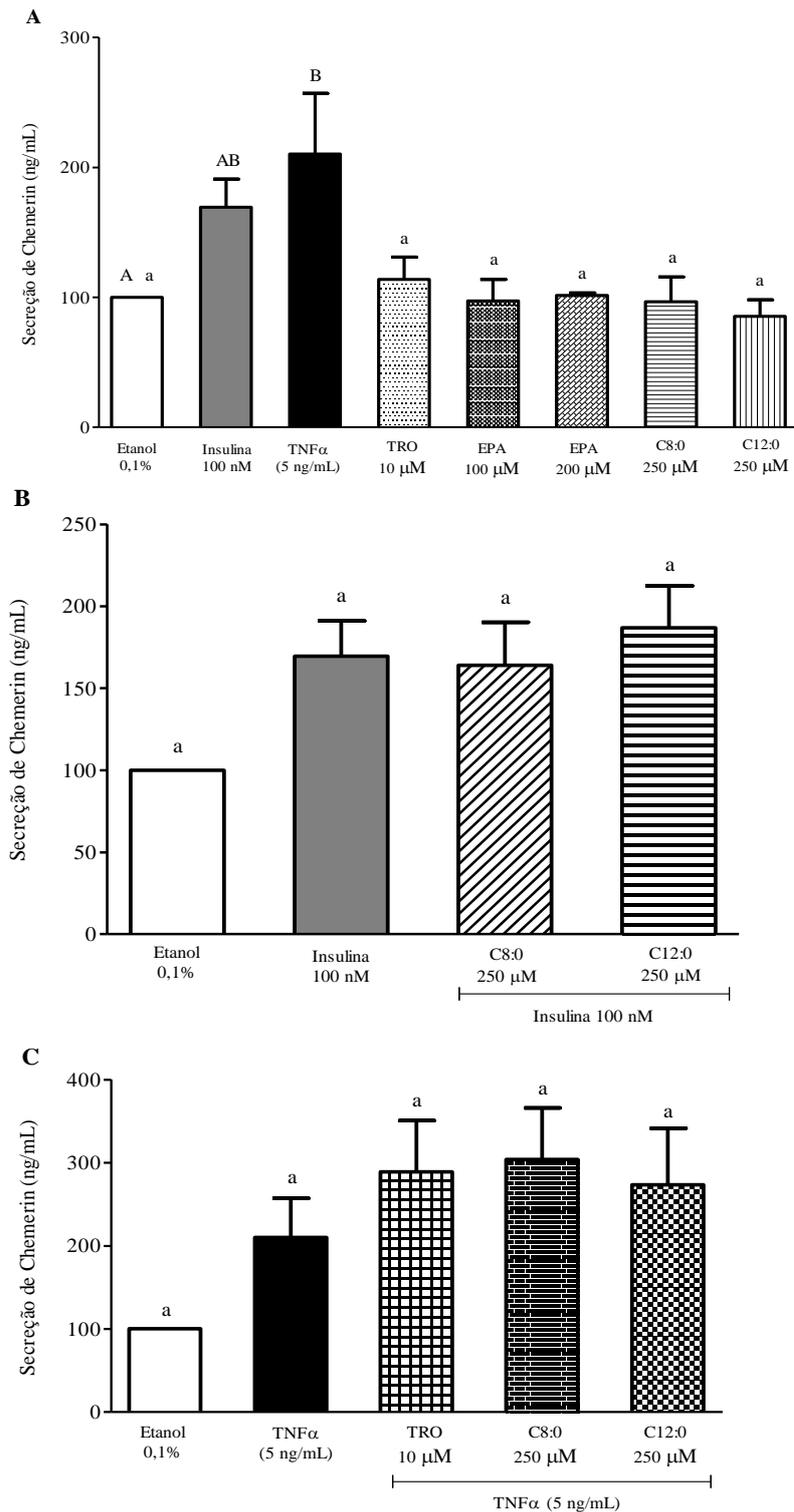


Figura 6.3: Efeito de diferentes substâncias sobre a secreção de quemerina em adipócitos 3T3-L1, após 24 horas de tratamento. A) Comparação entre etanol, insulina e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) representado por letras maiúsculas e comparação dos tratamentos frente ao etanol representados por letras minúsculas. B) Comparação entre tratamentos acrescidos de insulina frente ao etanol. C) Comparação entre tratamentos acrescidos de TNF α frente ao etanol. EPA: Ácido eicosapentaenóico; TRO: Troglitazona. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

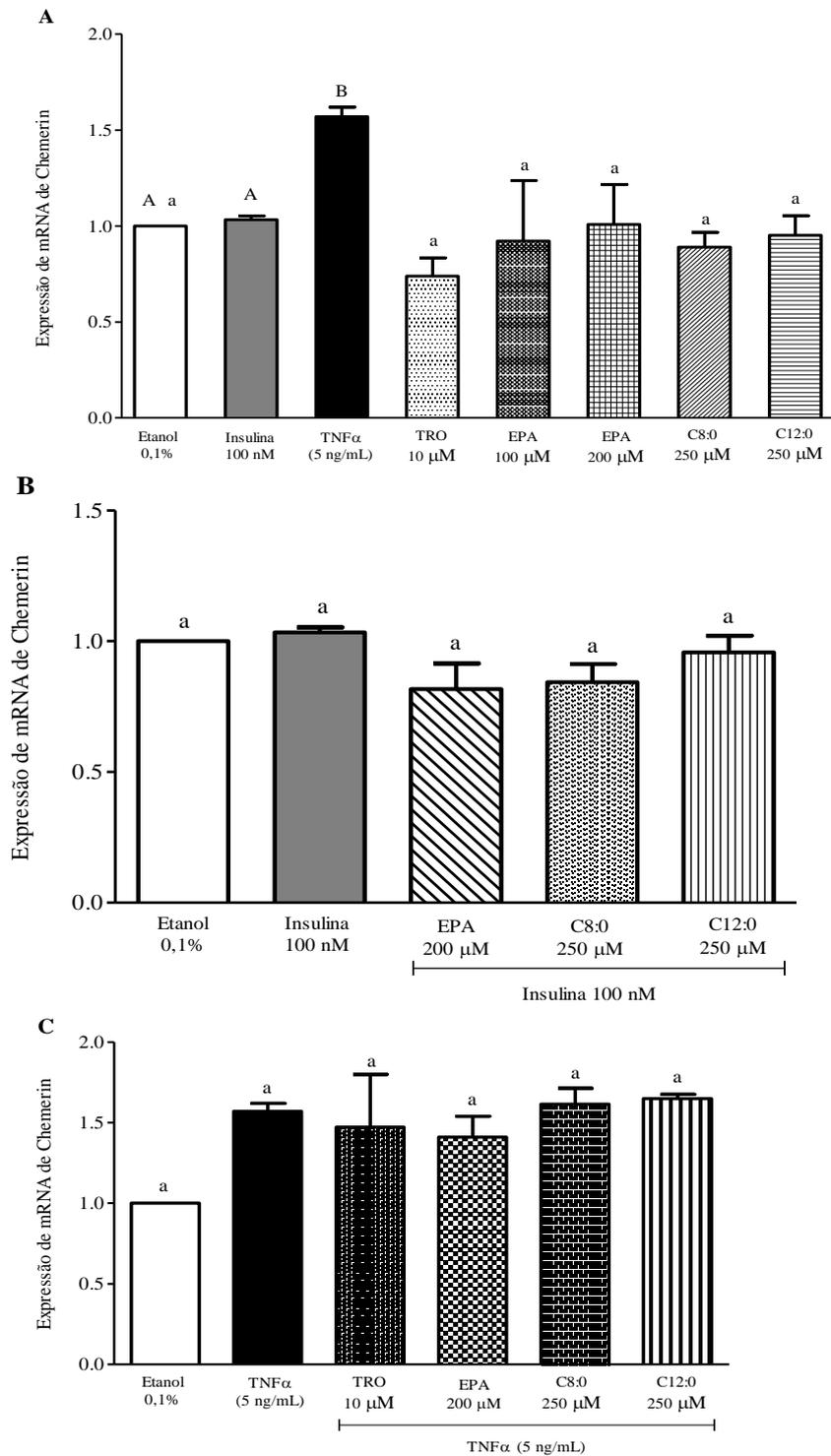


Figura 6.4: Efeito de diferentes substâncias sobre a expressão de mRNA de quemerina em adipócitos 3T3-L1, após 24 horas de tratamento. A) Comparação entre etanol, insulina e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) representado por letras maiúsculas e comparação dos tratamentos frente ao etanol representados por letras minúsculas. B) Comparação entre tratamentos acrescidos de insulina frente ao etanol. C) Comparação entre tratamentos acrescidos de TNF α versus etanol. EPA: Ácido eicosapentaenóico; TRO: Troglitazona. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

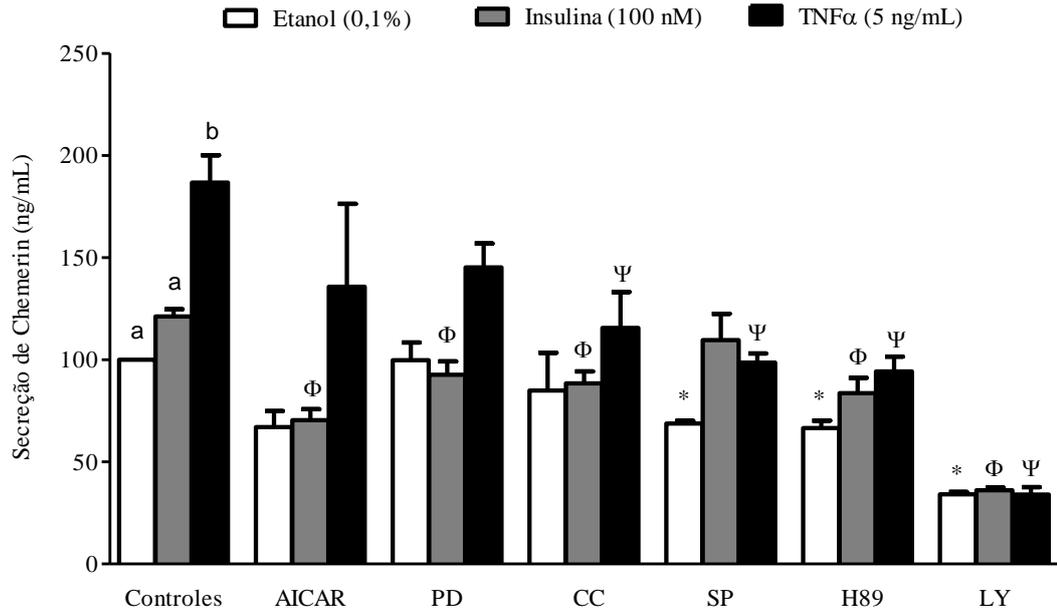


Figura 6.5: Efeito da adição de AICAR e de diferentes inibidores sobre a secreção de quemerina em adipócitos tratados com etanol (0,1%), TNF α (Fator de necrose tumoral alfa; 5 ng/mL) ou insulina (100 nM), durante 24 horas. *: diferença significativa entre tratamentos acrescidos de etanol versus controle etanol; Φ : diferença significativa entre tratamentos acrescidos de insulina versus controle insulina; ψ : diferença significativa entre tratamentos acrescidos de TNF α versus controle TNF α . AICAR: 5-amino-4-imidazole carboxamide-1-b-d-ribofuranoside (2 mM); LY: LY294002 (50 μ M); CC: Compound C (20 μ M); SP: SP600125 (20 μ M); PD: PD98059 (50 μ M) e H89 (20 μ M). Médias dos controles comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que letras diferentes indicam diferença estatística. Médias dos tratamentos frente aos respectivos controles foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

6.6. Referências Bibliográficas

Arita, M., F. Bianchini, et al. (2005). "Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1." J Exp Med **201**(5): 713-722.

Bays, H. E., J. M. González-Campoy, et al. (2008). "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(3): 343-368.

Bozaoglu, K., K. Bolton, et al. (2007). "Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome." Endocrinology **148**(10): 4687-4694.

Burdge, G. C. (2006). "Metabolism of [alpha]-linolenic acid in humans." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(3): 161-168.

Cawthorn, W. P. and J. K. Sethi (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology." FEBS Lett **582**(1): 117-131.

Guo, W., J. K. Choi, et al. (2000). "Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate." Biochem J **349**(Pt 2): 463-471.

Han, J., S. R. Farmer, et al. (2002). "Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes." J Nutr **132**(5): 904-910.

Han, J., J. A. Hamilton, et al. (2003). "Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats." Obes Res **11**(6): 734-744.

Hernandez-Morante, J. J., F. I. Milagro, et al. (2007). "Relationship among Adiponectin, Adiponectin Gene Expression and Fatty Acids Composition in Morbidly Obese Patients." Obes Surg **17**(4): 516-524.

Kahn, S. E., R. L. Hull, et al. (2006). "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nature **444**(7121): 840-846.

Lee, M. S., I. S. Kwun, et al. (2008). "Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes." Genes Nutr **2**(4): 327-330.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]CT$ Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lorente-Cebrian, S., M. Bustos, et al. (2010). "Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3T3-L1 adipocytes." Mol Nutr Food Res **54 Suppl 1**: S104-111.

MacDougald, O. A. and C. F. Burant (2007). "The Rapidly Expanding Family of Adipokines." Cell Metab **6**(3): 159-161.

Moreno-Aliaga, M. J. and F. Matsumura (1999). "Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein- α in 3T3-L1 cells." Molecular Pharmacology **56**(1): 91-101.

Nguyen, M. T., H. Satoh, et al. (2005). "JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **280**(42): 35361-35371.

Parlee, S. D., M. C. Ernst, et al. (2010). "Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α ." Endocrinology **151**(6): 2590-2602.

Patsouris, D., J. G. Neels, et al. (2009). "Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment." J Biol Chem **284**(45): 31223-31235.

Pérez-Echarri, N., P. Pérez-Matute, et al. (2008). "Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats." Br J Nutr: 1-9.

Perez-Matute, P., J. A. Martinez, et al. (2007). "Linoleic acid decreases leptin and adiponectin secretion from primary rat adipocytes in the presence of insulin." Lipids **42**(10): 913-920.

Perez-Matute, P., N. Perez-Echarri, et al. (2007). "Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha." Br J Nutr **97**(2): 389-398.

Roh, S.-g., S.-H. Song, et al. (2007). "Chemerin--A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor." Biochem Biophys Res Commun **362**(4): 1013-1018.

Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.

Sanosaka, M., T. Minashima, et al. (2008). "A combination of octanoate and oleate promotes in vitro differentiation of porcine intramuscular adipocytes." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **149**(2): 285-292.

SAS Institute Inc (2002). Version 9.1 SAS Statistical Software. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Sell, H., J. Laurencikiene, et al. (2009). "Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle Cells." Diabetes.

Stejskal, D., M. Karpisek, et al. (2008). "Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **152**(2): 217-221.

Tai, C. C. and S. T. Ding (2010). "N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention." J Nutr Biochem **21**(5): 357-363.

Takahashi, M., Y. Takahashi, et al. (2008). "Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes." FEBS Letters **582**(5): 573-578.

Takenouchi, T., Y. Takayama, et al. (2004). "Co-treatment with dexamethasone and octanoate induces adipogenesis in 3T3-L1 cells." Cell Biol Int **28**(3): 209-216.

Wang, J., X. Wu, et al. (2006). "Medium-chain Fatty Acids as Ligands for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR84." J Biol Chem **281**(45): 34457-34464.

Yang, J.-Y., M. A. Della-Fera, et al. (2009). "Regulation of adipogenesis by medium-chain fatty acids in the absence of hormonal cocktail." J Nutr Biochem **20**(7): 537-543.

7. CONCLUSÃO GERAL

Este estudo evidenciou que o EPA (100 ou 200 μM), o C8:0 (250 μM) e o C12 (250 μM), em adipogênese induzida por hormônios, não foram capazes de promover alteração na concentração de lipídios, avaliados por Oil Red-O, em células 3T3-L1.

O ácido eicosapentaenóico (EPA – C20:5 n3), durante a adipogênese espontânea, induziu a diferenciação de preadipócitos 3T3-L1, mas não alterou significativamente a expressão de genes transcripcionais da adipogênese. Em adipogênese induzida, o EPA acrescido TNF α desempenhou um efeito antiadipogênico, possivelmente potencializando a ação do TNF α para os genes DLK1, WNT10b, C/EBP α e PPAR γ e de forma independente ao TNF α para expressão dos genes C/EBP β e δ .

A incubação de células 3T3-L1 com 250 μM de ácido octanóico (C8:0) ou de ácido láurico (C12:0), em ausência de coquetel adipogênico, não promoveram a acumulação de lipídios. Entretanto, o ácido octanóico diminuiu a incorporação de lipídios durante a adipogênese induzida, quando acrescido de TNF α . Este efeito possivelmente foi devido a uma ação sinérgica do TNF α e do C8:0 no sentido de interferir negativamente na expressão de genes reguladores da adipogênese. Os ácidos graxos de cadeia média, em especial o C8:0, modularam a expressão de fatores adipogênicos transcripcionais clássicos (C/EPB β , δ e α e PPAR γ).

O presente estudo mostrou que a expressão de mRNA de quemerina diminuiu durante a adipogênese espontânea. Os ácidos graxos testados (100 e 200 μM de EPA, 250 μM de C8:0 e 250 μM de C12:0) aparentemente não influenciaram a secreção e expressão de quemerina. Verificou-se que o TNF α estimulou a secreção e expressão de mRNA de quemerina, possivelmente via PI3K.

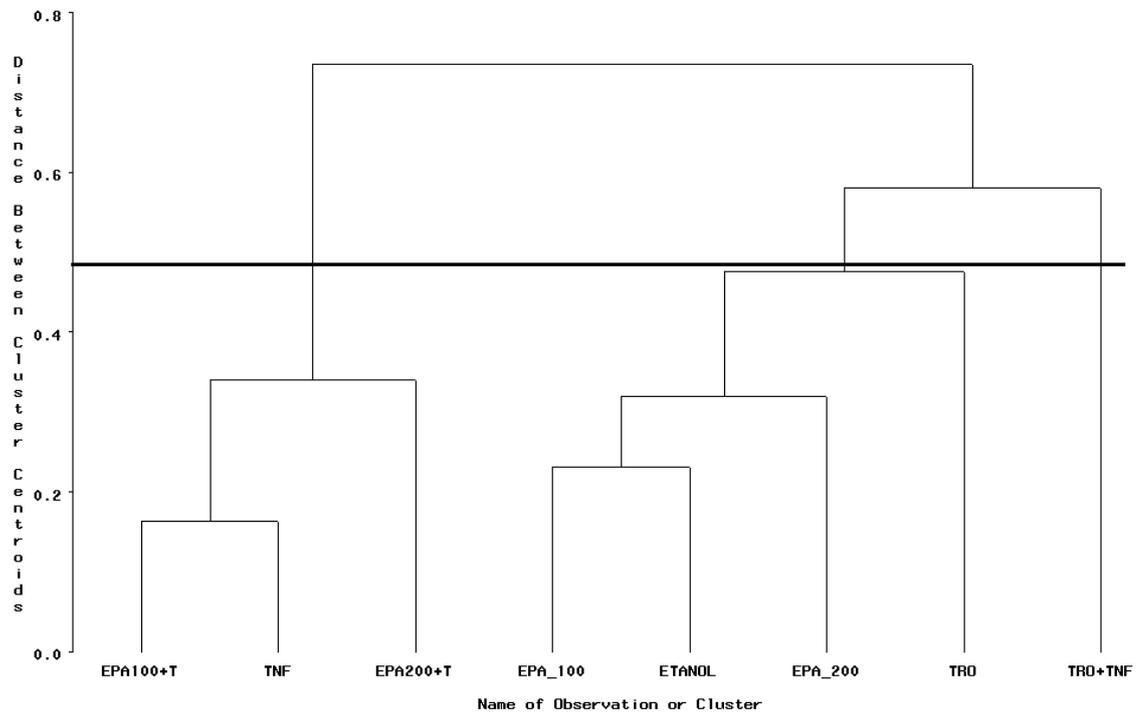
Por fim, a extrapolação dos resultados obtidos com modelos celulares *in vitro* deve ser realizada com cautela, uma vez que apresenta diferenças em relação aos modelos de cultivo primário de animais (ratos, camundongos e porcos) e de humanos. Além disso, por ser um modelo *in vitro*, obviamente diferente da situação em vivo.

8. ANEXOS

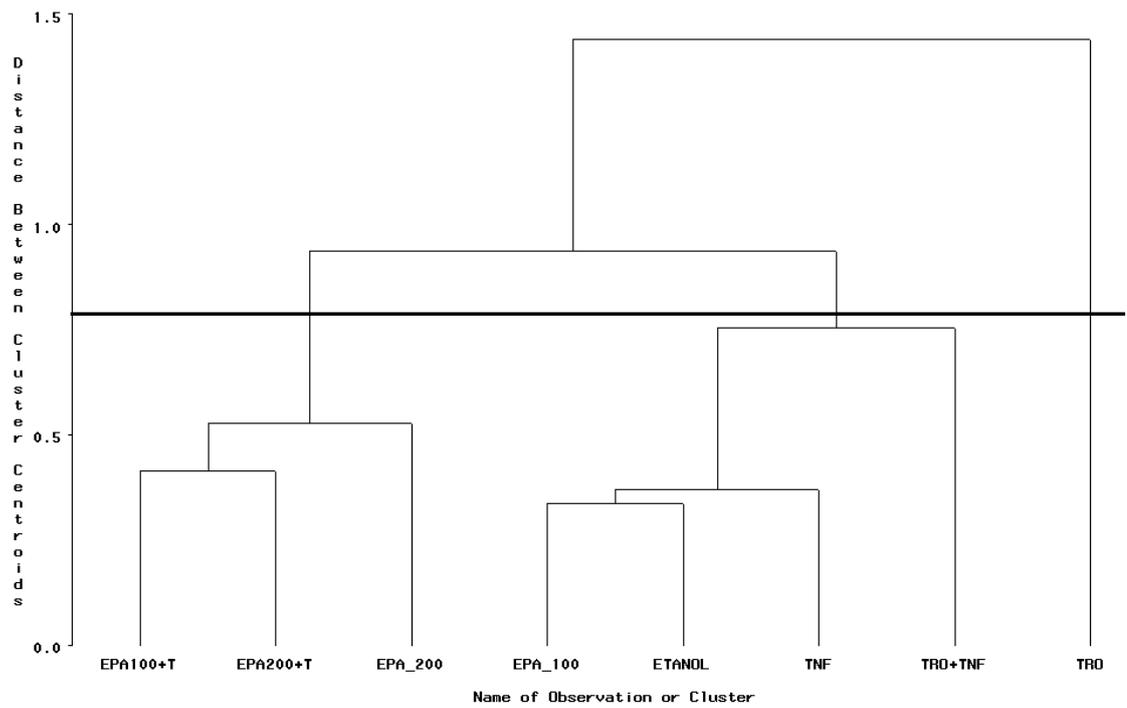
8.1. Anexos do Capítulo 2

EFEITO DO ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO SOBRE FATORES REGULADORES DA ADIPOGÊNESE EM CÉLULAS 3T3-L1

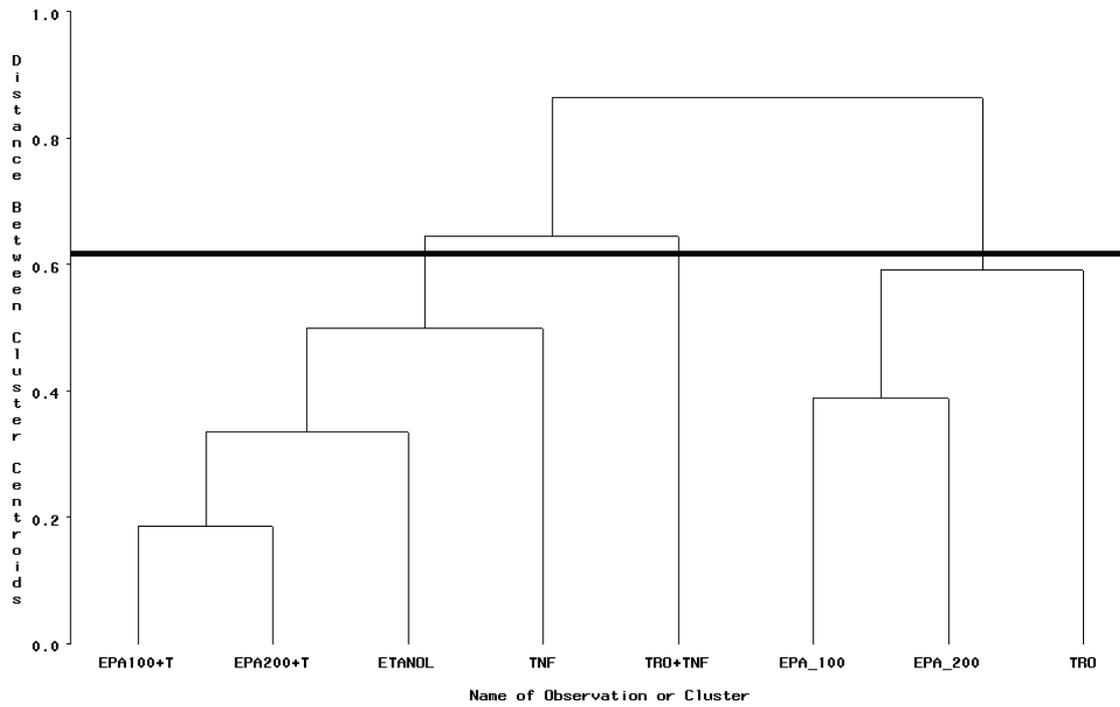
A) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE DLK1



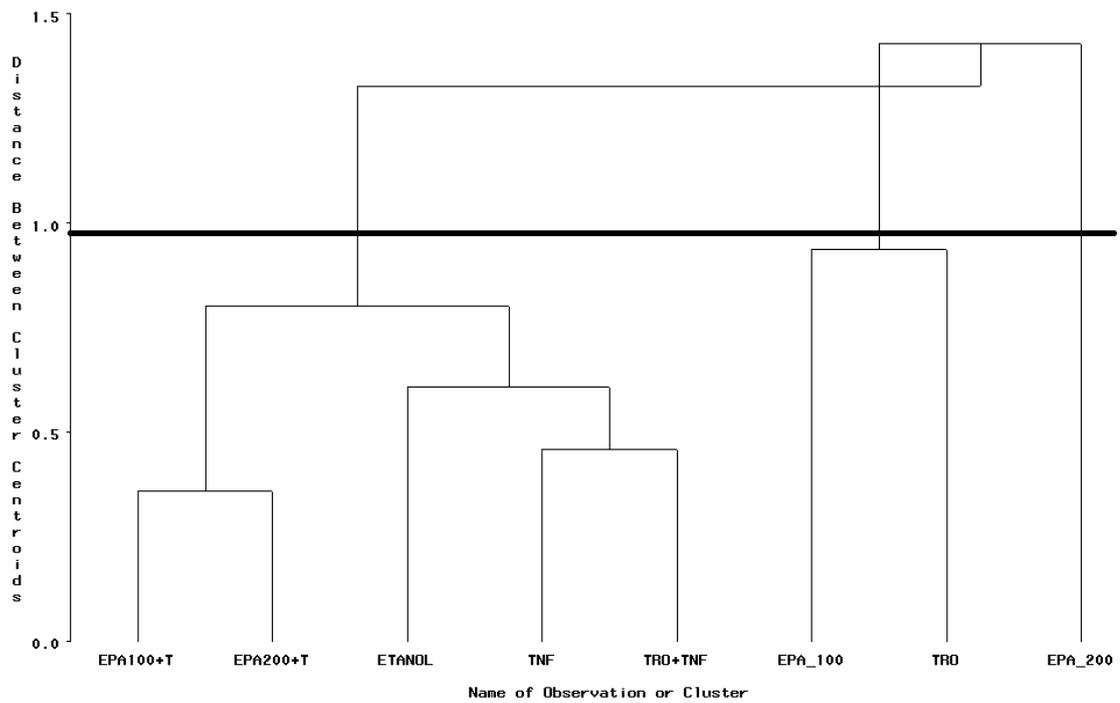
B) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE WNT10b



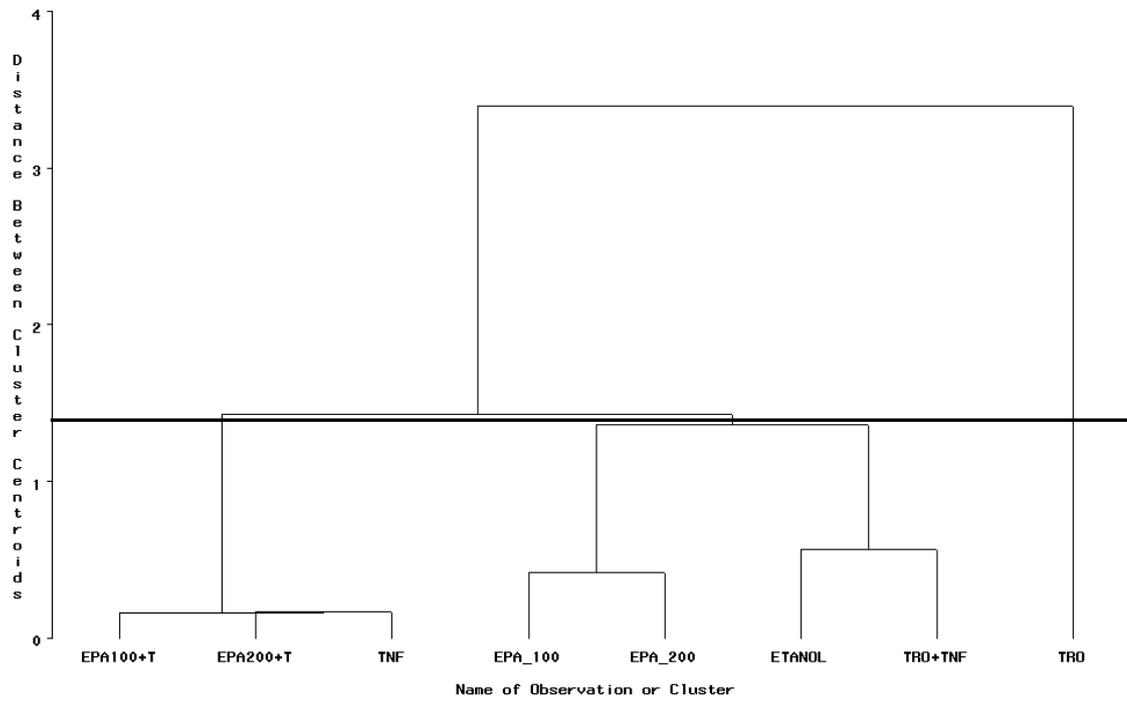
C) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE C/EBP δ



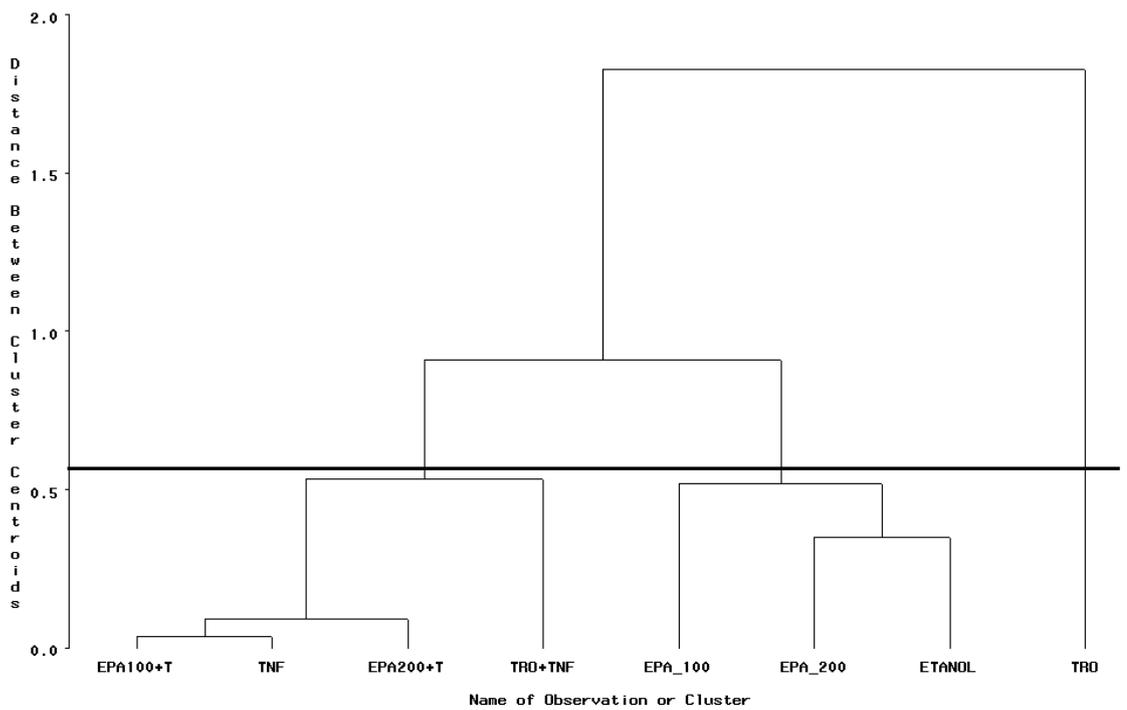
D) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE C/EBP β



E) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE C/EBP α



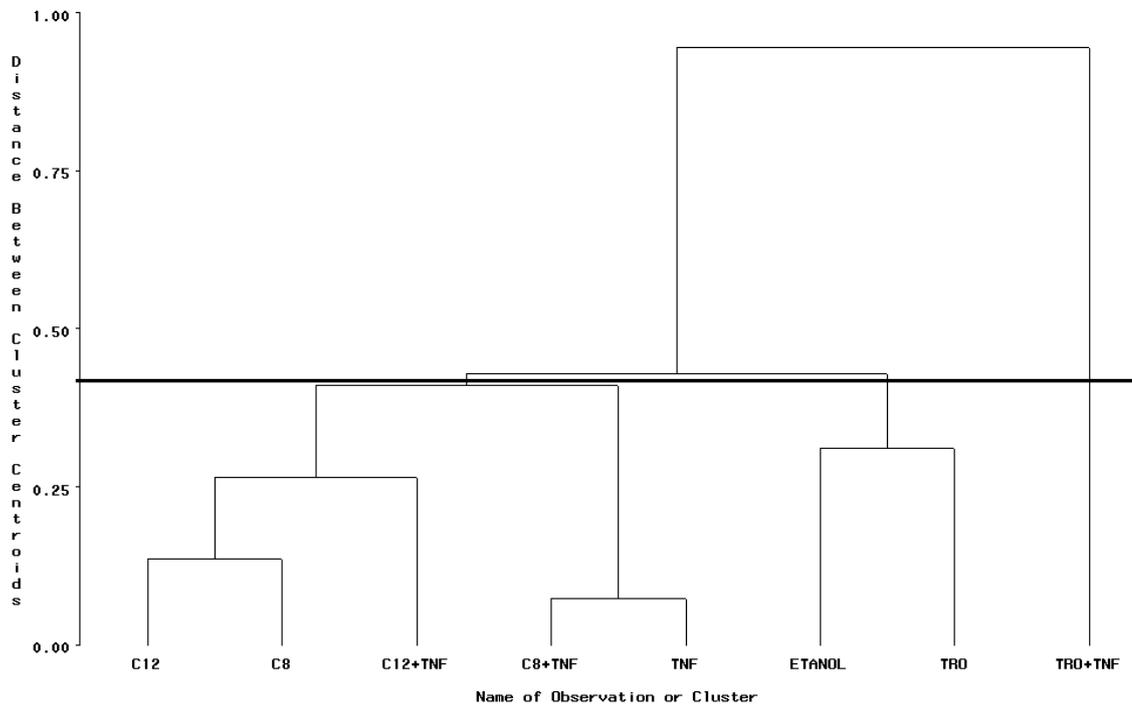
F) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE PPAR γ



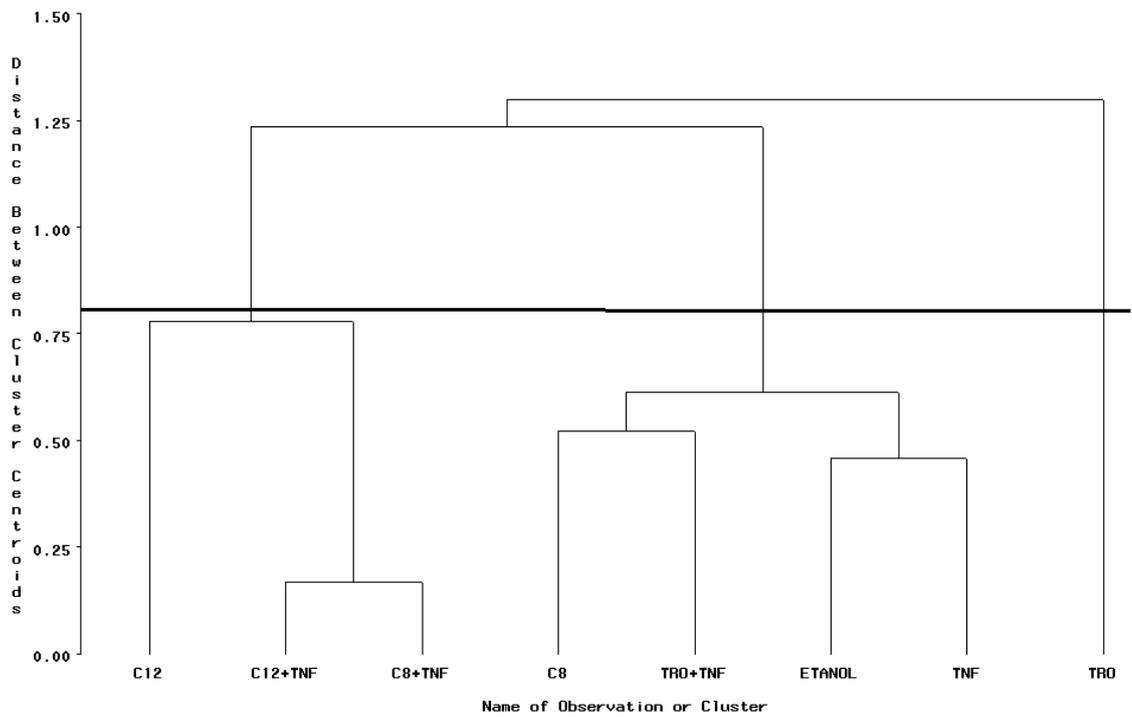
8.2. Anexos do Capítulo 3

ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA COMO REGULADORES DA ADIPOGÊNESE INDUZIDA E ESPONTÂNEA EM CÉLULAS 3T3-L1

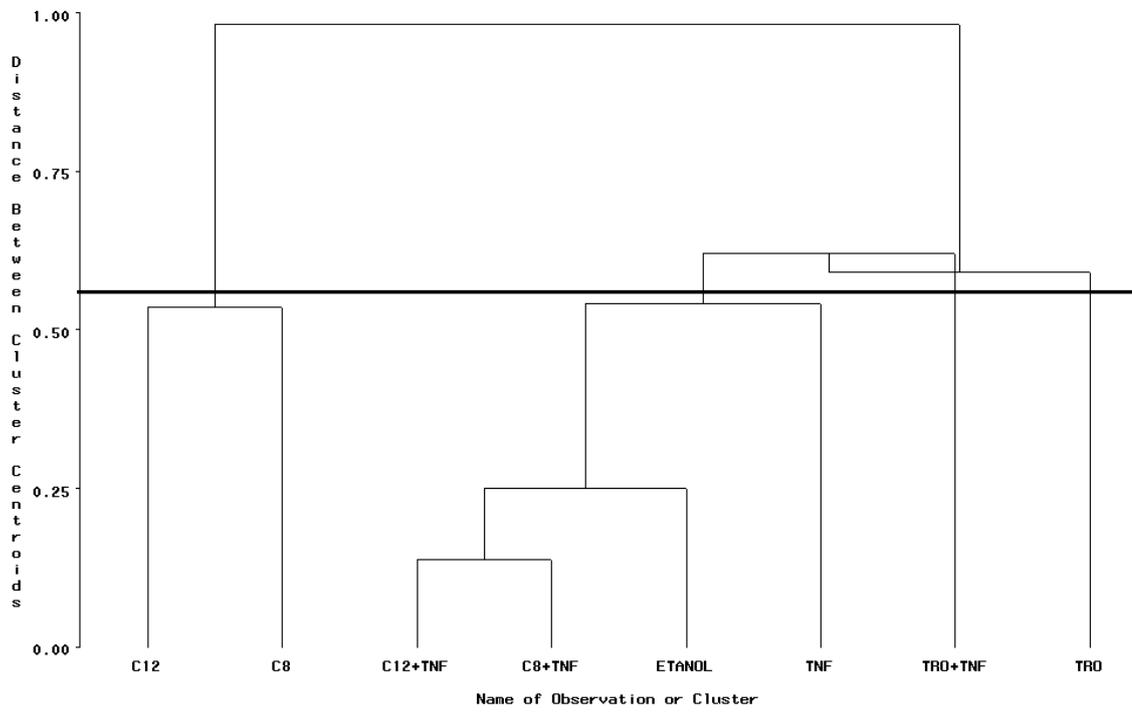
A) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE DLK1



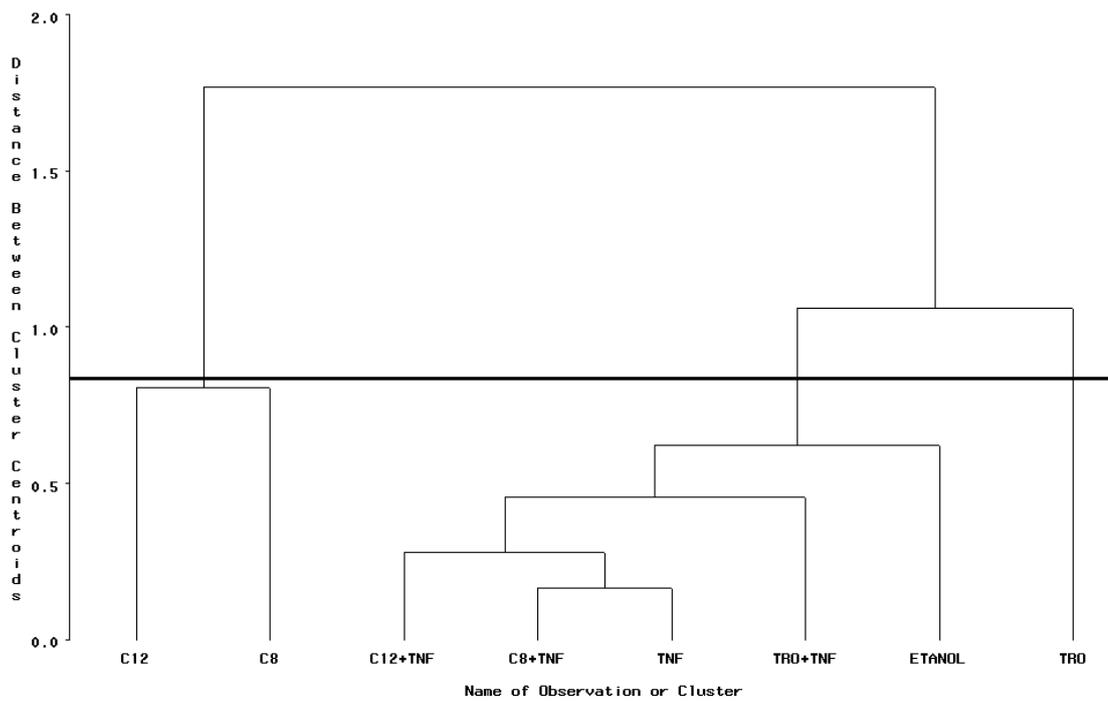
B) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE WNT10b



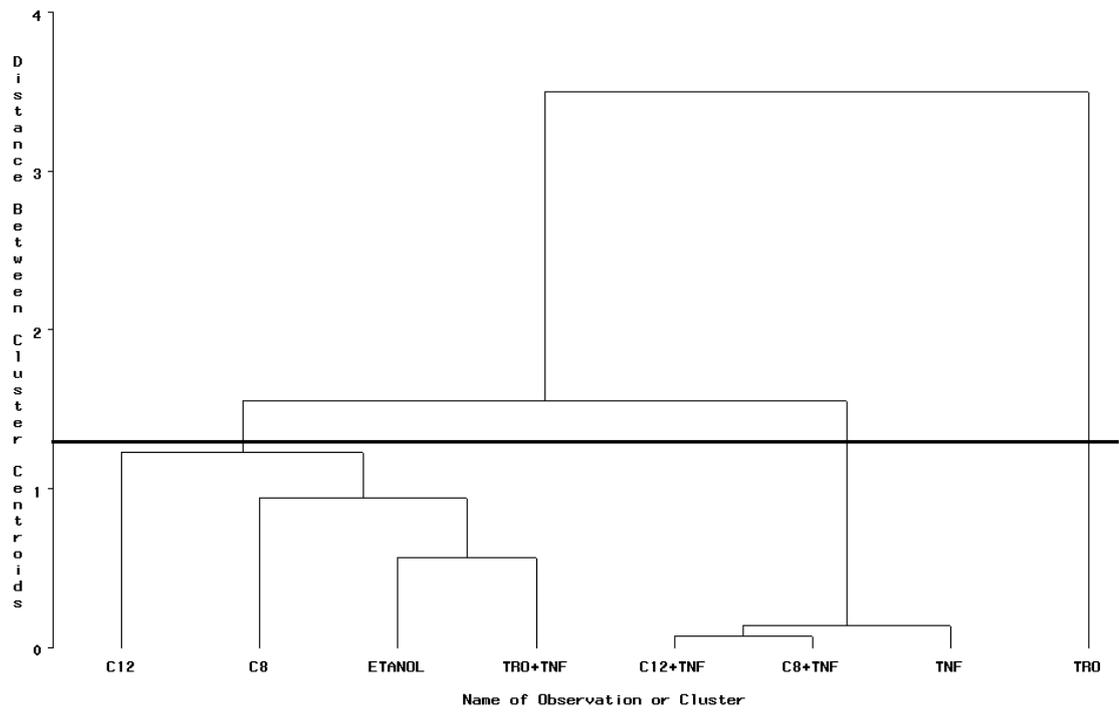
C) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE C/EBP δ



D) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE C/EBP β



E) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE C/EBP α



F) DENDOGRAMA DA EXPRESSÃO DE mRNA DE PPAR γ

