

Stella Lemke

**EXPRESSÃO GÊNICA DO PPAR α E ALTERAÇÕES SÉRICAS
E TECIDUAIS DE TRIGLICERÍDEOS EM RATOS
REALIMENTADOS COM FRUTOSE E TRATADOS COM ÓLEO
DE SALMÃO**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Mestre em Nutrição.
Orientador: Profa Dra. Vera Lúcia
Cardoso Garcia Tramonte.

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lemke, Stella

Expressão gênica do PPAR alfa e alterações séricas e teciduais de triglicerídeos em ratos realimentados com frutose e tratados com óleo de salmão [dissertação] / Stella Lemke ; orientadora, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte - Florianópolis, SC, 2012.

77 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Ômega 3. 3. Frutose. 4. PPAR alfa. 5. Perfil lipídico e triglicerídeos séricos. I. Tramonte, Vera Lúcia Cardoso Garcia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida.

À minha FAMILIA pelo afeto e pelos valores ensinados.

Ao meu NOIVO pelo amor.

Aos meus AMIGOS pela boa companhia, em especial à amiga KÁTIA JAKOVLJEVIC PUDLA.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA e ao PPROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO pela formação acadêmica, em especial ao PROFESSOR DAVID ALEJANDRO GONZÁLEZ-CHICA.

À PROFESSORA VERA LÚCIA CARDOSO GARCIA TRAMONTE pela confiança e pelo incentivo e ao LABORATÓRIO DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL pelo aprendizado e companheirismo.

Ao LABORATÓRIO DE ESTUDOS MOLECULARES EM NUTRIÇÃO E METABOLISMO da FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO/UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO pela oportunidade, pelo acolhimento e auxílio em todas as análises, em especial ao PROFESSOR HELIO VANNUCCHI e à amiga GABRIELA SALIM FERREIRA DE CASTRO por sua admirável orientação e disponibilidade.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR – CAPES - pela concessão da bolsa de estudos.

A TODOS que contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

A regulação do metabolismo lipídico é fundamental para a homeostase do organismo e um dos principais fatores de transcrição envolvidos neste processo é o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α). Diversas moléculas são capazes de ativá-lo, incluindo os ácidos graxos polinsaturados ômega 3. Alguns peixes, como o salmão, são boas fontes alimentares de ômega 3, portanto o objetivo do estudo foi investigar o efeito do consumo de óleo de salmão na expressão do gene PPAR α e na concentração de triglicerídeos séricos e hepáticos de ratos realimentados com dieta rica em frutose após jejum prolongado. Foram utilizados 31 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 180-200 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle (GC, n=8), Grupo Frutose (GF, n=7), Grupo Óleo de Salmão I (GSFI, n=8) e Grupo Óleo de Salmão II (GSFII, n=8). Após um período de adaptação, os grupos experimentais receberam, por sete dias, dieta com óleo de salmão como fonte lipídica. Em seguida, foram mantidos em jejum durante 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas. O grupo GSFII difere do GSFI por ter recebido dieta com óleo de salmão antes e após a realimentação com frutose. As rações experimentais foram preparadas segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G. Ao final dos 17 dias de experimento os animais foram sacrificados por decapitação e foram coletadas amostras de sangue e tecido hepático para análises bioquímicas e moleculares. O tecido adiposo (epididimal e retroperitoneal) foi removido e pesado para comparação entre grupos. Os dados foram analisados por meio do software STATA 11.0, considerando como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. O teste estatístico para comparação entre grupos foi o teste ANOVA ou *Kruskall-Wallis*, dependendo das características da variável de desfecho, com pós-teste de Bonferroni. A dieta rica em frutose foi capaz de aumentar a gordura hepática total nos animais e o óleo de salmão foi efetivo em reduzir este mesmo efeito. No entanto, não houve diferença em relação à concentração de triglicerídeos hepáticos. Também não houve influência no perfil lipídico sérico, exceto para a fração HDL-c, que apresentou redução nos animais que consumiram a dieta rica em frutose. A expressão do gene PPAR α não apresentou diferença entre os grupos. Assim, conclui-se que neste estudo o óleo de salmão apresenta benefícios, principalmente em relação à redução da gordura total hepática, o que pode contribuir para a melhora da saúde cardiovascular.

Palavras-chave: Ômega 3. Frutose. PPAR α . Metabolismo lipídico. Realimentação.

ABSTRACT

The regulation of lipid metabolism is essential for the organism homeostasis and a major transcription factor involved in this process is the peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPAR α). Several molecules are able to activate it, including omega 3 polyunsaturated fatty acids. Some fish, like salmon, are good food sources of omega 3, so the aim of this study was to investigate the effect of salmon oil consumption in PPAR α gene expression and serum and liver triglycerides concentration in rats refed with a fructose rich diet after prolonged fasting. Male *Wistar* rats, weighing 180-200 g, were housed in individual cages and randomly distributed in four groups: Control (CG, n = 8), Fructose (GF, n = 7), Salmon Oil I (GSFI, n = 8) and Salmon Oil II (GSFII, n = 8). After an adaptation period, the experimental groups received, for seven days, salmon oil diet as a lipid source. Then, they were fasted for 48 hours and refed with a fructose rich diet by 24 hours. The group GSFII differs from GSFI for receiving the diet with salmon oil before and after refeeding with fructose. The experimental diets were prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition for the AIN-93G diet. At the end of 17 days of experiment the animals were euthanized by decapitation and blood and liver samples were collected for biochemical and molecular analyzes. Adipose tissue (epididymal and retroperitoneal) were removed and weighed for comparison among groups. Data were analyzed using STATA 11.0, considering statistically significant p value <0.05. Comparisons between groups were made by ANOVA or Kruskal-Wallis test, with Bonferroni post-test. A fructose rich diet was able to increase the total fat in liver and the salmon oil was effective in reducing this parameter. However, there was no difference in liver triglycerides concentration. There was also no influence on serum lipid profile, except for HDL-c, which showed a decrease in animals that consumed the fructose rich diet. The expression of PPAR α did not differ among groups. Thus, is concluded that in this study the salmon oil has benefits especially in terms of reducing the total fat liver, which may contribute to improve cardiovascular health.

Keywords: Omega 3. Fructose. PPAR α . Lipid metabolism. Refeeding.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
APO	Apolipoproteínas
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FI	Fator de impacto
GLUT	Transportador de glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
n3 ou ω 3	Ácido graxo polinsaturado ômega 3
n6 ou ω 6	Ácido graxo polinsaturado ômega 6
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPAR α	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
PPRE	Elemento de resposta do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados

QM	Quilomícrons
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RXR	Receptor de retinóide X
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Mecanismo de transcrição do PPAR.....	26
Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos das classes ômega 3 e 6.....	29
Figura 3 – Protocolo experimental.....	37

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1 – Gel do produto purificado de PCR (qualitativo) do gene de estudo.....	50
Figura 2 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre expressão gênica de PPAR α no tecido hepático dos animais experimentais. Florianópolis, 2012.....	61

LISTA DE QUADROS

DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Composição das dietas dos grupos experimentais na fase de adaptação.....	39
Quadro 2 - Composição das dietas dos grupos experimentais na fase de intervenção com óleo de salmão.....	39
Quadro 3 - Composição das dietas dos grupos experimentais na fase de realimentação.....	40
Quadro 4 - Quantificação e análise da pureza do RNA extraído das amostras de fígado dos animais experimentais.....	75
Quadro 5 – Quantificação e análise da pureza do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das amostras de fígado dos animais experimentais.....	76
Quadro 6 – Valores de CT e determinação do <i>Fold Change</i> das amostras analisadas.....	79

LISTA DE TABELAS

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos (%) dos óleos de soja e de salmão utilizados no preparo das dietas experimentais. Florianópolis, 2012.....	51
Tabela 2 – Média do ganho de peso (g) ao final do experimento e variação de peso (g) dos grupos experimentais nos diferentes períodos do ensaio biológico. Florianópolis, 2012.....	53
Tabela 3 – Consumo médio diário de ração (g/dia) pelos grupos experimentais nos diferentes períodos do ensaio biológico. Florianópolis, 2012.....	54
Tabela 4 - Valores médios de gordura hepática total (g/100g tecido), peso absoluto (g) dos tecidos hepático e adiposo (epididimal e retroperitoneal) e razão entre o peso dos tecidos hepático e adiposo e o peso corporal. Florianópolis, 2012.....	57
Tabela 5 – Perfil lipídico sérico (mg/dL) e triglicerídeos hepáticos (mg/g tecido) dos grupos experimentais. Florianópolis, 2012.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 METABOLISMO DE TRIGLICERÍDEOS E EXPRESSÃO GÊNICA	23
2.2 RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA ALFA.....	25
2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS E ÓLEO DE SALMÃO	28
2.4 MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDO.....	30
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MÉTODOS	37
4.1 INSERÇÃO DO ESTUDO.....	37
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
4.3 ENSAIO BIOLÓGICO.....	37
4.3.1 Animais e Grupos Experimentais	37
4.3.2 Rações Experimentais	38
4.3.3 Sacrifício e Coleta de Tecidos dos Animais Experimentais	40
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA TOTAL.....	40
4.5 ANÁLISE DE LIPÍDIOS SÉRICOS E HEPÁTICOS	41
4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PPARA.....	41
4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE SALMÃO.....	43
4.8 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	44
4.9 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	44
5 ARTIGO ORIGINAL	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
ANEXOS	71
ANEXO A – DADOS REFERENTES ÀS ANÁLISES MOLECULARES.....	71
ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	76
APÊNDICES	77
APÊNDICE A – NOTA DE IMPRENSA.....	77

1 INTRODUÇÃO

Nutrientes presentes na dieta podem modular o processo de expressão gênica por diferentes mecanismos. A regulação dos processos metabólicos, em especial do metabolismo lipídico, é essencial para a homeostase do organismo e efeitos da interação gene-nutriente parecem ter um impacto importante na promoção da saúde e prevenção de doenças (FIALHO; MORENO; ONG, 2008).

Um dos principais fatores de transcrição envolvido na regulação do metabolismo lipídico é o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), que está vinculado ao processo de oxidação de ácidos graxos pelo fígado (REDDY, 2001; JUMP *et al*, 2008). Diversas moléculas são capazes de ativá-lo, incluindo os ácidos graxos polinsaturados ômega 3 (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

O óleo de salmão, assim como os demais óleos de peixes marinhos, é rico em ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) e vem sendo utilizado na prática clínica sob alegação de reduzir os níveis plasmáticos de triglicerídeos, promovendo melhora da saúde cardiovascular (BALK *et al*, 2006; HOOPER *et al*, 2008; ESLICK *et al*, 2009).

Definida como distúrbio do metabolismo lipídico, a hipertrigliceridemia se caracteriza pela elevação da concentração dos triglicerídeos sanguíneos (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007) e é considerada um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, problema de saúde pública que representa a primeira causa de morte no Brasil e no mundo (BRASIL, 2009, WHO, 2012).

Os modelos experimentais para estudo do metabolismo lipídico incluem animais geneticamente modificados e modelos dietéticos, entre outros (FAN; QIAO, 2009). A oferta excessiva de carboidratos simples constitui uma alteração dietética capaz de induzir a hipertrigliceridemia (MEIRELLES *et al*, 2011). A oferta aguda de alto teor de frutose na alimentação de ratos mantidos em jejum é capaz de ocasionar mudanças hepáticas, causando um acúmulo de triglicerídeos no fígado (CASTRO *et al*, 2011).

A frutose é um monossacarídeo rapidamente absorvido e metabolizado pelo fígado. Sua absorção independe da insulina e ocorre pela ação dos transportadores GLUT 5 (enterócitos) e GLUT 2 (hepatócitos) (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005). O consumo excessivo de frutose estimula a lipogênese e o acúmulo de triglicerídeos, uma vez que no fígado a frutose é metabolizada em frutose 1-fosfato que é convertida em gliceraldeído e diidroxiacetona

fosfato, a qual pode ser reduzida a glicerol 3-fosfato, precursor da síntese de triglicerídeos (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005).

O estado de restrição e realimentação também aparece como modelo para estudos do metabolismo lipídico em função das alterações decorrentes da lipólise e lipogênese. Mudanças na disponibilidade de nutrientes exigem adaptações hormonais e metabólicas para garantir a manutenção da homeostase energética (PALOU *et al*, 2008).

Ante o exposto, o objetivo do estudo foi investigar o efeito do consumo de óleo de salmão na expressão do gene PPAR α e na concentração de triglicerídeos séricos e hepáticos de ratos realimentados com dieta rica em frutose após jejum prolongado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os artigos incluídos na revisão de literatura foram selecionados em pesquisa nas bases de dados BIREME (Biblioteca Regional de Medicina/ Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde) e PubMed/MEDLINE (*US National Library of Medicine*).

2.1 METABOLISMO DE TRIGLICERÍDEOS E EXPRESSÃO GÊNICA

Os lipídios são macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo e estão relacionados ao metabolismo energético (LEE; OLSON; EVANS, 2003). Os triglicerídeos são os principais lipídios da dieta e atuam como depósito energético no organismo (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). São formados pela ligação de uma molécula de glicerol a três moléculas de ácidos graxos e se caracterizam como compostos apolares, insolúveis em meio aquoso e solúveis em solventes orgânicos (MURRAY *et al*, 2006).

As lipoproteínas permitem a solubilização e transporte destes lipídios no sangue. São compostas por apolipoproteínas e se diferenciam em tamanho, densidade e composição química. As principais classes de lipoproteínas incluem: os quilomícrons (QM), as lipoproteínas de densidade muito baixa ou *very low density lipoprotein* (VLDL) e as partículas remanescentes, também denominadas lipoproteínas de densidade intermediária ou *intermediary density lipoprotein* (IDL) - as quais são ricas em triglicerídeos, maiores e menos densas - e as lipoproteínas ricas em colesterol, de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL) e densidade alta ou *high density lipoprotein* (HDL) (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Os triglicerídeos podem ser derivados da dieta (via exógena) ou da síntese hepática (via endógena) (YUAN; AL-SHALI; HEGELE, 2007; BAYS *et al*, 2008). Os QM transportam os lipídios oriundos da dieta do intestino aos tecidos periféricos, sendo seus remanescentes retirados da circulação pelo fígado. No fígado há produção de VLDL, lipoproteína responsável pelo transporte dos triglicerídeos, oriundos da via endógena, do fígado para os tecidos extra-hepáticos. A VLDL é precursora da IDL, a qual pode ser captada pelo fígado ou ser convertida em LDL. A LDL é composta principalmente por colesterol, sendo considerada a principal lipoproteína aterogênica. A HDL, por sua vez, no processo conhecido como transporte reverso do colesterol, é

responsável por remover o excesso de colesterol dos tecidos para o fígado, onde será catabolizado (MURRAY *et al*, 2006, BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

Distúrbios no metabolismo lipídico constituem importantes agravos à saúde e podem contribuir para o aumento da incidência de obesidade, dislipidemia, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (LEE; OLSON; EVANS, 2003).

A hipertrigliceridemia, dislipidemia que reflete o aumento da concentração das lipoproteínas ricas em triglicerídeos no sangue, pode ser classificada, de acordo com a sua etiologia, em primária, quando decorrente de alterações genéticas, ou secundária, quando consequência de alguma doença, tratamento medicamentoso ou estilo de vida inadequado (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). Em relação ao estilo de vida, destaca-se o papel da qualidade da dieta no desenvolvimento da doença.

A Organização Mundial da Saúde afirma que a alta ingestão dietética de gordura saturada, gordura *trans*, colesterol e sal, e a baixa ingestão de frutas, legumes e peixe aumenta o risco cardiovascular. Em contrapartida, uma dieta balanceada representa fator de proteção e pode contribuir para um peso corporal e um perfil lipídico mais saudável (WHO, 2011).

O fenótipo da hipertrigliceridemia, assim como todas as características físicas ou traços observáveis de um organismo, é produzido a partir de expressões gênicas. A expressão gênica se caracteriza pela transferência de informação genética e é iniciada e regulada por processos especializados (FOGG-JOHNSON; KAPUT, 2003).

O ácido desoxirribonucléico (DNA) por meio das etapas de transcrição (produção de RNA a partir do DNA) e tradução (produção de proteína a partir do RNA) sintetiza um produto gênico funcional, denominado proteína, a qual irá determinar a função biológica de cada célula (CAMPBELL, 2000).

A informação contida no DNA capaz de codificar uma proteína denomina-se gene, o qual possui uma região promotora (sinaliza o início da transcrição), uma região codificadora (sequência de nucleotídeos de DNA que é copiada em uma molécula de RNA) e uma região terminadora (sinaliza o término da transcrição). Assim, o processo de transcrição pode ser subdividido em três momentos: iniciação, alongamento e terminação. Resumindo, a enzima RNA polimerase abre a dupla hélice do DNA e inicia a produção de uma molécula de RNA mensageiro, complementar a fita molde de DNA. Os nucleotídeos são

ligados respeitando o pareamento adenina-uracila e guanina-citosina. Ao final da transcrição a RNA polimerase se desliga do DNA, a molécula de RNA formada segue para o citoplasma onde será traduzida. No citoplasma, cada sequência de 3 nucleotídeos do RNA, denominada códon, codifica um aminoácido (MACFARLANE, 2000).

A transcrição é o ponto de controle dominante na produção de qualquer proteína (MACFARLANE, 2000). Nutrientes presentes na dieta podem modular o processo de expressão dos genes e um dos principais mecanismos envolve a regulação direta da etapa de transcrição, na qual o nutriente se liga diretamente ao fator de transcrição no núcleo, o qual se ativa e inicia o processo transcricional. (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). É o que ocorre com os ácidos graxos polinsaturados ômega 3 na ativação do PPAR α (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

O estudo da nutrigenômica, como um conjunto de tecnologias para a geração, processamento e aplicação de informação científica, criou a oportunidade de ampliar a compreensão sobre a interação gene-nutriente e sua influência no metabolismo celular e controle homeostático do indivíduo. Futuramente, as intervenções dietéticas para promoção da saúde e prevenção de doenças poderão ser baseadas em evidências moleculares. No entanto, ao mesmo tempo em que esta ciência gera grandes expectativas, seu progresso é bastante lento e enfrenta desafios, como os tecnológicos e financeiros (AFMAN; MULLER, 2006).

2.2 RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA ALFA

O crescente avanço nos índices de obesidade, síndrome metabólica e complicações associadas, tem aumentado o interesse em pesquisas sobre expressão gênica e receptores nucleares, que estão relacionados à composição corporal, perfil lipídico e sensibilidade à insulina (ALAYNICK, 2008).

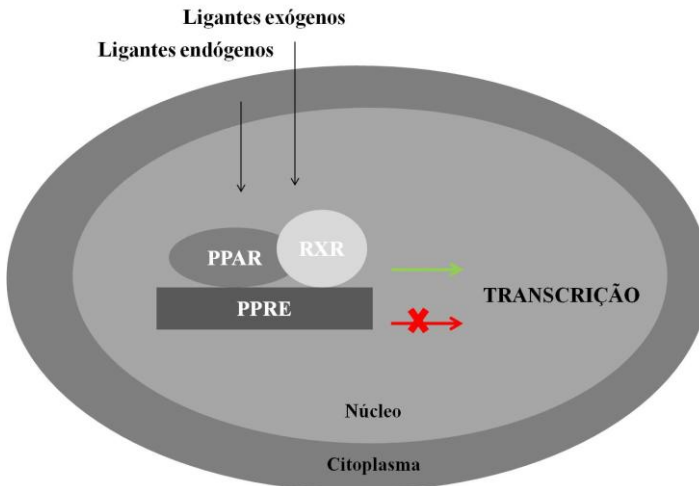
O fígado é o órgão central do metabolismo energético e, portanto, determinante para a homeostase do organismo. O metabolismo lipídico hepático envolve, principalmente, os processos de lipogênese e oxidação de ácidos graxos (PYPER *et al.*, 2010). A regulação desses processos ocorre pela ação de fatores de transcrição, tais como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), que está vinculado ao processo de oxidação de ácidos graxos pelo fígado, e a proteína de

ligação ao elemento regulador de esterol 1(SREBP-1), que controla a expressão de genes envolvidos na lipogênese (JUMP *et al*, 2008).

A SREBP-1 está envolvida na síntese de lipídios e parece estar relacionada à resistência à insulina e à esteatose hepática. É expressa principalmente no fígado, tecido adiposo branco, músculo esquelético, glândula suprarrenal e cérebro. Sua expressão está suprimida durante o jejum, mas aumenta acentuadamente em animais que são realimentados com dieta rica em carboidratos (EBERLÉ *et al*, 2004).

Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma são membros da superfamília de receptores nucleares hormonais e modulam a expressão gênica em resposta a estímulos nutricionais, farmacológicos e/ou ambientais. Atuam como fatores de transcrição regulando a expressão de genes que contenham elementos de resposta específicos, chamados PPRES. O receptor de retinóide X (RXR) se liga ao PPAR e ligantes endógenos e/ou exógenos, naturais (ácidos graxos e eicosanóides) e/ou sintéticos (fibratos) se unem ao heterodímero PPAR/RXR, que reconhece o PPRES na região promotora do gene-alvo, induzindo uma resposta específica (figura 1) (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

Figura 1 – Mecanismo de transcrição do PPAR.
Adaptado de KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005.



São conhecidas três isoformas: PPAR α , PPAR γ e PPAR δ/β . Todas possuem características estruturais semelhantes, mas são codificadas por genes distintos e expressas em tecidos específicos (BERGER; AKIYAMA; MEINKE, 2005).

O PPAR α é expresso principalmente em tecidos metabólicos como fígado, rim, coração, músculo esquelético e tecido adiposo marrom. Sua ação é mediada através do aumento da captação e ativação do catabolismo de lipídios, pela modulação transcricional de genes envolvidos neste processo (BERGER; AKIYAMA; MEINKE, 2005). Desempenha, portanto, papel fundamental na distribuição e concentração dos lipídios no sangue (DAVIDSON; ROTONDO, 2000).

A expressão do PPAR α é ativada por ácidos graxos polinsaturados e em situações de jejum, sendo inibida pela insulina (NAGAI *et al*, 2002). Os principais efeitos hipolipidêmicos dos ácidos graxos insaturados na ativação do PPAR α compreendem o aumento da hidrólise das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, a redução da síntese de VLDL e o estímulo à β -oxidação (FERNANDEZ; WEST, 2005). A regulação dos principais genes-alvo pelo PPAR α inclui o aumento da produção das apolipoproteínas AI e AII (componentes da fração HDL-c) e da lipase lipoprotéica (enzima responsável pela hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos) e a redução da produção da apolipoproteína CIII (importante inibidor da lipase lipoprotéica) (PYPER *et al*, 2010).

Situações de estresse ou jejum também resultam na síntese aumentada de PPAR α nos hepatócitos (DESVERGNE; WAHLI, 1999). O estado de jejum prolongado promove um perfil hormonal catabólico, que induz a hidrólise de triglicerídeos no tecido adiposo, aumentando a concentração de ácidos graxos livres no plasma. Estes ácidos graxos são transportados para o fígado, onde serão oxidados na matriz mitocondrial via β -oxidação (KERSTEN *et al*, 1999).

Na β -oxidação os ácidos graxos são degradados pela remoção sequencial de duas unidades de carbono, na forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA), para ser utilizado no ciclo de Krebs ou para formação de corpos cetônicos, proporcionando uma fonte alternativa de energia para os tecidos periféricos. Se o ácido graxo for insaturado, o processo requer etapas enzimáticas adicionais. Se for saturado, pode seguir com o processo normal de oxidação. A quantidade de acetil-CoA gerada dependerá do tamanho da cadeia de carbonos. A oxidação de um ácido graxo com número ímpar de carbonos leva à formação de propionil-

CoA, o qual precisa ser convertido em succinil-CoA para entrar no ciclo de Krebs e ser oxidado (CAMPBELL, 2000).

2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS E ÓLEO DE SALMÃO

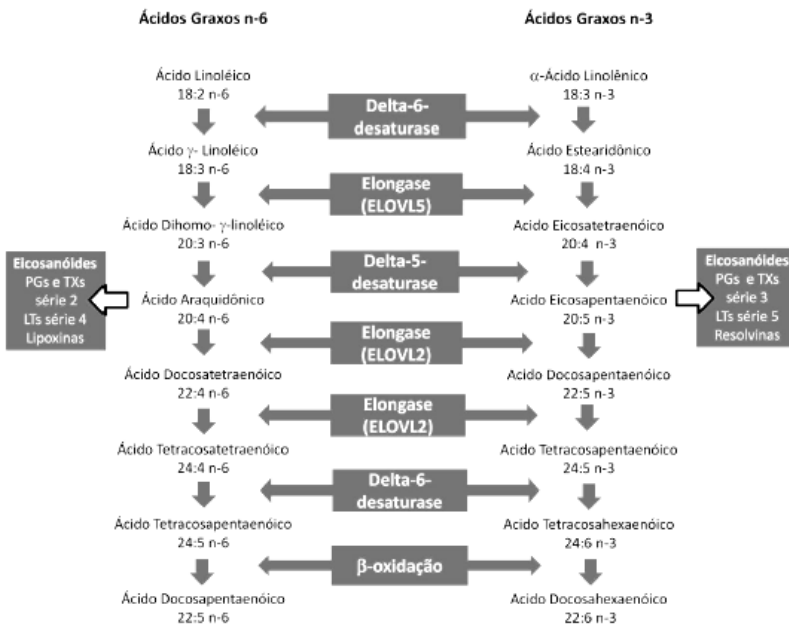
Peixes marinhos são amplamente conhecidos e indicados por serem considerados alimentos saudáveis, fonte de proteínas de alto valor biológico e lipídios benéficos à saúde, tais como os ácidos graxos polinsaturados ômega 3. Dentre eles, os mais estudados e de grande importância clínica estão o EPA e DHA (FAO, 2009). O consumo de EPA está relacionado à saúde cardiovascular, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e hipotrigliceridêmicos (VALENZUELA, 2005). Diversos estudos evidenciam os benefícios do uso de ácidos graxos polinsaturados ômega 3, presente em óleos de peixes, na prevenção e terapêutica de diversas enfermidades, dentre elas as alterações do metabolismo lipídico, em especial reduzindo os valores de triglicérides no sangue (BALK *et al*, 2006; HOOPER *et al*, 2008; ESLICK *et al*, 2009). O DHA é associado, principalmente, ao desenvolvimento e função do sistema nervoso e visual (VALENZUELA, 2005).

Os ácidos graxos da classe ômega 3 são ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa e com primeira dupla ligação localizada entre os carbonos três e quatro, contados a partir do grupamento metila final. São também denominados ácidos graxos essenciais, uma vez que não são sintetizados pelo organismo, sendo necessária sua obtenção através da dieta. Os ácidos graxos essenciais estão distribuídos em duas classes, ômega 3 e ômega 6, os quais se diferem pela localização da primeira dupla ligação. Os ácidos graxos da classe ômega 6 apresentam a primeira dupla ligação entre os carbonos seis e sete, contados a partir do grupamento metila final (FAO, 2009).

O ácido α -linolênico (C18:3), principal representante dos ácidos graxos da classe ômega 3, é o precursor dos ácidos graxos eicosapentaenóico ou EPA (C20:5) e docosahexaenóico ou DHA (C22:6). O ácido linoléico (C18:2), por sua vez, representante dos ácidos graxos da classe ômega 6, é o precursor do ácido araquidônico ou AA (C20:4). A conversão dos ácidos graxos ômega 3 e 6 em seus respectivos derivados (figura 2) é um processo lento e ocorre pela ação de enzimas responsáveis pelo aumento e insaturação da cadeia carbônica (FAO, 2009).

Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos das classes ômega 3 e 6.

Fonte: ALMEIDA, 2011. Adaptado de SCHMITZ; ECKER, 2008.



Os ácidos graxos polinsaturados, em especial AA e EPA, estão presentes nas membranas celulares e são precursores da síntese de eicosanóides, compostos fisiologicamente ativos e mediadores da resposta inflamatória, conhecidos como: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. Os eicosanóides derivados da classe ômega 6 apresentam maior efeito pró-inflamatório enquanto derivados da classe ômega 3 desempenham importante efeito anti-inflamatório (MURRAY *et al*, 2006).

Diets ricas em ácidos graxos ômega 6 podem influenciar, através da competição pelas enzimas dessaturases, o metabolismo dos ácidos graxos ômega 3, portanto, devido à natureza competitiva e as funções biológicas essenciais e distintas, é necessário um equilíbrio entre a ingestão desses ácidos graxos pela dieta. A *Food and Agriculture*

Organization, em 1994, recomendava uma ingestão diária na proporção de 5:1 a 10:1 ($\omega 6:\omega 3$). Essa mesma organização, em 2009, indica que a ingestão de ácidos graxos polinsaturados deve variar entre 6-11% do valor energético total da dieta, sendo 2,5-9% de ácidos graxos ômega 6 e 0,5-2% de ácidos graxos ômega 3. O equilíbrio no consumo destes ácidos graxos pela dieta pode contribuir para a prevenção de doenças, tais como as doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas não transmissíveis (SIMOPOULOS, 2008). As principais fontes dietéticas destes nutrientes são os óleos vegetais, peixes e óleos de peixes marinhos, como a sardinha, o arenque e o salmão (FAO, 2009).

O Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) é a principal espécie da família *salmonidae*. Ocorre no Atlântico Norte, desde o norte da Europa até a costa leste do Canadá e Estados Unidos. A espécie vive os primeiros anos em água doce, migra para o mar - onde permanece até a fase adulta - e retorna a água doce na época de reprodução, completando o seu ciclo de vida (FAO, 2012). A espécie é bastante apreciada pelo seu valor nutricional, sendo indicada como uma das principais fontes de ácidos graxos ômega 3 (VALENZUELA, 2005).

A produção de salmão apresenta grande importância econômica e devido ao aumento da demanda por produtos da aquicultura, atualmente a produção de cultivo supera a selvagem. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization*, em 2008 a produção mundial de peixes diádromos foi liderada pelo salmão com 1,5 milhões de toneladas (44%). Noruega e Chile são os maiores produtores, respondendo por 36,4 e 28%, respectivamente (FAO, 2011).

A carne de coloração rosada – devido a presença de carotenóides na dieta do pescado, tais como a astaxantina - contribui significativamente para o maior valor de mercado do produto, tornando-o, também, mais atraente para o consumidor (VALENZUELA, 2005).

2.4 MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDO

A seguir se apresenta uma lista de alguns trabalhos e resultados encontrados na literatura relacionados ao modelo experimental em estudo.

- BAKER; GIBBONS, 2000 - *Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin.*

Descrição: Ratos Wistar, 140-170g, 14 dias, dieta com óleo de peixe ou azeite de oliva.

Resultados: Suplementação com óleo de peixe aumentou a oxidação de ácidos graxos e diminuiu a secreção de VLDL.

- IKEDA *et al*, 2001 - *Reduced hepatic triglyceride secretion in rats fed docosahexaenoic acid-rich fish oil suppresses postprandial hypertriglyceridemia.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 3 semanas, dieta com óleo de cártamo ou óleo de peixe.

Resultados: A concentração de triglicerídeos séricos foi significativamente menor no grupo óleo de peixe.

- ZHENG; AVELLA; BOTHAM, 2001 - *Comparison of the effects of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on very-low-density lipoprotein secretion when delivered to hepatocytes in chylomicron remnants.*

Descrição: Ratos Wistar, 300-350g, dieta com óleo de peixe ou óleo de milho.

Resultados: A quantidade de colesterol e triglicerídeos segregada para o meio foi significativamente menor na presença de óleo de peixe.

- NAGAI *et al*, 2002 - *Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 8 semanas, dieta rica em frutose + fenofibrato.

Resultados: O tratamento com fenofibrato melhorou as alterações metabólicas induzidas pela dieta rica em frutose, tais como resistência à insulina, hipertensão, hiperlipidemia, acúmulo de gordura no fígado; além de aumentar a expressão/atividade do PPAR.

- KELLEY; ALLAN; AZHAR, 2004 - *High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 180-200g, 14 dias, dieta rica em frutose.

Resultados: Dieta rica em frutose induziu a hipertrigliceridemia e aumentou significativamente a glicemia e o colesterol total.

- D'ANGELO *et al*, 2005 - *Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in sprague-dawley rats.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 8 semanas, dieta rica em frutose.

Resultados: Glicose plasmática em jejum, insulina plasmática e triglicerídeos plasmáticos foram significativamente mais elevados em animais alimentados com frutose.

- SANCHEZ-LOZADA *et al*, 2006 - *Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 290-350g, 8 semanas, dieta rica em frutose.

Resultados: Frutose induziu a hipertensão, hiperuricemia e hipertrigliceridemia.

- BUETNER *et al*, 2006 - *Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types.*

Descrição: Ratos Wistar, 12 semanas, dieta com óleo de coco, azeite de oliva, óleo de fígado de bacalhau ou banha de porco.

Resultados: PPAR α foi ativado nos animais que receberam óleo de peixe.

- MASSON *et al*, 2008 - *Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats.*

Descrição: Ratos Wistar, 10 semanas, dieta rica em frutose + PUFA.

Resultados: Peso do fígado foi maior em ratos alimentados com dieta com alto teor de frutose. A frutose induziu o aumento de TG séricos, e PUFA foi capaz de prevenir este aumento.

- ABDULLAH *et al*, 2009 - *Effects of long-term consumption of a high-fructose diet on conventional cardiovascular risk factors in Sprague-Dawley rats.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 20 semanas, dieta rica em frutose.

Resultados: Ratos alimentados com dieta rica em frutose apresentaram aumento visível de gordura abdominal. Os níveis de lipídios totais, colesterol total e triglicérides foram significativamente maiores no fígado dos animais do grupo frutose. A dieta rica em frutose aumentou os níveis séricos de TG, colesterol total e HDL-c. Em relação ao LDL-c não houve diferença entre os grupos.

- HININGER-FAVIER *et al*, 2009 - *Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance, the fructose-fed rat.*

Descrição: Ratos Wistar, 6 semanas, dieta rica em frutose + chá verde.

Resultados: Ratos que receberam dieta rica em frutose desenvolveram sinais de resistência à insulina (hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia).

- CHOU *et al*, 2010 - *Aliskiren prevents and ameliorates metabolic syndrome in fructose-fed rats.*

Descrição: Ratos Sprague-Dawley, 200-230g, 8 semanas, dieta rica em frutose.

Resultados: Dieta rica em frutose induziu hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

- YASARI *et al*, 2012 - *Effects of exercise training on molecular markers of lipogenesis and lipid partitioning in fructose-induced liver fat accumulation.*

Descrição: Ratas Sprague-Dawley, 180-200g, treinamento por 8 semanas, jejum/realimentação 24h.

Resultados: Realimentação com frutose resultou em aumento dos triglicerídeos hepáticos e plasmáticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do consumo de óleo de salmão na expressão do gene PPAR α e na concentração de triglicerídeos séricos e hepáticos de ratos realimentados com dieta rica em frutose após jejum prolongado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil de ácidos graxos do óleo de salmão;
- Avaliar a gordura hepática total dos animais experimentais;
- Avaliar as alterações no perfil lipídico sérico (triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol e não HDL-c) e triglicerídeos hepáticos dos animais experimentais;
- Quantificar o tecido adiposo (epididimal e retroperitoneal) dos animais experimentais;
- Analisar a expressão gênica hepática do fator de transcrição PPAR α dos animais experimentais.

4 MÉTODOS

4.1 INSERÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo está vinculado à pesquisa intitulada *Influência de ácidos graxos n-3 de diferentes fontes no metabolismo lipídico e expressão gênica de ratos com esteatose hepática não-alcóolica induzida por frutose*, a qual é resultado da parceria entre o Núcleo de Estudo e Pesquisa em Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina e o Laboratório de Estudos Moleculares em Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A pesquisa tem participação da doutoranda Gabriela Salim Ferreira de Castro e coordenação do Professor Dr. Helio Vannucchi.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo apresenta delineamento experimental randomizado.

4.3 ENSAIO BIOLÓGICO

O ensaio biológico foi conduzido no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

O protocolo experimental adaptado (figura 3) seguiu metodologia proposta por Castro *et al* (2011).

Figura 3 – Protocolo experimental.

Período	Período Experimental			Sacrifício
	Intervenção com Óleo de Salmão	Jejum	Realimentação com Frutose	
Adaptação				
1 semana	1 semana	48 horas	24 horas	

4.3.1 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 31 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 180-200 g, os quais foram alojados em gaiolas individuais e mantidos em sala climatizada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e em ciclo claro-

escuro constante (12 horas). Após uma semana de adaptação sob alimentação com uma dieta padrão, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- Grupo Controle (GC, n=8) – sacrificados posteriormente ao consumo de dieta controle por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta controle por 24 horas.
- Grupo Frutose (GF, n=7) – sacrificados posteriormente ao consumo de dieta controle por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta rica em frutose por 24 horas.
- Grupo Óleo de Salmão I (GSFI, n=8) - sacrificados posteriormente ao consumo de dieta com óleo de salmão por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta rica em frutose por 24 horas.
- Grupo Óleo de Salmão II (GSFII, n=8) - sacrificados posteriormente ao consumo de dieta com óleo de salmão por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta rica em frutose e óleo de salmão por 24 horas. O grupo GSFII difere do GSFI por ter recebido dieta com óleo de salmão antes e após a realimentação com frutose.

Os animais receberam água e ração *ad libitum* (exceto na fase de jejum, na qual receberam somente água) e foram pesados cinco vezes durante o experimento: no início do período de adaptação, no início de cada nova fase do período experimental e no dia do sacrifício.

4.3.2 Rações Experimentais

As rações experimentais foram preparadas segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993), com alteração da fonte lipídica (substituindo o óleo de soja por óleo de salmão) e de carboidrato (substituindo o amido e a sacarose por frutose). As rações experimentais, em pó, foram ofertadas em recipientes de inox, sendo pesadas e repostas três vezes na semana. A quantidade consumida foi obtida pela diferença de peso entre a dieta oferecida e as sobras. A composição das rações do período de adaptação (dieta controle) e experimental são apresentadas nos quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1 - Composição das rações dos grupos experimentais na fase de adaptação.

AIN 93G	
Ingredientes g/kg dieta	
Caseína	200,000
Amido	530,000
Sacarose	100,000
Óleo de Soja	70,000
Fibra	50,000
Minerais	35,000
Vitaminas	10,000
L-cistina	3,000
Colina	2,500
BHT	0,014

Quadro 2 - Composição das rações dos grupos experimentais na fase de intervenção com óleo de salmão.

Ingredientes g/kg dieta	GC	GF	GSFI	GSFII
Caseína	200,000	200,000	200,000	200,000
Amido	530,000	530,000	530,000	530,000
Sacarose	100,000	100,000	100,000	100,000
Óleo de Soja	70,000	70,000	0	0
Óleo de Salmão	0	0	70,000	70,000
Fibra	50,000	50,000	50,000	50,000
Minerais	35,000	35,000	35,000	35,000
Vitaminas	10,000	10,000	10,000	10,000
L-cistina	3,000	3,000	3,000	3,000
Colina	2,500	2,500	2,500	2,500
BHT	0,014	0,014	0,014	0,014

Quadro 3 - Composição das rações dos grupos experimentais na fase de realimentação.

Ingredientes g/kg dieta	GC	GF	GSFI	GSFII
Caseína	200,000	200,000	200,000	200,000
Amido	530,000	0	0	0
Sacarose	100,000	0	0	0
Frutose	0	630,000	630,000	630,000
Óleo de Soja	70,000	70,000	70,000	0
Óleo de Salmão	0	0	0	70,000
Fibra	50,000	50,000	50,000	50,000
Minerais	35,000	35,000	35,000	35,000
Vitaminas	10,000	10,000	10,000	10,000
L-cistina	3,000	3,000	3,000	3,000
Colina	2,500	2,500	2,500	2,500
BHT	0,014	0,014	0,014	0,014

4.3.3 Sacrifício e Coleta de Tecidos dos Animais Experimentais

Ao final dos 17 dias de experimento os animais foram sacrificados por decapitação. Foram coletadas amostras de sangue e tecido hepático para as determinações bioquímicas e moleculares. O tecido adiposo (epididimal e retroperitoneal) foi removido e pesado para comparação entre os grupos.

O sangue foi centrifugado a 3500 rpm a 4°C por 15 minutos para obtenção do soro. O fígado, após ser removido, foi pesado e congelado em nitrogênio líquido, sendo as amostras armazenadas a -40°C para posteriores análises bioquímicas. O fragmento hepático destinado à extração de RNA foi armazenado em solução estabilizado de RNA (RNAlater® -Qiagen).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA TOTAL

Para determinação e quantificação da gordura hepática total foi utilizado o método proposto por Folch, Less e Stanley (1957). Aproximadamente 1 g de tecido hepático foi homogeneizado com 3 mL de clorofórmio:metanol (2:1) com a ajuda de um macerador. Em seguida, completou-se o volume para 20 mL de clorofórmio:metanol (2:1). A mistura foi filtrada em papel filtro fino e para cada 10 mL do filtrado, adicionou-se 2 mL de solução salina (0,9 %). Os tubos foram

agitados suavemente, sendo invertidos três vezes. Em seguida, foram levados para centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm para separação das fases. A fase superior (fase aquosa) foi desprezada. Um volume conhecido da fase inferior (fase clorofórmica) foi transferido para um recipiente previamente pesado, o qual foi levado à estufa (60 °C) para evaporação. Após a secagem, o recipiente foi pesado novamente, para o cálculo da diferença de peso.

4.5 ANÁLISE DE LIPÍDIOS SÉRICOS E HEPÁTICOS

Os triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol séricos foram determinados através de *kits* comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN DU-640) a 505 nm para triglicerídeos e 500 nm para colesterol total e HDL-colesterol. A concentração de não HDL-colesterol foi estimada pela diferença entre o colesterol total e a fração HDL-colesterol.

Os triglicerídeos hepáticos foram dosados pelo mesmo *kit*, após a extração da gordura hepática total. Para as dosagens, a gordura total extraída foi ressuspensa com 1 ml de isopropanol e após leve agitação retirou-se alíquotas para as análises.

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PPAR α

Em estudos de expressão gênica, a PCR em tempo real é uma das ferramentas mais utilizadas e consiste em um método para a rápida amplificação – criação de múltiplas cópias - de segmentos específicos de DNA (FIALHO, MORENO, ONG, 2008). O sistema de detecção da PCR é baseado em fluoróforos que emitem luz e proporcionam o acompanhamento da reação, sendo que a emissão dos compostos fluorescentes aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Estudos Moleculares em Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e seguiram as seguintes etapas: Extração de RNA, Quantificação e Análise da Pureza do RNA, Análise da Integridade do RNA, Síntese de cDNA e PCR em tempo real (ANEXO A).

O RNA total hepático foi obtido por meio da utilização de trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) conforme as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000), medindo-se a absorbância nos comprimentos de

onda de 230, 260 e 280 nm, para avaliação do grau de pureza. A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. As amostras de RNA total extraído foram armazenadas a -80°C até a sua utilização para síntese de cDNA por meio de kit *High Capacity* (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total na presença da transcriptase reversa e do iniciador oligo (dt), conforme instruções do fabricante. Logo após foi realizada PCR em tempo real para quantificação relativa de expressão gênica por meio do equipamento 7500 Real Time PCR System, utilizando SYBR Green (Applied Biosystems) e iniciadores específicos para o gene de estudo. Os iniciadores foram desenhados por meio das sequências depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com o auxílio do *software* Primer Express (Applied Biosystems). O gene estudado foi:

Gene	Número de acesso no GenBank	Oligonucleotídeos Iniciadores	
PPAR α	NM_011144	Forward	CACGATGCTGCTCTCCTTGA
		Reverse	GTGTGATAAAGCCATTGCCGTA

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50 °C por 2 minutos, seguida pela ativação da DNA polimerase a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, intercalados com anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. As amostras foram analisadas em duplicata e a expressão foi corrigida por um controle endógeno definido em experimento de padronização. Os níveis relativos de transcritos foram determinados utilizando-se 18S RNA ribossômico como agente de controle endógeno. Foram feitos ensaios para curva-padrão, no intuito de definir o valor de *threshold* (limiar de detecção) para uma eficiência de reação em torno de 100%, além da otimização das quantidades de *primer* e de cDNA utilizadas nas reações de quantificação relativa do transcrito.

	THRESHOLD	SLOPE	R ²	Eficiência
PPAR 100nM	0,267122	-3,265591	0,981979	102%
18S 200nM	0,490404	-3,31940	0,985994	100%

Para o cálculo da quantidade relativa (*Fold Change*), foi aplicado o método $\Delta\Delta CT$ a fim de realizar a comparação relativa ao grupo que não recebeu tratamento, ou seja, o grupo calibrador. Neste estudo o grupo calibrador foi o grupo GC.

$$\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{endógeno})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Os resultados representam o número de vezes que o gene nos animais dos grupos GF, GFSI e GFSII é mais ou menos expresso em relação à expressão do gene nos animais do grupo controle, visando avaliar se a dieta rica em frutose e o uso do óleo de salmão alteram a expressão do gene em estudo.

4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE SALMÃO

A amostra do óleo de salmão foi gentilmente cedida pela empresa Tectron - Soluções Inteligentes em Nutrição Animal (Toledo, Paraná/Brasil).

A determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de salmão foi realizada no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Para as análises, 50 µl do óleo foram colocados em tubos com tampa, aos quais se adicionou 1 mL de solução de KOH em metanol (0,5 M) com posterior agitação. Os tubos foram colocados em banho a 100 °C por 15 minutos. Após resfriar, foi acrescido 400 µl de solução de HCl/Metanol (4:1, v/v) e os tubos foram novamente aquecidos a 100 °C por 15 minutos. Em seguida, foram acrescidos 2 mL de água. Os tubos foram agitados e a solução foi lavada com 3 mL de hexano por duas vezes. A fase orgânica foi filtrada em papel de filtro contendo Na₂SO₄. Essa solução de hexano e ácidos graxos foi seca em corrente de nitrogênio e ressuspensa em 500 µl de clorofórmio para ser injetada no cromatógrafo gasoso. Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa (cromatógrafo SHIMADZU, GC-2014) equipado com auto-injetor AOC-20i, com coluna capilar Supelcowax de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás hélio foi utilizado como carreador, com fluxo de 1,6 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C. O padrão utilizado foi composto por um mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix).

4.8 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados coletados foram inseridos em um banco de dados criado no *software* Microsoft Office Excel 2007. É apresentada a estatística descritiva, com valores de média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, conforme distribuição dos dados. Para a estatística analítica, o teste estatístico para comparação entre grupos foi o teste ANOVA ou de *Kruskall-Wallis*, dependendo das características da variável de desfecho, com pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises foi utilizado o *software* STATA versão 11.0, considerando como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

4.9 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Processo nº 013/2012 (ANEXO B). O parecer favorável juntamente com a cópia do projeto aprovado foi encaminhado à Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade de Santa Catarina para arquivamento.

5 ARTIGO ORIGINAL

O artigo original oriundo desta dissertação de Mestrado será submetido ao periódico *Lipids* (FI 2010 - 2,151).

ÓLEO DE SALMÃO DIMINUI TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICOS E TECIDO ADIPOSE EPIDIDIMAL EM RATOS

SALMON OIL REDUCES HEPATIC TRIGLYCERIDES AND EPIDIDYMAL ADIPOSE TISSUE IN RATS

Stella LEMKE¹; Gabriela Salim Ferreira de CASTRO²; Lívia Maria Cordeiro Simões AMBROSIO², Helio VANNUCCHI², Vera Lúcia Cardoso Garcia TRAMONTE¹

¹ Programa de Pós-graduação em Nutrição - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Autor para correspondência: Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte – velutra@yahoo.com.br Universidade Federal de Santa Catarina - Programa de Pós-Graduação em Nutrição - Centro de Ciências da Saúde - Laboratório de Nutrição Experimental, Bloco J/4º andar - Campus Universitário – Trindade – 88040-900 – Florianópolis – SC, Brasil.

Fonte de Financiamento: Programa de Pós-Graduação em Nutrição/UFSC - Programa de Bolsas de Demanda Social/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α) está envolvido na regulação do metabolismo lipídico e parece ser regulado por ácidos graxos polinsaturados. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do consumo de óleo de salmão, rico em ômega 3, na expressão do gene PPAR α e na concentração de triglicerídeos séricos e hepáticos de ratos realimentados com dieta rica em frutose após jejum prolongado. Foram utilizados 31 ratos machos, *Wistar*, pesando entre 180-200 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle, Frutose, Óleo de Salmão I e Óleo de Salmão II. Após um período de adaptação, os animais receberam, por sete dias, dieta AIN-93 G, modificada, com óleo de salmão como fonte lipídica. Em seguida foram mantidos em jejum durante 48 horas e realimentados com dieta rica em frutose por 24 horas. O grupo GSFII difere do GSF I por ter recebido óleo de salmão antes e após a realimentação com frutose. Ao final do experimento os animais foram sacrificados e foram coletadas amostras de sangue e tecido hepático para análises bioquímicas e moleculares. O tecido adiposo (epididimal e retroperitoneal) foi removido e pesado. O teste estatístico para comparação entre grupos foi o teste ANOVA ou *Kruskall-Wallis*, com pós-teste de Bonferroni, considerando como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. A dieta rica em frutose aumentou a gordura hepática total nos animais e o óleo de salmão foi efetivo em reduzir este efeito. Em relação à concentração de triglicerídeos hepáticos e perfil lipídico sérico, não houve diferença, exceto para a fração HDL-c, que apresentou redução nos animais que consumiram a dieta rica em frutose. Não foi observada diferença na expressão do gene PPAR α entre os grupos.

Palavras-chave: Ômega 3, Frutose, PPAR α , Metabolismo lipídico, Realimentação.

INTRODUÇÃO

Nutrientes presentes na dieta podem modular o processo de expressão gênica por diferentes mecanismos. A regulação dos processos metabólicos, em especial do metabolismo lipídico, é essencial para a homeostase do organismo e efeitos da interação gene-nutriente parecem ter um impacto importante na promoção da saúde e prevenção de doenças.¹ Um dos principais fatores de transcrição envolvidos na regulação do metabolismo lipídico é o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), que está vinculado ao processo de oxidação de ácidos graxos pelo fígado.² Diversas moléculas são capazes de ativá-lo, incluindo os ácidos graxos polinsaturados ômega 3.³

O óleo de salmão, assim como os demais óleos de peixes marinhos, é rico em ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) e vem sendo utilizado na prática clínica sob alegação de reduzir os níveis plasmáticos de triglicerídeos, promovendo uma melhora da saúde cardiovascular.^{4,5,6}

Os modelos experimentais para estudo do metabolismo lipídico incluem animais geneticamente modificados e modelos dietéticos, entre outros.⁷ A oferta excessiva de carboidratos simples constitui uma alteração dietética capaz de induzir a hipertrigliceridemia.^{8,9} O estado de restrição e realimentação alimentar também aparece como um modelo para estudos do metabolismo lipídico em função das alterações decorrentes da lipólise e lipogênese.¹⁰

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do consumo de óleo de salmão na expressão do gene PPAR α e no perfil lipídico de ratos realimentados com dieta rica em frutose após jejum prolongado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP (n° 013/2012).

Delineamento experimental

Foram utilizados 31 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 180-200 g. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, em sala climatizada (24 \pm 2°C) e com ciclo claro/escuro de 12 horas, no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Para o ensaio biológico, os animais

passaram por um período de adaptação de sete dias e foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- Grupo Controle (GC, n=8) – sacrificados posteriormente ao consumo de dieta controle por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta controle por 24 horas.
- Grupo Frutose (GF, n=7) – sacrificados posteriormente ao consumo de dieta controle por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta rica em frutose por 24 horas.
- Grupo Óleo de Salmão I (GSFI, n=8) - sacrificados posteriormente ao consumo de dieta com óleo de salmão por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta rica em frutose por 24 horas.
- Grupo Óleo de Salmão II (GSFII, n=8) - sacrificados posteriormente ao consumo de dieta com óleo de salmão por 7 dias, jejum de 48 horas e realimentação com dieta rica em frutose e óleo de salmão por 24 horas. O grupo GSFII difere do GSFI por ter recebido dieta com óleo de salmão antes e após a realimentação com frutose.

Período Adaptação	Período Experimental			
	Intervenção com Óleo de Salmão	Jejum	Realimentação com Frutose	Sacrifício
1 semana	1 semana	48 horas	24 horas	

Rações experimentais

Os grupos receberam água e ração *ad libitum* (exceto na fase de jejum, na qual receberam somente água). As rações foram preparadas segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G¹¹, com alteração da fonte lipídica (substituindo o óleo de soja por óleo de salmão) e de carboidrato (substituindo o amido e a sacarose por frutose). A amostra do óleo de salmão foi cedida pela empresa Tectron - Soluções Inteligentes em Nutrição Animal (Toledo, Paraná/Brasil).

Sacrifício

Ao final dos 17 dias de experimento os animais foram sacrificados por decapitação e foram coletadas amostras de sangue e tecido hepático para as análises bioquímicas e moleculares. O tecido

adiposo (epididimal e retroperitoneal) foi removido e pesado para comparação entre grupos.

Análises bioquímicas

A identificação da composição de ácidos graxos do óleo de salmão foi realizada por cromatografia gasosa (cromatógrafo SHIMADZU, GC-2014). Para quantificação da gordura hepática total foi utilizado o método proposto por Folch, Less e Stanley (1957)¹². Os lipídios séricos e os triglicerídeos hepáticos foram determinados através de *kits* comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

Análise do gene PPAR α

Para as análises moleculares, o RNA total hepático foi obtido por meio da utilização de trizol (Tizol reagent – Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante. Após a obtenção de RNA o mesmo foi quantificado e armazenado a -80 °C até a sua utilização para síntese de cDNA por meio de *kit High Capacity* (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA). Logo após foi realizada PCR em tempo real para quantificação relativa de expressão gênica por meio do equipamento 7500 Real Time PCR System, utilizando SYBR Green (Applied Biosystems) e iniciadores específicos para o gene de estudo. Os níveis relativos de transcritos foram determinados utilizando-se 18S RNA ribossômico como agente de controle endógeno. Os iniciadores foram desenhados por meio das sequências depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com o auxílio do *software* Primer Express (Applied Biosystems).

Gene	Número de acesso no GenBank	Oligonucleotídeos Iniciadores	
PPAR α	NM_011144	Forward	CACGATGCTGCTCTCCTTGA
		Reverse	GTGTGATAAAGCCATTGCCGTA

O gene de interesse apresentou amplificação, conforme avaliado em gel do produto purificado de PCR (figura 1). A concentração ideal de *primer* e a quantidade ótima de cDNA utilizados nas reações de quantificação relativa dos transcritos, além do valor de *threshold* definido pela análise da curva-padrão, considerando-se eficiência em torno de 100 %, foram:

Gene	Threshold	Primer	cDNA	Termociclagem
PPAR	0,267122	100 nM	1,5 µg	Normal
18S	0,490404	200 nM	1,5 µg	Normal

Figura 1 – Gel do produto purificado de PCR (qualitativo) do gene de estudo.



Para o cálculo da quantidade relativa (*Fold Change*), foi aplicado o método $\Delta\Delta CT$ a fim de realizar a comparação relativa ao grupo que não recebeu tratamento, ou seja, o grupo calibrador. Neste estudo o grupo calibrador foi o grupo GC. Os resultados representam o número de vezes que o gene nos animais dos grupos GF, GFSI e GFSII é mais ou menos expresso em relação à expressão do gene nos animais do grupo controle, visando avaliar se a dieta rica em frutose e o uso do óleo de salmão alteram a expressão do gene em estudo.

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do software STATA 11.0, considerando como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. O teste estatístico para comparação entre grupos foi o teste ANOVA ou *Kruskall-Wallis*, dependendo das características da variável de desfecho, com pós-teste de Bonferroni. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil.

RESULTADOS

Perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados para o preparo das dietas

O perfil de ácidos graxos dos óleos de soja e de salmão utilizados para o preparo das rações experimentais é apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos (%) dos óleos de soja e de salmão utilizados no preparo das dietas experimentais. Florianópolis, 2012.

Ácidos graxos	Óleo de Soja	Óleo de Salmão
C12:0 Ácido Láurico	ND	0,1
C14:0 Ácido Mirístico	0,1	4,5
C16:0 Ácido Palmítico	10,6	15,4
C17:0 Ácido Margárico	0,1	ND
C18:0 Ácido Esteárico	2,9	3,9
C24:0 Ácido Lignocérico	0,1	ND
ΣSaturados	13,8	23,9
C16:1 Ácido Palmitoléico	ND	6,2
C17:1 Ácido Margaroléico	0,1	ND
C18:1n9c Ácido Oléico	27,1	27,8
C20:1n9 Ácido Eicosanóico	0,3	ND
ΣMonoinsaturados	27,5	34,0
C20:2 Ácido Eicosadienóico	0,2	1,9
C18:2n6c Ácido Linoléico	52,0	14,0
C18:3n3 Ácido α-Linolênico	5,2	2,4
C20:3n6 Ácido Dihomo γ-Linolênico	ND	0,6
C20:5n3 Ácido Eicosapentaenóico (EPA)	0,4	7,4
C22:5n3 Ácido Docosapentaenóico	ND	2,8
C22:6n3 Ácido Docosaheptaenóico (DHA)	ND	5,6
ΣPolinsaturados	57,6	34,7
Σn6	52,0	14,6
Σn3	5,6	18,3
n6/n3	9,3	0,8
Outros	0,9	3,95

ND – não detectado

O óleo de soja apresenta elevado teor de ácidos graxos polinsaturados (58%) com predomínio do ácido linoléico (52%), principal representante dos ácidos graxos da classe ômega 6. O óleo de salmão apresenta maior teor de ácidos graxos polinsaturados ômega 3 (18%), com predomínio dos ácidos eicosapentaenóico (7%) e docosaheptaenóico (6%).

Crescimento dos animais e Ingestão dietética

As tabelas 2 e 3 mostram que não houve diferença quanto ao ganho de peso e a ingestão da dieta entre os grupos experimentais.

Tabela 2 – Média do ganho de peso (g) ao final do experimento e variação de peso (g) dos grupos experimentais nos diferentes períodos do ensaio biológico. Florianópolis, 2012.

	Média ± DP				P
	GC	GF	GSFI	GSFII	
Ganho de peso total	86,4±13,7	78,7±13,4	66,9±21,0	92,0±25,5	0,077†
Varição de peso					
Adaptação	41,4±8,2	33,9±15,0	22,9±14,3	39,6±17,8	0,063†
Experimental	47,3±15,0	49,1±14,7	50,0±16,5	59,1±18,9	0,492†
Jejum	- 26,1±3,9	-24,7±5,1	-25,3±3,9	-27,9±5,5	0,574†
Realimentação*	25,0 [20,5;27,5]	20,0 [15,0;27,0]	21,5 [17,5;23,0]	22,5 [20,0;23,5]	0,385††

* Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

† ANOVA

†† *Kruskal-Wallis*

Tabela 3 – Consumo médio diário de ração (g/dia) pelos grupos experimentais nos diferentes períodos do ensaio biológico. Florianópolis, 2012.

	Média ± DP				P
	GC	GF	GSFI	GSFII	
Adaptação	21,2±3,3	20,6±2,1	18,6±4,3	18,7±3,8	0,361†
Experimental	23,5±3,7	24,1±2,3	22,2±4,2	23,5±2,5	0,715†
Realimentação*	23,5 [22,0;27,5]	22,0 [18,0;28,0]	20,5 [18,0;26,0]	21,0 [19,0;29,0]	0,500††

* Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

† ANOVA

†† *Kruskal-Wallis*

Tecido Hepático e Adiposo

A determinação da gordura hepática total mostrou que a dieta rica em frutose foi capaz de aumentar a gordura hepática nos animais do grupo GF (38,6 g/100g tecido) e o óleo de salmão foi efetivo em prevenir este efeito (GSFI: 12,6 g/100g tecido; GSFII: 13,7 g/100g tecido), ocasionando uma redução, inclusive, em relação ao grupo GC (28,2 g/100g tecido).

Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso do tecido hepático. No entanto, quando este peso foi normalizado para o peso corporal, o valor no grupo GSFII foi maior do que no grupo GF, demonstrando um aumento do órgão em relação ao peso do corpo.

Com relação ao peso do tecido adiposo epididimal, os animais do grupo GSFI ($1,8 \pm 0,8$ g) e GSFII ($1,8 \pm 0,4$ g) apresentaram valores reduzidos quando comparados ao grupo GC ($2,9 \pm 0,8$ g) ($p=0,005$). Quanto ao peso do tecido adiposo retroperitoneal não houve diferença entre os grupos ($p=0,05$).

Após normalização do peso do tecido adiposo epididimal para o peso corporal, o grupo GSFII ($0,7 \pm 0,1$) apresentou valores reduzidos em relação ao grupo GC ($1,0 \pm 0,3$). Já a razão entre o tecido adiposo retroperitoneal e o peso corporal não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,05$). Os dados de gordura hepática total e peso dos tecidos hepático adiposo são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios de gordura hepática total (g/100g tecido), peso absoluto (g) dos tecidos hepático e adiposo (epididimal e retroperitoneal) e razão entre o peso dos tecidos hepático e adiposo e o peso corporal. Florianópolis, 2012.

	Média ± DP				P
	GC	GF	GSFI	GSFII	
Gordura hepática total*	28,2 [26,8;32,5] ^a	38,6 [38,5;40,3] ^b	12,6 [11,8;16,7] ^c	13,7 [13,0;14,7] ^c	<0,001 ^{††}
Tecido hepático	14,0±1,8	13,0±0,9	13,0±2,5	15,3±1,7	0,063 [†]
Razão peso hepático/corporal	4,9±0,4	4,8±0,3 ^a	5,2±0,9	5,7±0,4 ^b	0,004 ^{††}
Tecido adiposo epididimal	2,9±0,8 ^a	2,5±0,6	1,8±0,8 ^b	1,8±0,4 ^b	0,005 [†]
Razão peso epididimal/corporal	1,0±0,2 ^a	0,9±0,2	0,7±0,3	0,7±0,1 ^b	0,013 [†]
Tecido adiposo retroperitoneal*	2,4 [1,2;3,1]	2,0 [1,5;2,8]	1,0 [0,6;1,8]	1,3[0,9;1,5]	0,05 ^{††}
Razão peso retroperitoneal/corporal*	0,8 [0,5;1,1]	0,8 [0,5;1,0]	0,4 [0,2;0,7]	0,4 [0,3;0,6]	0,05 ^{††}

* Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

[†] ANOVA

^{††} *Kruskal-Wallis*

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística

Perfil lipídico sérico e triglicerídeos hepáticos

O perfil lipídico sérico não apresentou diferença entre os grupos experimentais, exceto para a fração HDL-c ($p=0,001$) que apresentou valores de mediana reduzidos nos grupos que receberam frutose - GSFI (20,6 mg/dL), GSFII (22,3 mg/dL) e GF (24,0 mg/dL) -, em comparação ao grupo GC (32,9 mg/dL). Com relação aos valores de triglicerídeos hepáticos não houve diferença entre os grupos ($p=0,385$). Os resultados do perfil lipídico sérico e triglicerídeos hepáticos estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Perfil lipídico sérico (mg/dL) e triglicerídeos hepáticos (mg/g tecido) dos grupos experimentais. Florianópolis, 2012.

	Média ± DP				P
	GC	GF	GSFI	GSFII	
Soro					
Triglicerídeos	59,5±24,8	96,9±30,1	84,1±45,0	75,1±21,0	0,158†
Colesterol total	50,3±10,3	44,2±4,3	40,0±7,7	40,4±9,4	0,074†
HDL-c*	32,9 [28,6;43,3] ^a	24,0 [22,6;27,3] ^b	20,6 [18,6;23,0] ^b	22,3 [18,7;27,8] ^b	0,001††
Não HDL-c	15,2±10,9	19,9±5,3	19,1±7,5	18,5±5,8	0,656†
Fígado					
Triglicerídeos	10,4±3,8	14,1±5,2	14,1±4,3	12,3±5,5	0,385†

* Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

† ANOVA

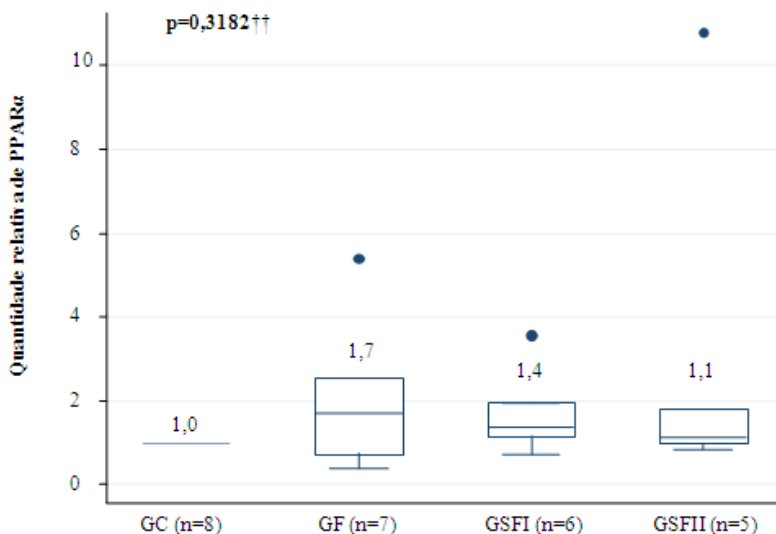
†† *Kruskal-Wallis*

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística

Expressão do gene PPAR α

A quantificação relativa, apresentada na figura 2, mostrou que não houve diferença dos diferentes tratamentos sobre a expressão do gene PPAR α no tecido hepático dos animais experimentais ($p=0,382$).

Figura 2 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a expressão gênica de PPAR α no tecido hepático dos animais experimentais. Florianópolis, 2012.



GC: grupo calibrador. GF: número de vezes que o gene é mais ou menos expresso no grupo GF em relação ao grupo GC. GSF I: número de vezes que o gene é mais ou menos expresso no grupo GSF I em relação ao grupo GC. GSF II: número de vezes que o gene é mais ou menos expresso no grupo GSF II em relação ao grupo GC.

†† *Kruskal-Wallis*

DISCUSSÃO

A oferta excessiva de carboidratos simples, tais como a frutose, constitui uma alteração dietética capaz de induzir a hipertrigliceridemia^{8,13,14} e ocasionar mudanças hepáticas, causando acúmulo de triglicerídeos no fígado.^{9,13,15}

O estado de restrição e realimentação alimentar também aparece como um modelo para estudos do metabolismo lipídico, visto que mudanças na disponibilidade de nutrientes exigem adaptações hormonais e metabólicas para garantir a manutenção da homeostase energética.¹⁰ O acúmulo de lipídios no fígado, em situações de jejum prolongado, pode ocorrer em resposta a uma desordem metabólica, devido ao excesso da oferta de ácidos graxos livres do tecido adiposo para o fígado e à dificuldade na sua metabolização. Além disso, a deficiência na ingestão dietética prejudica a síntese de proteínas e fosfolipídios necessários à formação da lipoproteína VLDL, causando acúmulo dos triglicerídeos formados no fígado pela síntese endógena. Inversamente, na oferta excessiva de energia ocorre aumento da síntese de ácidos graxos e o processo da oxidação é inibido visando facilitar o armazenamento de energia, sob a forma de triglicerídeos, nos adipócitos. Distúrbios no metabolismo dos ácidos graxos, principalmente envolvendo a regulação da síntese e oxidação pode contribuir para a obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática.¹⁶

O PPAR α , ativado pelo ácido graxo polinsaturado ômega 3 presente no óleo de salmão, induz a expressão de enzimas relacionadas à β -oxidação, aumentando a depuração das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, o que evita a esteatose hepática e melhora o perfil lipídico sérico.¹⁶

Nagai *et al* (2002)¹⁷ em estudo com ratos machos Sprague-Dawley após oferta de dieta rica em frutose e fenofibrato por oito semanas observaram que o tratamento com fenofibrato melhorou as alterações metabólicas induzidas pela dieta rica em frutose, tais como a resistência à insulina, hipertensão, hiperlipidemia e acúmulo de gordura no fígado, além disso o fenofibrato induziu a expressão/atividade do PPAR α . O fenofibrato exerce papel semelhante aos ácidos graxos polinsaturados na ativação do PPAR α .

Buettner *et al* (2006)¹⁸ observaram em ratos machos Wistar alimentados com diferentes dietas (banha de porco, azeite de oliva, óleo de coco e óleo de peixe) por 12 semanas que o PPAR α foi mais expresso em animais que receberam o óleo de peixe como fonte lipídica.

Palou *et al* (2008)¹⁰ observaram em ratos machos Wistar alimentados com dieta controle, sob diferentes padrões de alimentação (jejum de 4, 8, 24 horas e realimentação por 3 horas após jejum de 24 horas) que a expressão do gene PPAR α aumentou significativamente após 8 horas de jejum, retornando aos valores normais após 3 horas de realimentação. Essa alteração ocorreu após o aumento de ácidos graxos livres no sangue e a redução da insulina circulante.

Os resultados do presente estudo indicam aumento de gordura hepática no grupo que consumiu frutose e redução deste parâmetro nos grupos que consumiram óleo de salmão. No entanto, neste trabalho a determinação de triglicerídeos hepáticos e séricos não apresentou diferença entre os grupos, exceto para a fração sérica HDL-c. Em relação à expressão do fator de transcrição PPAR α , não houve diferença entre os grupos. Destaca-se que este foi um estudo agudo e que, pelo curto período de tempo, a resposta metabólica dos animais à intervenção não foi evidente nos resultados obtidos, no entanto, estes resultados indicam uma tendência que poderia se revelar em um modelo de intervenção a longo prazo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos membros do Laboratório de Estudos Moleculares em Nutrição e Metabolismo e aos funcionários do biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP pelo suporte técnico, ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN/UFSC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

1. Fialho E, Moreno FS, Ong TP (2008) Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. *Rev. Nutr.* 21(6): 757-766.
2. Jump DB *et al* (2008) Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids.* 153(1): 3-13.
3. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD (2005) An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51:85-94.
4. Balk EM *et al* (2006) Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis.* 189: 19-30.

5. Hooper L *et al* (2008) Ácidos grasos omega-3 para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. (Revisão Cochrane traduzida). La Biblioteca Cochrane Plus.
6. Eslick GD *et al* (2009) Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cardiology* 136: 4–16.
7. Fan J, Quiao L (2009) Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 8: 233-240.
8. Meirelles CJCS. *et al* (2011) Metabolic effects of the ingestion of different fructose sources in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119: 218–220.
9. Castro GSF *et al* (2011) Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 26 (Supl 2): 45–50.
10. Palou M *et al* (2008) Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Eur J Physiol* 456: 825–836.
11. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition “Ad Hoc” writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr* 123: 1939-1951.
12. Folch J, Less M, Stanley S (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biological. Chemistry* 226 (1): 497-509.
13. Thirunavukkarasu V, Nandhini AT, Anuradha CV (2004) Effect of α -Lipoic Acid on Lipid Profile in Rats Fed a High-Fructose Diet. *Experimental Diab. Res.* 5: 195–200.
14. Castro GSF *et al* (2012) Omega-3 improves glucose tolerance but increases lipid peroxidation and DNA damage in hepatocytes of fructose-fed rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 37: 1–8.
15. Kawasaki T *et al* (2009) Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *J. Nutr.* 139: 2067–2071.
16. Reedy JK (2001) Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis III. Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: 1333–1339.
17. Nagai Y *et al* (2002) Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: 1180–1190.

18. Buettner R *et al* (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 36: 485-501.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas sobre a temática da nutrição clínica, em especial, relacionadas ao entendimento dos processos fisiopatológicos de doenças crônicas não transmissíveis são de extrema importância para o desenvolvimento de ações que visem reduzir os crescentes índices de morbimortalidade por estas doenças em todo mundo.

Os resultados do presente estudo indicam aumento de gordura hepática nos animais do grupo frutose e redução deste parâmetro nos grupos que consumiram óleo de salmão. Em relação à concentração de triglicerídeos hepáticos e perfil lipídico sérico, não houve diferença significativa, exceto para a fração HDL-c, que apresentou redução nos animais que consumiram a dieta rica em frutose. Não foi observada diferença na expressão do gene PPAR α entre os grupos.

Destaca-se que este foi um estudo agudo e que, pelo curto período de tempo, a resposta metabólica dos animais à intervenção não foi evidente nos resultados obtidos, no entanto, já existem na literatura evidências sobre os benefícios do uso de ácidos graxos polinsaturados ômega 3, presente em óleos de peixes, na prevenção e terapêutica de diversas enfermidades, dentre elas as alterações do metabolismo lipídico, em especial reduzindo os valores de triglicerídeos no sangue, o que poderia se revelar em um modelo de intervenção a longo prazo.

Assim, conclui-se que neste estudo o óleo de salmão apresenta benefícios, principalmente em relação à redução da gordura total hepática, o que também pode contribuir para a melhora da saúde cardiovascular.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M.M. *et al.* Effects of long-term consumption of a high-fructose diet on conventional cardiovascular risk factors in Sprague-Dawley rats. *Mol Cell Biochem.* v.327, p.247–256, 2009.

AFMAN, L.; MULLER, M. Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease. *J Am Diet Assoc.* v.106, p.569-576, 2006.

ALAYNICK, W.A. Nuclear Receptors, Mitochondria, and Lipid Metabolism. *Mitochondrion.*, v.8, n.4, p. 329–337, 2008.

ALMEIDA, B. B. Ações do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

BAKER, P.W.; GIBBONS, G. Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin. *The Journal of Lipid Research.* v.41 p.719-726, 2000.

BALK, E.M. *et al.* Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis.* v.189, p. 19–30, 2006.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev. Nutr.* v.18, n.3, p.377–389, 2005.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*, v.2, n.5, 2005.

BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. *Bioquímica Médica.* 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 716p.

BAYS, H. E. *et al.* Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications *Expert. Rev. Cardiovasc.* v.6, n. 3, p.391-409, 2008.

BERGER, J. P.; AKIYAMA, T. E.; MEINKE, P. T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. v.26, n.5, p.244-251, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações sobre Mortalidade, 2009. Disponível em: <
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/c04.def>> Acesso em: 24 fev. 2012.

BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. v.36, p.485-501, 2006.

CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 752p.

CASTRO, G.S.F. *et al.* Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.26 (Suppl. 2), p.45–50, 2011.

CASTRO, G.S.F. *et al.* Omega-3 improves glucose tolerance but increases lipid peroxidation and DNA damage in hepatocytes of fructose-fed rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* v.37, p.1–8, 2012.

CHOU, C. *et al.* Aliskiren prevents and ameliorates metabolic syndrome in fructose-fed rats. *Arch Med Sci*. v.7, n. 5, p.882-888, 2011.

D'ANGELO, G. *et al.* Fructose Feeding Increases Insulin Resistance but Not Blood Pressure in Sprague-Dawley Rats. *Hypertension*. v.46, p.806-811, 2005.

DAVIDSON, J.; ROTONDO, D. Lipid Metabolism. *Lipidology (Current Opinion)* v.11, p.211-213, 2000.

DESERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews*. v.20, n.5, p.649–688, 1999.

EBERLÉ, D. *et al.* SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. [Biochimie](#)., v.86, n.11, p.839-848, 2004.

- ESLICK, G. D. *et al.* Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cardiology*, v.136, p. 4–16, 2009.
- FAN, J.; QUIAO, L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* v.8, p.233-240, 2009.
- FERNANDEZ, M.L.; WEST, K.L. Mechanisms by which Dietary Fatty Acids Modulate Plasma Lipids. *J. Nutr.* v.135, p.2075–2078, 2005.
- FIALHO, E.; MORENO, F. S.; ONG, T. P. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. *Rev. Nutr.* v.21, n.6, p.757-766, 2008.
- FOGG-JOHNSON, N.; KAPUT, J. Nutrigenomics: An Emerging Scientific Discipline. *Food Technology.* v.57, n.4, p.60-67, 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Fats and oils in human nutrition.* Rome, 1994.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Fats and fatty acids in human nutrition.* Geneva, 2009.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Fisheries and Aquaculture Department.* World Aquaculture 2010. Rome, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *Fisheries and Aquaculture Department.* *Salmo salar.* Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/2929/en>> Acesso em: 06 fev. 2012.
- FOLCH, J., LESS, M., STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biological Chemistry*, v.226, n.1, p.497-509. 1957.
- HININGER-FAVIER, et al. Green Tea Extract Decreases Oxidative Stress and Improves Insulin Sensitivity in an Animal Model of Insulin Resistance, the Fructose-Fed Rat. *J Am Coll Nutr.* v.28, n.4, p.355-361, 2009.

- HOOPER, L. *et al.* Ácidos grasos omega-3 para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. (Revisão Cochrane traducida). La Biblioteca Cochrane Plus, n.2, 2008.
- IKEDA, I. *et al.* Reduced Hepatic Triglyceride Secretion in Rats Fed Docosahexaenoic Acid-Rich Fish Oil Suppresses Postprandial Hypertriglyceridemia. *J. Nutr.* v.131 n.4, p.1159-1164, 2001.
- JUMP, D.B. *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids.* v.153, n.1, p.3-13, 2008.
- KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R.L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol. Genomics*, v. 16, p.166-177, 2004.
- KAWASAKI, T. *et al.* Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *J. Nutr.* v.139, p.2067-2071, 2009.
- KELLEY, G.L; ALLAN, G.; AZHAR, S. High Dietary Fructose Induces a Hepatic Stress Response Resulting in Cholesterol and Lipid Dysregulation. *Endocrinology.* v.145, n.2, p.548-555, 2004.
- KERSTEN, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* v.103, p.1489-1498, 1999.
- KOTA, B.P.; HUANG, T.H.; ROUFOGALIS, B.D. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, v.51, p.85-94, 2005.
- LEE, [C.](#); OLSON, P.; EVANS, [R.M.](#) Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology.*, v.144, n.6, p.2201-2207, 2003.
- MACFARLANE, W. M. Transcription. *J Clin Pathol.*, v.53, p.1-7, 2000.
- MASSON, V.R. *et al.* Long-Chain (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Metabolic and Vascular Disorders in Fructose-Fed Rats. *J. Nutr.* v.138, n.10, p.1915-1922, 2008.

MEIRELLES, C.J.C.S. *et al.* Metabolic effects of the ingestion of different fructose sources in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. v. 119, p. 218 – 220, 2011.

MURRAY, R. *et al.* HARPER: Bioquímica Ilustrada. 26 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 692p.

NAGAI, Y. *et al.* Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v.282, p.1180–1190, 2002.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2004.

PALOU, M. *et al.* Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Eur J Physiol*. v.456, p.825–836, 2008.

PYPER, S.R. *et al.* PPAR α : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal*. v.8, p.1-21, 2010.

REEDY, J. K. Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis III. Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. v.281, p.1333–1339, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition “Ad Hoc” writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr*. v. 123, p.1939-1951, 1993.

SÁNCHEZ-LOZADA, L. *et al.* Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Renal Physiol*. v.292 n.1, p.423-429, 2007.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, v.47, p.147–155, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.*, v. 233, p.674–688, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Bras. Cardiol. v.88, supl. 1, p 2-19, 2007.

THIRUNAVUKKARASU, V.; NANDHINI, A.T.; ANURADHA, C.V. Effect of α -Lipoic Acid on Lipid Profile in Rats Fed a High-Fructose Diet. *Experimental Diab. Res.* v.5, p.195–200, 2004.

VALENZUELA, A. El salmon: um banquete de salud. *Rev. chil. nutr.*, v.32, n.1, 2005.

YASARI, S. *et al.* Effects of Exercise Training on Molecular Markers of Lipogenesis and Lipid Partitioning in Fructose-Induced Liver Fat Accumulation. *Journal of Nutrition and Metabolism.* v.2012, p.1-10, 2012.

YUAN, G.; AL-SHALI, K. Z.; HEGELE, R. A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ*, v. 176, 2007.

ZHENG, X.; AVELLA, M.; BOTHAM, K.M. Comparison of the effects of dietary *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids on very-low-density lipoprotein secretion when delivered to hepatocytes in chylomicron remnants. *Biochem. J.* v.357, p.481–487, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf> Acesso em: 25 mar. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cardiovascular disease. Disponível em: < http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/> Acesso em: 25 mar. 2012.

ANEXOS

ANEXO A – DADOS REFERENTES ÀS ANÁLISES MOLECULARES

Quadro 4 - Quantificação e análise da pureza do RNA extraído das amostras de fígado dos animais experimentais.

Extração RNA				
	Amostra	260/280	260/230	Rendimento (ng/μL)
GC	F1	1,72	0,66	372,2
	F2	1,84	0,78	1670,9
	F3	1,64	0,37	548,6
	F4	1,93	1,17	994,3
	F5	1,59	0,34	839,5
	F6	1,61	0,34	564,6
	F7	1,72	0,74	235,2
	F8	1,75	0,77	2935,6
GF	F9	1,87	1,00	2714,5
	F10	1,87	0,83	1862
	F11	1,84	0,72	2017,2
	F12	1,82	0,72	1872,8
	F14	1,83	0,78	2386,5
	F15	1,80	0,77	2733,2
	F16	1,73	0,45	1591,3
GSFI	F17	1,81	0,60	1614,5
	F18	1,82	0,65	1883,1
	F19	1,78	0,46	1376,5
	F20	1,82	0,78	2668
	F21	1,82	0,87	2945,1
	F22	1,68	0,51	1817,8
	F23	1,80	0,63	2178,7
	F24	1,80	0,54	1543,7
GSFII	F25	1,75	0,58	2097
	F26	1,79	0,73	2717,3
	F27	1,83	0,67	2223,3
	F28	1,82	0,75	2501,6
	F29	1,81	0,59	1606,3

Extração RNA			
Amostra	260/280	260/230	Rendimento (ng/μL)
F30	1,75	0,53	1923,3
F31	1,83	0,71	2101,8
F32	1,79	0,69	2521,9

Quadro 5 – Quantificação e análise da pureza do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das amostras de fígado dos animais experimentais.

Quantificação cDNA				
	Amostra	Rendimento (μg/μL)	260/280	260/230
GC	F1	1,2280	1,77	2,10
	F2	1,2785	1,77	2,16
	F3	1,2803	1,77	1,99
	F4	1,3486	1,77	2,17
	F5	1,2373	1,77	1,88
	F6	1,1496	1,78	1,94
	F7	1,3724	1,76	2,06
	F8	1,3769	1,77	1,79
GF	F9	0,8952	1,78	2,16
	F10	0,9354	1,78	2,15
	F11	0,8035	1,76	2,06
	F12	0,8559	1,76	2,09
	F14	0,9047	1,77	2,05
	F15	0,9981	1,76	2,01
	F16	0,9901	1,75	1,71
GSFI	F17	0,5384	1,75	1,77
	F18	0,5597	1,76	1,81
	F19	1,4393	1,78	2,01
	F20	1,4369	1,77	2,10
	F21	1,3988	1,78	2,12
	F22	1,4472	1,77	1,95
	F23	1,4534	1,77	2,06
	F24	1,4839	1,77	2,06
	F25	0,5912	1,74	1,73
	F26	0,5415	1,75	1,61

Quantificação cDNA				
GSFII	Amostra	Rendimento ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	260/280	260/230
	F27	0,5827	1,76	1,72
	F28	1,4559	1,78	2,11
	F29	1,3312	1,79	2,09
	F30	1,4064	1,77	1,97
	F31	1,3679	1,78	2,12
	F32	1,3857	1,77	2,03

Quadro 6 – Valores de CT e determinação do *Fold Change* das amostras analisadas.

Amostra	PPAR		MÉDIA	18S		MÉDIA	ΔCT	ΔΔCT	Fold Change
F1	24,0068	23,0756	23,5412	23,4286	23,6242	23,5264	0,0148	0,0000	1,0000
F2	21,3832	27,4887	24,4360	23,1303	23,2926	23,2115	1,2245	0,0000	1,0000
F3	23,1932	22,2439	22,7186	21,8493	22,4883	22,1688	0,5498	0,0000	1,0000
F4	22,9159	21,7456	22,3308	23,0878	23,0380	23,0629	-0,7321	0,0000	1,0000
F5	22,1261	22,1008	22,1135	23,0195	23,0803	23,0499	-0,9365	0,0000	1,0000
F6	21,8507	23,4458	22,6483	23,1090	23,2119	23,1605	-0,5122	0,0000	1,0000
F7	22,5947	23,2914	22,9431	24,2683	24,2533	24,2608	-1,3178	0,0000	1,0000
F8	21,0033	23,7098	22,3566	23,0977	22,6387	22,8682	-0,5117	0,0000	1,0000
						Média	-0,2776	0,0000	1,0
								DP	0,0
								Mediana	1,0
F9	28,9025	28,8717	28,8871	29,4809	27,9664	28,7237	0,1635	0,4411	0,7366
F10	26,4212	26,2966	26,3589	28,4950	26,2671	27,3811	-1,0222	-0,7445	1,6754
F11	29,2191	31,1112	30,1652	29,4080	28,4835	28,9458	1,2194	1,4970	0,3543
F12	26,9018	26,8756	26,8887	27,4448	28,4153	27,9301	-1,0414	-0,7637	1,6978
F14	30,2757	29,8609	30,0683	31,6902	31,6418	31,6660	-1,5977	-1,3201	2,4968
F15	25,3959	24,7354	25,0657	28,1340	27,4153	27,7747	-2,7090	-2,4314	5,3940
F16	24,5214	25,3479	24,9347	25,7885	26,9166	26,3526	-1,4179	-1,1403	2,2042
						Média	-0,9150	-0,6374	2,1
								DP	1,6

								Mediana	1,7
F19	22,5117	22,5016	22,5067	22,1689	22,3354	22,2522	0,2545	0,5321	0,6915
F20	21,4388	21,3897	21,4143	21,3798	22,7307	22,0553	-0,6410	-0,3634	1,2864
F21	19,9957	19,8405	19,9181	21,9798	22,0721	22,0260	-2,1079	-1,8302	3,5559
F22	21,1523	19,5638	20,3581	22,0054	21,1659	21,5857	-1,2276	-0,9500	1,9318
F23	21,4865	21,5805	21,5335	22,0354	21,9690	22,0022	-0,4687	-0,1911	1,1416
F24	21,0420	21,0162	21,0291	21,7817	21,8519	21,8168	-0,7877	-0,5101	1,4241
							Média	-0,8297	-0,5521
								DP	1,0
								Mediana	1,4
F28	20,4030	20,3549	20,3790	21,4717	21,4919	21,4818	-1,1029	-0,8252	1,7718
F29	21,3401	21,1151	21,2276	21,3018	21,1851	21,2435	-0,0158	0,2618	0,8341
F30	18,1678	18,0281	18,0980	21,8628	21,7539	21,8084	-3,7104	-3,4328	10,7985
F31	20,6262	20,5975	20,6119	21,0693	21,0196	21,0445	-0,4326	-0,1550	1,1134
F32	21,2418	21,3030	21,2724	21,3288	21,6805	21,5047	-0,2322	0,0454	0,9690
							Média	-1,0988	-0,8211
								DP	4,3
								Mediana	1,1

As amostras 17, 18, 25, 26 e 27 foram excluídas das análises estatísticas por problemas durante o procedimento metodológico.

ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética em Experimentação Animal
(16) 3602-3301




CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 013/2012, sobre o projeto intitulado “*Efeito do consumo do óleo de salmão na expressão gênica de PPARα e no metabolismo lipídico de ratos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Helio Vannucchi** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de março de 2012.

(We certify that the protocol nº 013/2012, about “*Effect of salmon oil consumption in gene expression (PPARα) and lipid metabolism of rats*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 03/26/2012.

Ribeirão Preto, 27 de fevereiro de 2012.


Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

APÊNDICES

APÊNCICE A – NOTA DE IMPRENSA

Estudo comprova benefícios do óleo de salmão para a saúde

Estudo indica que a gordura total hepática em ratos, aumentada pela dieta rica em frutose (açúcar da fruta), pode ser reduzida por meio do consumo de óleo de salmão. Assim, se conclui que o óleo apresenta benefícios, principalmente na redução da gordura total presente no fígado, o que pode contribuir para a melhora da saúde cardiovascular.

A Dissertação de Mestrado de Stella Lemke, com orientação de Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, para o Programa de Pós-graduação em Nutrição da UFSC estudou o efeito do consumo de óleo de salmão na expressão do gene peroxissoma alfa (PPAR α) e a concentração de triglicérides séricos e hepáticos em ratos. Em relação à concentração de triglicérides hepáticos e perfil lipídico sérico, não houve diferença significativa, exceto para a fração HDL-c, que apresentou redução nos animais que consumiram a dieta rica em frutose. Não foi observada diferença na expressão do gene PPAR α entre os grupos.

O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α) é um dos principais fatores envolvidos com a regulação do metabolismo lipídico e parece ter sua expressão aumentada pela presença de ácidos graxos polinsaturados ômega 3. O óleo de salmão, uma das principais fontes do nutriente, vem sendo utilizado na prática clínica sob alegação de promover uma melhora da saúde cardiovascular por meio da redução dos níveis plasmáticos de triglicérides.

O estudo foi desenvolvido pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Nutrição Experimental em parceria com o Laboratório de Estudos Moleculares em Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.