

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

Análise e quantificação da expressão basal do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1 e PPARs em tecidos adiposos de obesos grau III com diferentes níveis de esteatose e a modulação destes genes por resveratrol em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de obesos grau III

Cíntia dos Santos Costa

Orientador: Professor Rogério Margis

Co-orientador: Professora Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

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

Porto Alegre

2009

AGRADECIMENTOS

À Professora Regina, pelos ensinamentos que construímos juntas, pelos momentos de alegria, discórdia, confiança e conselhos. Ao Professor Rogério, à Professora Fátima, aos funcionários deste PPG e à equipe do COM, por serem atenciosos e dispostos. Aos lucros que essas horas e dias me trouxeram: Lica, Thaís, Clau, Pê, Isma, Jô, Mari, Helô, Sil e Leo. E de uma maneira muito especial à Fran, por todos os momentos. Que continuem eternamente. Aos meus amigos, por fazerem da nossa amizade, através dos momentos que soubemos viver, uma segurança constante. Também ao pessoal do trabalho e do consultório, pelo apoio e compreensão sempre que foi preciso. À minha família: pai, mãe, ninha e Dani, por serem os sentimentos mais sinceros que tenho e por serem estes os melhores nesta gama de possibilidades de sentimentos. E ao Rapha por saber inflar os sorrisos e as emoções mais bonitas que, por um motivo ou outro, se amudavam dentro de mim.

APRESENTAÇÃO

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

PARTE I

Resumo, Abstract, Lista abreviaturas e Introdução, contendo uma revisão da literatura sobre os aspectos que fundamentam este trabalho. Além dos Objetivos Gerais e Específicos desta pesquisa.

PARTE II

Capítulo 1, contendo manuscrito aceito para publicação em periódico internacional.

Capítulo 2, contendo manuscrito submetido para publicação em periódico internacional.

PARTE III

Discussão, contendo interpretação geral dos resultados apresentados nos dois capítulos. Além das conclusões finais deste trabalho e as perspectivas originadas a partir do mesmo.

REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas citadas nas Partes I e III.

ANEXOS

Anexo 1, contendo lista de figuras.

Anexo 2, contendo lista de tabelas.

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

PARTE I.....	06
RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Obesidade	10
1.2. Tecido Adiposo	11
1.3. Adipócitos.....	11
1.4. Esteatose	13
1.5. SIRT1	14
1.6. Adiponectina.....	15
1.7. FOXO1	16
1.8. PPAR	18
1.8.1. PPAR β/δ	18
1.8.2. PPAR γ	19
1.9. Resveratrol	19
1.10. Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivos Gerais.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
PARTE II.....	25
3. CAPÍTULO I.....	26
4. CAPÍTULO II.....	34
PARTE III	51

5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	62
7. PERSPECTIVAS	63
8. REFERÊNCIAS.....	64
9. ANEXOS	76

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial fortemente associada com a síndrome metabólica e com as doenças hepáticas. A distribuição da gordura corporal é um fator relevante, e especificamente o tecido adiposo visceral parece ser o elo entre o aumento de peso, a síndrome metabólica e o acúmulo de gordura hepática. Os adipócitos estão envolvidos na regulação do balanço energético e podem ser modulados por hormônios, citocinas e nutrientes, entre eles o resveratrol. São dois os objetivos principais deste trabalho: (1) identificar os níveis basais de expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ em diferentes tecidos adiposos (retroperitoneal, subcutâneo e visceral) de indivíduos obesos grau III com diferentes níveis de esteatose hepática; e (2) identificar a ação do resveratrol sobre a expressão do mRNA dos genes citados em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos grau III. Os tecidos adiposos foram obtidos durante cirurgia bariátrica. O RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol e o mRNA foi quantificado por PCR em tempo real. Para a análise da expressão basal dos genes, dividimos os pacientes em dois grupos: aqueles com esteatose simples ou moderada e aqueles com esteatose severa associada ou não à fibrose e inflamação. Comparando os dois grupos estudados, os pacientes com esteatose severa apresentaram uma menor expressão do mRNA de SIRT1 ($p=0,006$), apenas no tecido adiposo visceral. Os níveis de adiponectina, FOXO1, PPAR γ 1-3 e PPAR β/δ não diferiram estatisticamente entre os dois grupos de pacientes nos três depósitos de gordura corporal. O valor de HOMA-IR foi diferente estatisticamente entre os grupos estudados, sendo maior no grupo de pacientes com diagnóstico de esteatose severa associada ou não a fibrose e necroinflamação ($p=0,006$). Neste mesmo grupo de pacientes, a expressão de SIRT1 e o valor de HOMA-IR correlacionaram-se positivamente no tecido adiposo visceral ($r=0,607$; $p=0,048$). Quanto à modulação por resveratrol, houve aumento significativo nos níveis do mRNA de SIRT1 ($p=0,021$), adiponectina ($p=0,025$) e FOXO1 ($p=0,001$) nos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de obesos grau III. A expressão do mRNA de PPAR γ 1-3 foi modulada negativamente ($p=0,003$) nas células estudadas. Considerando a expressão do PPAR β/δ , não houve modulação por resveratrol na concentração, tempo e modelo celular estudados. Analisando a literatura, verificamos que valores diminuídos de SIRT1 já foram associados à progressão da esteatose, em modelos experimentais. Neste trabalho, observamos menor transcrição de SIRT1 no tecido adiposo visceral de obesos com esteatose severa, o que poderia prejudicar a biogênese mitocondrial e a oxidação de ácidos graxos, contribuindo com o aumento de ácidos graxos livres na circulação portal, favorecendo o acúmulo hepático de lipídeos nestes pacientes. Desta forma, sugerimos que o aumento da expressão de SIRT1 no tecido adiposo visceral pode ter efeito protetor contra a evolução da esteatose em obesos grau III. Também constatamos que resveratrol ativa a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina e FOXO1 e diminui a expressão de PPAR γ 1-3. Os resultados indicam que resveratrol pode modular o metabolismo dos adipócitos de obesos grau III, possivelmente favorecendo o metabolismo das células estudadas.

ABSTRACT

Obesity is a complex disease, strongly associated with metabolic syndrome and hepatic disease. The distribution of body fat is important, and specifically visceral adipose tissue seems to be the link between weight gain, metabolic syndrome and hepatic fat accumulation. Adipocytes are involved in the regulation of energy balance and can be modulated by hormones, cytokines and nutrients as resveratrol. The objectives of this study were: (1) to determine the expression pattern of SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA in different adipose tissues (retroperitoneal, subcutaneous and visceral) of morbidly obese with different levels of hepatic steatosis; and (2) analyze whether resveratrol could modulate the mRNA expression of the cited genes in isolated visceral adipocytes of morbidly obese. The adipose tissue was obtained by bariatric surgery. Total RNAs were extracted using TRIzol reagent and genes reverse transcripts were determined by quantitative polymerase chain reaction. For analysis of basal genes expression, we divided patients in two groups: those with slight or moderate steatosis and other comprising individuals with severe steatosis associated or not with necroinflammation and fibrosis. When comparing the two groups of patients, we found that the amount of SIRT1 mRNA in the visceral adipose tissue of morbidly obese with severe steatosis was decreased ($p=0.006$). The levels of adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ did not differ statistically between the two groups of patients in the fat depots studied. We found that HOMA-IR value was significantly higher in severe steatosis patients group ($p=0.006$). Our results also show that the mRNA expression of SIRT1 and HOMA-IR was positively correlated in the visceral adipose tissue of patients with severe steatosis ($r=0.654$; $p=0.048$). Regarding the modulation by resveratrol, there was significant increase in SIRT1 ($p=0.021$), adiponectina ($p=0.025$) and FOXO1 ($p=0.001$) mRNA in isolated visceral adipocytes. The mRNA expression of PPAR γ 1-3 was negatively modulated by resveratrol ($p=0.003$). Considering PPAR β/δ , there was not a significantly modulation by resveratrol, in the studied model. Reduced quantities of SIRT1 mRNA have been described in severe steatosis using experimental models. We found lower transcription of SIRT1 expression in the visceral adipose tissue of obese patients with severe steatosis, which may impair mitochondrial biogenesis and fatty acids oxidation, contributing to the increase of free fatty acids in portal circulation, impairing liver function. Thus, we suggest that the increased SIRT1 mRNA expression may have a protective role on steatosis in visceral adipose tissue of morbidly obese individuals. Also, we observed that resveratrol activated the expression of SIRT1, FOXO1 and adiponectin and decreases PPAR γ 1-3, which indicate that resveratrol can control adipocytes metabolism, possibly favoring the metabolism of studied cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL - ácidos graxos livres

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

B2M - beta-2-microglobulina

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar

COM-PUCRS - Centro de Obesidade Mórbida da PUCRS

dNTP - desoxirribonucleosídeos trifosfatados

FOXO1 - *forkhead/winged helix*

HOMA IR - *homeostasis model assessment insulin resistance*

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

NAFLD - *nonalcoholic fatty liver disease*

NASH - *nonalcoholic steatohepatitis*

PPARs - receptores ativadores da proliferação de peroxissomos

TA - tecido adiposo

TAR - tecido adiposo retroperitoneal

TAS - tecido adiposo subcutâneo

TAV - tecido adiposo visceral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Entende-se por obesidade o aumento excessivo de peso corporal, mais especificamente, do aumento de tecido adiposo (TA) em magnitude suficiente para produzir conseqüências adversas à saúde (Spiegelman e Flier, 2001). A prevalência da obesidade vem aumentando em proporções epidêmicas nas últimas décadas. Atualmente, cerca de 40% da população adulta brasileira possui excesso de peso sendo que 11,1% destes indivíduos já são considerados obesos (IBGE, 2004). A organização mundial da saúde (OMS) estima que para 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos no mundo estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões destes serão obesos (WHO, 2006).

A OMS classifica a população obesa em três níveis: indivíduos com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 30 e 34,9 kg/m² apresentam obesidade leve ou grau I; IMC entre 35 e 39,9 kg/m², obesidade moderada ou grau II; e IMC maior ou igual a 40 kg/m², obesidade mórbida ou grau III (OMS, 1998).

A obesidade é considerada uma desordem metabólica de etiologia multifatorial, que envolve em sua gênese fatores genéticos, ambientais, psicológicos e sociais (Sowemimo *et al*, 2007). Apesar da complexidade, sabe-se que o desequilíbrio entre ingestão e gasto energético é o raciocínio básico do seu desenvolvimento. O excesso de energia proveniente desse desequilíbrio é estocado nos adipócitos que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia, aumentando assim o volume do TA (Bays *et al*, 2008). A ascendência da obesidade está associada fortemente com a síndrome metabólica (Mitsuishi *et al*, 2009), que se caracteriza pela incidência, num mesmo indivíduo de três dos cinco parâmetros clínicos a seguir: aumento da circunferência da cintura (102 cm para homens e 88 cm para mulheres), triglicerídeos elevados (≥ 150 mg/dl), reduzido HDL (< 40 mg/dl

em homens e <50 mg/dl em mulheres), elevada pressão sanguínea (130/85 mmHg), elevada glicemia (≥ 100 mg/dl) (NCEP/ATPIII, 2002).

1.2 Tecido Adiposo

O TA foi considerado por muito tempo apenas como reservatório energético, atualmente são reconhecidas suas múltiplas funções endócrinas (Hermsdorff e Monteiro, 2004). É responsável pela produção e secreção de inúmeras citocinas – conhecidas como adipocinas, que regulam processos fisiológicos no organismo humano (Ribeiro Filho *et al*, 2006). Na obesidade, a expressão de adipocinas pode estar desregulada, o que contribui para o aparecimento de doenças metabólicas (Lefterova e Lazer, 2009).

Anatomicamente o tecido adiposo abdominal pode ser dividido em subcutâneo (anterior e posterior) e intra-abdominal (visceral e retroperitoneal) (Tchernof *et al*, 2006). A distribuição da gordura corporal é relevante e especificamente o tecido adiposo visceral (TAV) parece ser o elo entre obesidade e síndrome metabólica (Mitsuishi *et al*, 2009). O TAV é metabolicamente mais ativo, possui maior sensibilidade à ação lipolítica, maior resistência à ação da insulina, além de secretar maiores quantidades de adipocinas e ácidos graxos livres quando comparado ao tecido subcutâneo (Tchernof *et al*, 2006; Fan e Farrell, 2008).

1.3 Adipócitos

O TA é constituído de macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos (Fonseca-Alaniz *et al*, 2006). Os pré-adipócitos são derivados de células-tronco embrionárias de origem mesodérmica, localizadas na medula espinhal e no próprio TA (Bäckesjö *et al*, 2006).

Denomina-se adipogênese o fenômeno de diferenciação do pré-adipócito em adipócito maduro (figura 1) (Fonseca-Alaniz *et al*, 2006). Este processo é altamente controlado, podendo sofrer influencia de hormônios, citocinas e nutrientes (Feve, 2005). Alterações no controle do metabolismo dos lipídeos podem favorecer a adipogênese e o desenvolvimento da obesidade (Bai *et al*, 2008).

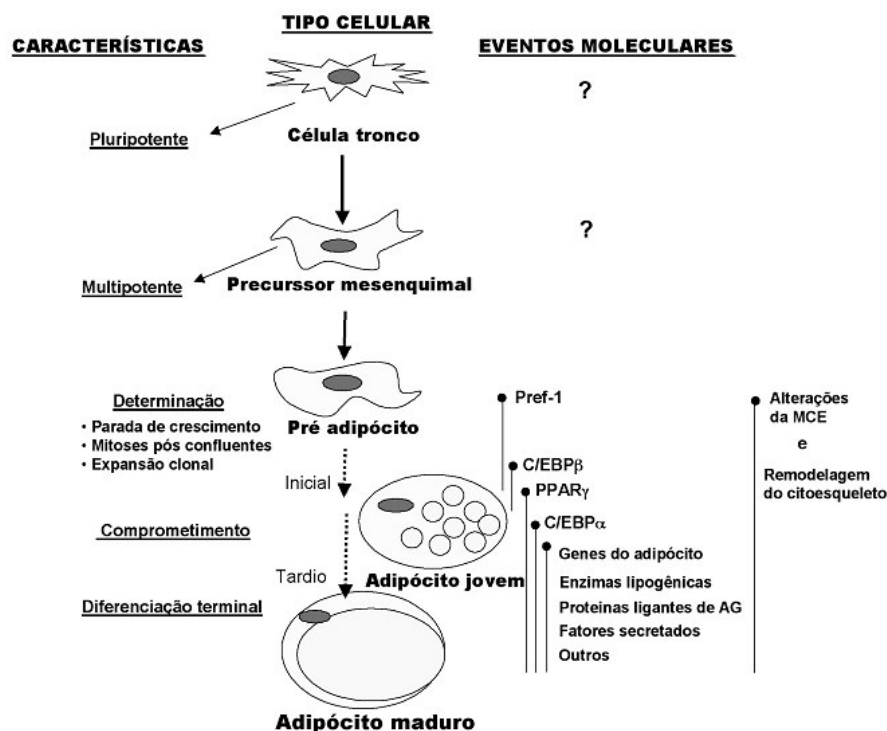


Figura 1: Visão esquemática do processo de diferenciação do adipócitos.

Fonte: Fonseca-Alaniz, 2006.

Os adipócitos são células capazes de armazenar lipídios, na forma de triacilglicerol, em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional (Fonseca-Alaniz *et al*, 2006). São consideradas unidades funcionais do tecido adiposo. Os adipócitos possuem ainda outra função relevante para o metabolismo: são capazes de secretar ácidos graxos, adipocitocinas, colesterol, hormônios esteróides e prostaglandinas (Bai *et al*, 2008). Estudos

recentes mostram que fatores de transcrição como o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ) e a enzima sirtuina 1 (SIRT1) desempenham um papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese (Picard *et al*, 2004).

1.4 Esteatose

A esteatose (comumente chamada de NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease) é uma condição clínico-patológica caracterizada pelo depósito de lipídeos nos hepatócitos, sendo que sua causa não está relacionada diretamente ao consumo excessivo de etanol (Saito *et al*, 2007). Quanto à evolução da doença, pode-se dividir sua patogênese em duas etapas: esteatose isolada e esteato-hepatite (comumente chamada de NASH, nonalcoholic steatohepatitis) (Shifflet e Wu, 2009). A primeira refere-se ao acúmulo isolado de lipídeos no fígado, podendo ser leve, moderada ou severa (Burt *et al*, 1998). Já a NASH se dá em uma etapa mais avançada, onde o acúmulo de gordura é acompanhado de fibrose e necroinflamação do parênquima hepático (Marchesini *et al*, 2008). Atualmente, a biópsia hepática é considerada padrão-ouro para diagnóstico da NAFLD (Shifflet e Wu, 2009).

A NAFLD é fortemente associada à obesidade (Park *et al*, 2006). A prevalência de NAFLD aumenta para 74 % em indivíduos obesos e 90 % em obesos grau III, comparada aos pacientes eutróficos (Vetelainen *et al*, 2007). Especificamente o aumento do TAV tem sido considerado uma das grandes causas da maior prevalência de NAFLD em obesos (Saito *et al*, 2007). Comparado ao TA subcutâneo, o visceral possui maior potencial lipolítico e a liberação de ácidos graxos livres, provenientes deste tecido diretamente na circulação porta, é um dos principais mecanismos da lesão hepática (Fan e Farrell, 2008; Shifflet e Wu, 2009). Da mesma forma, estudos alertam para a estreita relação entre síndrome metabólica e NAFLD independente de idade, gênero e índice de massa corpórea (Marchesini *et al*, 2008; Vetelainen *et al*, 2007).

Cerca de 90 % dos indivíduos com NAFLD possui pelo menos um dos parâmetros da síndrome, e 33 % possui todos os cinco parâmetros (Paschos e Paletas, 2009).

1.5 Sirtuina 1

Acetilação é uma modificação pós-transcricional reversível mediada por histonas acetiltransferases (HATs); enzimas que revertem esta alteração são referidas como histonas deacetilases (HDACs) (Sauve *et al*, 2006). A família das enzimas HDACs pode ser dividida em três classes, sendo a classe III também conhecida como família Sir2 NAD⁺-dependente ou sirtuinas, em mamíferos (Gray e Ekstrom, 2001). Existem sete isoformas diferentes de sirtuinas (1 a 7) descritas até hoje em humanos, sendo a SIRT1 a mais estudada. A proteína nuclear SIRT1 é NAD⁺-dependente (Picard *et al*, 2004), formada por 240 aminoácidos (Sauve *et al*, 2006) e sua estrutura pode ser dividida em três domínios (Figura 2): domínio amino-terminal (verde), domínio catalítico (azul) e domínio carboxi-terminal (amarelo) (Sasaki *et al*, 2008).

Cientistas têm proposto que SIRT1 possa ser um alvo para a prevenção e controle da obesidade e doenças relacionadas (Picard *et al*, 2004; Yang *et al*, 2006). Bordone e colaboradores observaram que ratos transgênicos com expressão aumentada de SIRT1 são mais magros, mais ativos metabolicamente, possuem menores níveis de colesterol total, insulina e glicose pós-prandial (Bordone *et al*, 2007). Foi recentemente mostrado o papel da SIRT1 como mediador da diferenciação de células tronco mesenquimais da medula, diminuindo a diferenciação destas em adipócitos e aumentando a diferenciação em osteoblastos (Backesjo *et al*, 2006; Yang *et al*, 2006). Além disso, estudo experimental mostrou que a expressão do mRNA de SIRT1 é significativamente reduzida no fígado de camundongos com esteatose induzida por dieta (Deng *et al*, 2007). Da mesma forma, o papel protetor da SIRT1 no estresse oxidativo, processo que estimula o desenvolvimento do NASH (Shifflet e Wu, 2009), tem sido

recentemente analisado (Hasegawa *et al*, 2008; Paschos e Paletas, 2009). Ainda, Pfluger e colaboradores encontraram que ratos transgênicos com moderado aumento na expressão de SIRT1 estão protegidos quanto ao desenvolvimento de NASH induzida por dieta rica em gordura (Pfluger *et al*, 2008).

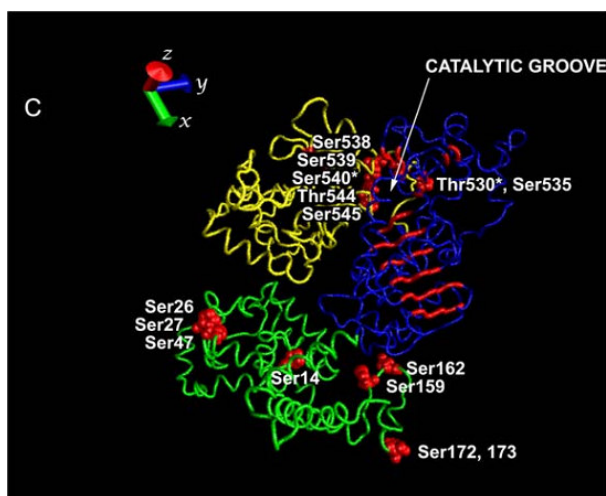


Figura 2: Estrutura em 3D da SIRT1 humana.

Fonte: Sasaki *et al*, 2008.

1.6 Adiponectina

A adiponectina, produto do gene *apM1*, é uma proteína composta por 244 aminoácidos também conhecida por GBP-28 (*gelatin binding protein-28*), adipoQ e Acrp30 (Wang *et al*, 2009). Esta adipocina é largamente secretada por adipócitos, embora possa ser também secretada por cardiomiócitos, hepatócitos e placenta em menores quantidades (Diez e Iglesias, 2003; Peterlin *et al*, 2008). Sua estrutura pode ser dividida em três domínios: (1) domínio N-terminal, com grande variação na seqüência de aminoácido entre as espécies; (2) domínio semelhante ao colágeno (assim chamado devido à homologia com o colágeno VII e X); e (3) domínio globular da região C-terminal (Richards *et al*, 2006) (Figura 3). Essa adipocitocina é secretada pelos

adipócitos na circulação sistêmica em três isoformas oligoméricas, incluindo as formas em trímeros, hexâmeros e complexas de alto peso molecular (HMW) (Wang *et al*, 2009).

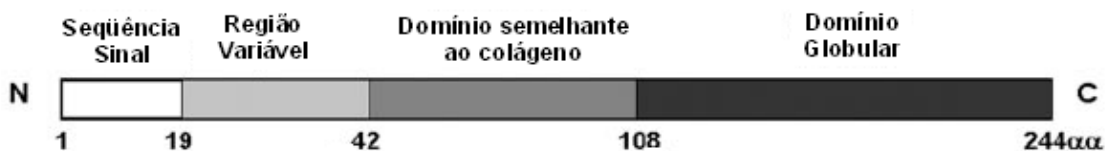


Figura 3. Estrutura da adiponectina humana.

Fonte: Richards *et al*, 2006

A adiponectina possui efeito protetor contra obesidade (Ma *et al*, 2009). A redução na expressão da adiponectina está relacionada à hiperplasia de células adiposas (Qiao e Shao, 2006). Adiponectina tem sido bastante estudada em relação ao desenvolvimento de NAFLD (Wang *et al*, 2009). Pagano e colaboradores encontraram que baixo nível de adiponectina sérica está relacionado à patogênese da NAFLD (Pagano *et al*, 2005). Expressão do mRNA de adiponectina e seus receptores no fígado foram estudados por Kaser e colaboradores em pacientes que se submeteram à cirurgia bariátrica (Kaser *et al*, 2005). Os autores encontraram que as quantidades do mRNA de adiponectina e seu receptor adipoR2 foram menores em pacientes com NASH comparado à expressão em pacientes com esteatose simples (Kaser *et al*, 2005). Um estudo em humanos sugeriu que baixa expressão do mRNA de adiponectina em tecido adiposo intra-abdominal pode estar relacionada ao desenvolvimento de NASH (Baranova *et al*, 2006).

1.7 FOXO1

A família *Forkhead/winged helix* (FOXO) é uma superfamília de fatores de transcrição responsáveis pela modulação de genes envolvidos em inúmeras funções celulares como diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Grinius *et al*, 2006; Huang e Tindall, 2007).

Algumas isoformas da família FOXO já foram descritas na literatura: FOXO1, FOXO3a, FOXO4 e FOXO6 (Huang e Tindall, 2007). As proteínas FOXO, que contém 110 aminoácidos, são compostas por três alfa-hélices arranjadas em forma eclíptica em torno de uma hélice central, rodeada de alças; esta estrutura é referida como “hélice alada” ou “cabeça em forquilha” (Friedman e Kaestner, 2006).

A FOXO1 está amplamente expressa em tecidos insulino-responsivos, como fígado, tecido adiposo e pâncreas (Kitamura *et al*, 2002). A FOXO1 pode apresentar efeitos benéficos ou não sobre o organismo, dependendo do tecido onde se dá sua ativação (Armoni *et al*, 2006; Pillarisetti, 2008). O papel fisiológico da FOXO1 no tecido adiposo ainda não está bem esclarecido (Jun *et al*, 2008). FOXO1 já foi descrito como inibidor da adipogênese (Wang e Tong, 2009). Poucos estudos associam o fator de transcrição FOXO1 à NAFLD (Calvert *et al*, 2007). Valenti e colaboradores, estudando a expressão hepática de FOXO1 em 84 pacientes observaram que a expressão deste fator de transcrição está aumentada em pacientes com diagnóstico de NASH comparado a pacientes com esteatose isolada (Valenti *et al*, 2008). FOXO1 é também relacionada à regulação da produção de espécies reativas de oxigênio, em células 3T3-L1 (Subauste e Burant, 2007).

A expressão dos genes SIRT1, adiponectina e FOXO1 parece estar interligada (Qiao e Shao, 2006; Rogers *et al*, 2008). Evidências sugerem que a expressão de FOXO1 possa estar diretamente associada à expressão de adiponectina em virtude de sua ação na formação de um complexo com C/EBP α (C/Enhancer-binding protein α) para promover a ativação da transcrição de adiponectina (Qiao e Shao, 2006). Além disso, parece que a SIRT1 aumenta transcrição de adiponectina via deacetilação de FOXO1 (Qiao e Shao, 2006), uma vez que a enzima SIRT1 e o fator de transcrição FOXO1 parecem interagir fisicamente (Yang *et al*, 2006). Ainda, em ratos, a haploinsuficiência de FOXO1 levou a uma significativa redução na expressão de adiponectina (Nakae *et al*, 2003).

1.8 PPAR

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica (Tavares *et al*, 2007). Evidências apontam para uma relação entre a atividade de PPARs, obesidade e síndrome metabólica (Guri *et al*, 2006). Três proteínas, codificadas por genes distintos, têm sido identificadas em humanos: PPAR α , PPAR γ e PPAR β/δ (Meirhaeghe e Amouyel, 2004). PPAR α é principalmente expresso no fígado, no tecido adiposo marrom, no intestino delgado, no músculo esquelético cardíaco (Grimaldi, 2001) e nas células adiposas (Diep *et al*, 2000). Esta isoforma tem um papel chave na regulação da β -oxidação no fígado (Wahli *et al*, 1995).

1.8.1 PPAR β/δ

O PPAR β/δ é expresso em diversos tecidos do corpo, principalmente no músculo cardíaco e esquelético e no TA branco (Grimaldi, 2001). Esse subtipo de receptor nuclear inicialmente recebeu menos atenção que outros PPARs devido a não existência de um ligante seletivo. Wang e colaboradores mostraram que a expressão transgênica de uma forma ativada do PPAR β/δ no TA de camundongos produziu animais magros resistentes à obesidade, à hiperlipidemia e à esteatose induzidas geneticamente ou por uma dieta rica em gordura (Wang *et al*, 2003). Recentemente, estudos moleculares desenvolveram um agonista sintético do PPAR β/δ , o que têm ajudado a revelar o seu papel como poderoso regulador do catabolismo de AG e homeostase energética. Oliver e colaboradores demonstraram, em macacos obesos, que a ativação de um novo ativador específico do PPAR β/δ (GW501516) induz a correção dos níveis de triglicérides, diminui a hiperinsulinemia e aumenta os níveis de HDL (Oliver *et al*, 2001). Outro estudo experimental sugere que tratamento com agonista do PPAR β/δ , ou aumento da

expressão deste receptor nuclear, reduz significativamente o acúmulo de lipídeo nos hepatócitos (Qin *et al*, 2008).

1.8.2 PPAR γ

O PPAR γ é expresso nos tecidos adiposo branco e marrom, na placenta, no intestino e nos macrófagos (Grimaldi, 2001). O gene deste receptor nuclear contém três promotores distintos denominados PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. A transcrição do PPAR γ 1 e PPAR γ 3 gera uma proteína idêntica (Kota *et al*, 2005), enquanto que a transcrição do PPAR γ 2 forma uma proteína que contém 28 aminoácidos adicionais (Meirhaeghe e Amouyel, 2004).

O PPAR γ desempenha um papel-chave na complexa cascata que regula a adipogênese (Spiegelman, 1998), sendo considerado um regulador da diferenciação de células mesenquimais em adipócitos ou osteoblastos (Backesjo *et al*, 2006) (figura 1). Além disso, estudos experimentais recentes mostram relação entre NAFLD e PPAR γ . Gavriola e colaboradores observaram que os níveis do mRNA de PPAR γ estavam elevados no fígado de ratos com esteatose (Gavriola *et al*, 2003). Estudos sugerem que SIRT1 inibe a ação do PPAR γ por reprimir seu corepressor (NCoR), promovendo lipólise e perda de gordura (Backesjo *et al*, 2006; Sharma e Staels, 2007; Pillarisetti, 2008). Da mesma forma, estudos mostram que FOXO1 é capaz de reprimir a expressão de PPAR γ em adipócitos primários (Armoni *et al*, 2006).

1.9 Resveratrol

O resveratrol é um polifenol encontrado em plantas como eucalipto, amendoim, amora e em uvas, principalmente nas sementes de uvas, na película das uvas pretas e no vinho tinto (Bertagnolli *et al*, 2007; Sautter *et al*, 2005). É sintetizado naturalmente na planta sob duas

formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3, 5,4'-trihidroxiestilbeno) (Sautter *et al*, 2005) (Figura 4).

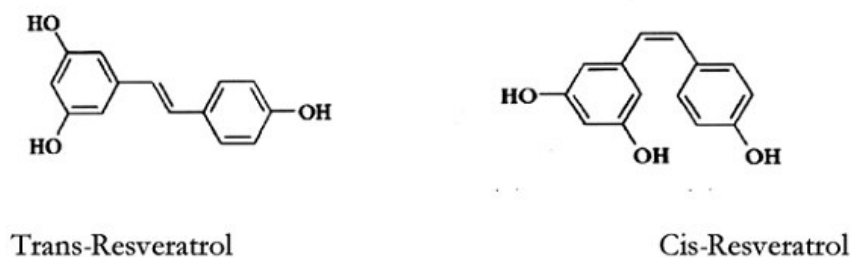


Figura 4. Estrutura do resveratrol.

Fonte: Sautter et al, 2005

Evidências sugerem que resveratrol é um nutriente com potencial efeito protetor contra doenças metabólicas (Cucciolla *et al*, 2007; Harikumar e Aggarwal, 2008). De acordo com Laugouge e colaboradores o tratamento com resveratrol protegeu camundongos contra indução de obesidade pela dieta (Laugouge *et al*, 2006). Yang e colaboradores, estudando células 3T3-L1 de ratos, encontraram que resveratrol possui um possível potencial anti-obesidade, uma vez que inibe a diferenciação de pré-adipócitos e induz a apoptose de adipócitos maduros (Yang *et al*, 2008). No entanto, os mecanismos pelos quais o resveratrol exerce tais efeitos positivos ainda não estão completamente elucidados (Baur *et al*, 2006).

Estudos realizados em ratos e células 3T3-L1 mostram que a expressão de SIRT1 é modulada positivamente por resveratrol (Picard *et al*, 2004; Shan *et al*, 2009). Estudo em modelo animal mostrou que tratamento com resveratrol ativa a expressão de SIRT1, bloqueando a diferenciação das células mesenquimais em adipócitos e favorecendo a diferenciação em osteoblastos (Backesjo *et al*, 2006). Sabe-se também que a ativação da SIRT1 pelo resveratrol produz efeitos positivos tais como melhora da sensibilidade à insulina, aumento do número e do tamanho das mitocôndrias e ativação da enzima proteína quinase ativada por AMP (AMPK), em

células de fígado de rato (Baur *et al*, 2006). A expressão do fator de transcrição FOXO1 parece sofrer modulação por resveratrol. Bai e colaboradores encontraram que resveratrol diminui significativamente a expressão do mRNA de FOXO1 em pré-adipócitos de porcos (Bai *et al*, 2008). Por outro lado, Subauste e Burant observaram que tratamento com resveratrol aumenta os níveis de FOXO1, em células 3T3-L1 (Subauste e Burant, 2007). Além disso, resveratrol pode estar envolvido na modulação dos níveis de adiponectina. Pesquisas realizadas por Rogers e colaboradores indicam que tratamento com resveratrol aumentou significativamente as concentrações séricas de adiponectina, prevenindo o acúmulo de gordura hepática (Rogers *et al*, 2008). Este aumento na expressão de adiponectina foi acompanhado por um aumento nos níveis do mRNA de SIRT1 e FOXO1 no tecido adiposo (Rogers *et al*, 2008). Qiao e Shao observaram que SIRT1 aumenta transcrição de adiponectina, através da ativação de FOXO1 em células 3T3-L1 (Qiao e Shao, 2006). Considerando a expressão de PPARs, já foi descrito que resveratrol inibe a expressão de PPAR γ em células 3T3-L1 de murinos (Floyed *et al*, 2008), em adipócitos isolados de porcos (Pang *et al*, 2006) e células 3T3-L1 de camundongos (Rayalam *et al*, 2008). Quanto à isoforma PPAR β/δ , não se sabe se resveratrol pode influenciar sua expressão.

1.10 Justificativa

O TA tem sido freqüentemente associado ao desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade. No entanto, pouco se sabe a respeito da regulação deste tecido a nível molecular. Sabe-se que o padrão de expressão de diversos genes apresenta diferenças entre o TA retroperitoneal, subcutâneo e visceral (Klein, 2004). O tecido adiposo visceral, por exemplo, está fortemente relacionado ao desenvolvimento de NAFLD, devido à grande secreção de adipocinas e ácido graxo livre diretamente na circulação portal (Marchesini *et al*, 2008).

Estudos sugerem que SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ possam estar envolvidos na patogênese da NAFLD, em ratos (Oliver *et al*, 2001; Gavrilova *et al*, 2003; Rogers *et al*, 2008). Na literatura, encontramos apenas um estudo que analisa e quantifica a expressão de adiponectina em humanos com diferentes graus de esteatose. Baranova e colaboradores, estudando expressão do mRNA de adiponectina no tecido adiposo visceral de obesos, sugeriram que o baixo nível de expressão deste gene pode predispor ao desenvolvimento de NASH (Baranova *et al*, 2006). Pesquisas envolvendo SIRT1, FOXO1, PPARs e NAFLD, em humanos, nunca foram realizados.

Vários estudos demonstraram que tratamento com resveratrol aumenta a expressão do mRNA de SIRT1, FOXO1 e adiponectina em células 3T3-L1 (Picard *et al*, 2004; Qiao e Shao, 2006; Subauste e Burant, 2008). Rayalam e colaboradores observaram que resveratrol modulou negativamente a expressão de PPAR γ em células 3T3-L1 (Rayalam *et al*, 2008). Entretanto, a modulação por resveratrol da expressão do mRNA de SIRT1, FOXO1, adiponectina, PPAR γ e PPAR β/δ em tecido adiposo visceral de humanos, ainda não foi descrita.

Com base no exposto, propomos duas hipóteses. A primeira é que a modulação da expressão relativa do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ nos tecidos adiposos retroperitoneal, subcutâneo e visceral de pacientes obesos grau III esteja relacionado com o grau de esteatose. E a segunda é que o resveratrol module positivamente SIRT1, adiponectina, FOXO1 e PPAR β/δ e negativamente a expressão do mRNA de PPAR γ .

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Parte I:

- Identificar os níveis basais de expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ nos diferentes tecidos adiposos (retroperitoneal, subcutâneo e visceral) de indivíduos obesos grau III com diferentes níveis de esteatose hepática.

Parte II:

- Identificar a ação do resveratrol sobre a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos grau III.

2.2 Objetivos específicos

Parte I:

- Quantificar e analisar por qRT-PCR a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ em tecido adiposo retroperitoneal, subcutâneo e visceral de indivíduos obesos grau III com diferentes níveis de esteatose hepática.

- Correlacionar variáveis antropométricas e bioquímicas dos indivíduos obesos grau III com diferentes níveis de esteatose hepática com a expressão dos genes citados acima nos três tecidos adiposos.

Parte II:

- Estabelecer a técnica de isolamento, cultura e incubação dos adipócitos provenientes do tecido adiposo visceral;
- Quantificar por qRT-PCR a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ dos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral tratados com resveratrol (1 μ M);
- Determinar o efeito do tratamento com 1 μ M de resveratrol sobre a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ , em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral.

3. CAPITULO I

SIRT1 transcription are decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with
severe hepatic steatosis

(manuscrito aceito para publicação no periódico Obesity Surgery)

SIRT1 Transcription Is Decreased in Visceral Adipose Tissue of Morbidly Obese Patients with Severe Hepatic Steatosis

Cíntia dos Santos Costa · Thais Ortiz Hammes · Francieli Rohden · Rogério Margis · Josiane Woutheres Bortolotto · Alexandre Vontobel Padoin · Cláudio Cora Mottin · Regina Maria Guaragna

Received: 22 June 2009 / Accepted: 1 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract

Background Visceral adipose tissue is known to release greater amounts of adipokines and free fatty acids into the portal vein, being one of the most predictive factors of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Our study has the purpose to evaluate sirtuin 1 (SIRT1), adiponectin, Forkhead/winged helix (FOXO1), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 1–3, and PPAR β / δ mRNA expression in morbidly obese patients in three different lipid depots: visceral (VAT), subcutaneous (SAT), and retroperitoneal (RAT). Recent studies suggest that SIRT1, a NAD⁺-dependent deacetylase, protects rats from NAFLD.

Methods We divided the patients in two groups: those with slight or moderate steatosis (hepatic steatosis, HS) and other comprising individuals with severe steatosis associated or not with necroinflammation and fibrosis (severe hepatic steatosis, SHS). The adipose tissue depots were obtained during bariatric surgery. Total RNAs were extracted using

TRIzol. The amount of genes of interest was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results When comparing the two groups of patients, a decrease in SIRT1 was observed in VAT of morbidly obese patients in SHS group ($p=0.006$). The mRNA expression of the other genes showed no differences in VAT. No difference was found either in SAT or in RAT for all genes in the study. In addition, the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) value was higher in SHS group compared to HS ($p=0.006$). Also, our results show that the mRNA expression of SIRT1 and the value of HOMA-IR were positively correlated in VAT of SHS patients ($r=0.654$; $p=0.048$).

Conclusions Downregulation of SIRT1 mRNA expression in VAT of SHS could be possible impairing mitochondria biogenesis and fatty acid oxidation, promoting severe steatosis in obese patients. Our results provide a possible proof of SIRT1 protective potential in VAT against NAFLD in humans.

Keywords Adipose tissue depots · SIRT1 · Hepatic steatosis · Visceral adipose tissue

C. d. S. Costa · T. O. Hammes · F. Rohden · R. Margis · J. W. Bortolotto · R. M. Guaragna (✉)
Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600—anexo,
90035-003 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
e-mail: rguaragna@terra.com.br

R. Margis
Centro de Biotecnologia, UFRGS,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

A. V. Padoin · C. C. Mottin
Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica,
Hospital São Lucas da PUCRS,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Abbreviations

NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
AT	Adipose tissue
FFA	Free fatty acid
RAT	Retroperitoneal adipose tissue
SAT	Subcutaneous adipose tissue
VAT	Visceral adipose tissue
FOXO1	Forkhead/winged helix
SIRT1	Sirtuin 1
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction

Introduction

Obesity is a condition described as excess of body weight, more specifically of adipose tissue (AT) [1, 2]. Evidence suggests that there are differences in biochemical and molecular characteristics of different lipid depots [3–6]. Visceral AT has greater lipolytic potential than subcutaneous AT, and the release of free fatty acid (FFA) from visceral fat depots directly into the portal circulation is one of the mechanisms of hepatic injury [7]. Busetto et al. found a strong association between visceral fat accumulation and liver steatosis in morbidly obese women [8].

Several studies in selected cohorts have extensively demonstrated that obesity may play a role in the development and progression of steatosis [9]. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized as liver fat accumulation [10]. Liver fat deposition may either be isolated (steatosis) or associated with a variable degree of necroinflammation and fibrosis (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) [7, 9].

Sirtuins (SIRT) are a mammalian NAD^+ -dependent histone deacetylase family [11]. There are seven mammalian sirtuins, SIRT1–7, of which SIRT1 has been the most studied [12, 13]. SIRT1 has been implicated in the control of lipid and glucose metabolism [14–16]. A recent study suggests that moderated overexpression of SIRT1 protects mice from NAFLD [17]. Another study found that the expression of SIRT1 in liver is significantly reduced in NAFLD induced by high-fat diet in rats [18]. In addition, the protective role of SIRT1 in oxidative stress, which is involved in the development of NASH [9], has been recently evaluated [19–22].

Adiponectin is an adipocyte-derived protein that has anti-obesity, antidiabetic, and anti-inflammatory properties and is considered to have a hepatoprotective function [23]. In human patients with NAFLD, serum adiponectin levels were found to be decreased [24]. The transcriptional factor Forkhead/winged helix (FOXO1) had been recently associated with NAFLD [25–27]. Valenti et al., studying 84 patients with liver fat accumulation, found that FOXO1 hepatic expression was increased in patients with steatohepatitis [28].

The nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family has been intensively studied in the past several years. The PPAR family comprises three isoforms: PPAR α , PPAR γ , and PPAR β/δ [29]. PPAR γ is highly expressed in adipose tissue and plays a key role in adipogenic activity [30, 31]. It has been reported that SIRT1 represses PPAR γ in white AT by docking with its cofactors nuclear receptor corepressor [14, 32]. PPAR γ mRNA levels are usually elevated in steatotic mice liver [33]. Little is known about PPAR β/δ related to NAFLD. A recent study shows that treatment with PPAR β/δ agonist or overexpression of this nuclear receptor markedly reduced intracellular lipid accumulation [34].

Driven by the need for potent and safe options to treat obesity and its related abnormalities as steatosis, numerous efforts are currently under way to achieve a better understanding of molecular networks controlling cellular glucose, lipid, and energy metabolism [17]. The sequence of events and the mediators linking AT, especially visceral fat, to liver disease progression are not well defined [7]. Different abdominal (visceral, subcutaneous, and retroperitoneal) AT depots have different metabolisms and play a yet unknown role in obesity and NAFLD. In this study, we investigated the relationship between SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β/δ relative mRNA expression in various ATs of morbidly obese patients with different degrees of hepatic steatosis.

Materials and Methods

Samples

Samples of visceral AT (VAT), subcutaneous AT (SAT), and retroperitoneal AT (RAT) were obtained from 24 morbidly obese patients (body mass index-BMI ≥ 40 kg/m²) who underwent open Roux-en-Y gastric bypass at the Center of Morbid Obesity of the São Lucas Hospital of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Brazil). The incision was made vertically along the midline, above umbilicus, with a scalpel blade. At this region, SAT sample was collected. To access the cavity, the surgeons opened the aponeurosis with an electrocautery, and preperitoneal AT resection was made, which was called retroperitoneal fat. Next, VAT collection was made in omentum, without cauterization. Subjects with a history of excessive drinking or other specific liver diseases were excluded from the study. Patients' weight had been stable for at least 1 year. No subjects were taking any medications affecting adipocyte metabolism.

Patients were divided in two groups according to fat liver accumulation levels, diagnosed by liver biopsy material collected during bariatric surgery [9, 35]. Steatosis degree was classified according to Burt et al. [36]. The hepatic steatosis (HS) group was formed by patients with slight to moderate steatosis ($n=12$), and the severe hepatic steatosis (SHS) group was formed by patients with severe steatosis associated or not with necroinflammation and fibrosis ($n=12$). The study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (No. 2007/936). All subjects were informed about the aim of the study and signed the informed consent form.

Analysis of mRNA Expression

AT samples were collected and immediately immersed in TRIzol reagent for total RNA extraction. Approximately

2 µg of total RNA were added to each cDNA synthesis reaction using 200 U of the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) in a final volume of 25 µL. Reactions were performed at 42°C for 1 h using the primer T23V (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV-3'). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification was carried out using specific primer pairs designed with the Primer 3 calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) and synthesized by Prodimol (São Paulo, Brazil). The sequences of the primers used are listed in Table 1. An Applied-Biosystem 7500 real-time cyclor was used to carry out the qRT-PCRs. Reaction settings were formed by an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 10 s at 60°C, 15 s at 72°C, and 35 s at 60°C. Samples were held for 15 s at 95°C for annealing and then heated for 1 min at 60°C with a ramp of 0.1°C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. The qRT-PCRs were made in a final volume of 20 µL, formed of 10 µL of each reverse transcription sample diluted 40 to 100 times, 2 µL of PCR buffer diluted ten times, 1.2 µL of 50 mM MgCl₂, 0.1 µL of 5 mM deoxyribonucleotide triphosphate, 0.4 µL of 10 µM primer pairs, 4.25 µL of water, 2.0 µL of SYBR green (1:10,000; Molecular Probe), and 0.05 µL of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µL; Invitrogen).

Data Analyses

We quantified gene expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (threshold cycle) method [37]. For each sample analyzed in quadruplicate, a ΔC_T value was obtained by subtracting the beta-2-microglobulin (B2M) C_T value from the C_T value of the gene of interest. The ΔC_T mean value obtained for the HS group was used to calculate the $\Delta\Delta C_t$ of each gene and tissue ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

The extensive clinical and laboratory data routinely collected for each patient are shown in Table 2. The homeostasis model assessment for insulin resistance

(HOMA-IR) is a mathematical model that measures values of insulin resistance in humans. It is calculated as follows: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting plasma insulin level (microunits per milliliter)} \times (\text{fasting plasma glucose level (milligrams per deciliter)} \times 0.05551) / 22.5$ [38].

Statistics

To compare SIRT1, adiponectin, FOXO1, and PPARs mRNA expression between HS and SHS patients, we used the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Data are shown as median ± confidence interval. To compare anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese patients between the HS and SHS groups, we used the parametric independent sample *T* test. Data are shown as mean ± standard deviation. The correlations were examined by the nonparametric Spearman's rank test. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. All data were calculated using the SPSS program (version 15.0).

Results

When evaluating anthropometric data (BMI, waist, and hip), no significant difference was observed between HS and SHS patients (Table 2). Considering age, HS patients were a little younger than SHS patients were, but this difference is not statistically significant. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) values showed no difference between the two groups, but both mean values were above normal reference values in the SHS group [39]. The serum triglyceride mean value of HS patients was smaller than in SHS, but not statistically different. Values of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were not different between both groups. However, HOMA-IR values were substantially different in HS when compared with SHS ($p=0.006$). The

Table 1 Oligonucleotides used in qRT-PCR reactions

B2M	Forward 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' Reverse 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'
SIRT1	Forward 5'-GAGTGGCAAAGGAGCAGA-3' Reverse 5'-TCTGGCATGTCCCACTATC-3'
Adiponectin	Forward 5'-TGGTGAGAAGGGTGAGAA-3' Reverse 5'-AGATCTTGGTAAAGCGAATG-3'
FOXO1	Forward 5'-TGGACATGCTCAGCAGACATC-3' Reverse 5'-TTGGGTCAGGCGTTCA-3'
PPAR γ 1–3	Forward 5'-AGGCCATTTTCTCAAAC-3' Reverse 5'-AGAAATGCTGGAGAAGTCAACA-3'
PPAR β / δ	Forward 5'-AATGCCTACCTGAAAAACTTCAAC-3' Reverse 5'-GTGCACGCTGATTCCTTGT-3'

Table 2 Anthropometric and biologic parameters of HS and SHS obese patients

	HS group mean (\pm SE)	SHS group mean (\pm SE)
BMI (kg/m ²)	46.76 (\pm 2.96)	47.57 (\pm 2.68)
Waist (cm)	130.00 (\pm 6.26)	137.08 (\pm 5.38)
Hip (cm)	141.50 (\pm 5.31)	141.08 (\pm 7.07)
Age (years)	34.83 (\pm 3.21)	36.08 (\pm 3.32)
ALT (U/L)	28.91 (\pm 5.09)	39.67 (\pm 10.55)
AST (U/L)	41.73 (\pm 8.48)	59.00 (\pm 14.24)
Triglycerides (mg/dL)	147.8 (\pm 26.43)	159.75 (\pm 21.17)
Total cholesterol (mg/dL)	189.0 (\pm 9.06)	185.08 (\pm 12.20)
HDL-C (mg/dL)	46.80 (\pm 1.88)	49.09 (\pm 5.14)
LDL-C (mg/dL)	129.6 (\pm 8.04)	111.36 (\pm 11.91)
HOMA-IR (mmol/L \times μ U/mL)	5.01 (\pm 0.74)	7.02 (\pm 1.58)*

To compare anthropometric and biologic data between obese patients with HS and the SHS groups, the parametric independent sample *T* test was used to calculate *p* values

**p* \leq 0.05 (represents a statistically significant difference between HS and SHS)

mean value of HOMA-IR was 5.01 \pm 0.74 in HS and 7.02 \pm 1.58 in SHS.

The expression of SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β / δ mRNA in VAT, SAT, and RAT of morbidly obese subjects was assessed by qRT-PCR. Table 3 reflects the relative SIRT1 mRNA expression profile of morbidly obese patients in the three ATs. In VAT, SIRT1 mRNA expression was statistically different

between the HS and SHS groups (*p* = 0.006). In this tissue, SIRT1 amounts were lower in SHS (0.12) when compared with HS (1.04). SIRT1 relative mRNA expression in SAT and RAT did not maintain the statistically difference between the two groups of patients (Table 3).

Table 3 also presents adiponectin and FOXO1 relative mRNA expression of both groups of patients. The expression of adiponectin and FOXO1 in SAT and VAT was not

Table 3 Comparative analyses of SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β / δ mRNA levels between HS and SHS obese patients in VAT, SAT, and RAT

Gene	VAT (median \pm confidence interval)	SAT (median \pm confidence interval)	RAT (median \pm confidence interval)
SIRT1			
Group HS	1.04 (0.37–3.49)	1.39 (0.19–4.01)	0.82 (–0.58–4.60)
Group SHS	0.12 (0.09–0.57)*	0.80 (0.03–2.62)	0.60 (0.28–1.11)
Adiponectin			
Group HS	1.44 (0.50–2.14)	1.97 (–1.46–8.24)	ND
Group SHS	1.77 (0.23–3.57)	5.36 (–1.97–11.84)	ND
FOXO1			
Group HS	1.37 (0.36–2.64)	1.04 (0.56–1.65)	ND
Group SHS	1.84 (1.27–2.47)	0.59 (0.28–0.81)	ND
PPAR γ 1-3			
Group HS	1.38 (–0.66–5.93)	1.14 (0.27–3.10)	1.41 (0.26–2.87)
Group SHS	0.75 (0.20–1.75)	0.65 (0.01–1.89)	0.64 (0.44–0.90)
PPAR β / δ			
Group HS	1.43 (0.28–2.75)	1.35 (0.01–2.92)	1.30 (0.02–3.43)
Group SHS	0.80 (0.20–1.27)	1.36 (–0.20–4.86)	0.76 (0.17–1.17)

To compare the expression pattern of SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β / δ mRNA in different abdominal AT—VAT, SAT, and RAT—in the HS and SHS groups, the nonparametric Mann-Whitney *U* test was used. Data are shown as median \pm confidence interval. Relative expressions were normalized against B2M (ΔC_T) and calibrated to the mean value of HS of each gene and tissue ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)

ND not determined

**p* \leq 0.05 (a statistically significant difference between HS and SHS)

statistically different between the two groups. We did not analyze adiponectin and FOXO1 mRNA expression in RAT.

Furthermore, we analyzed PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ expression in the three AT depots (Table 3). When comparing the PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ relative mRNA expression between HS and SHS, we found that there was no statistically significant difference in VAT, SAT, and RAT between these two groups.

Gene expression in VAT, anthropometric, and biochemical parameters of morbidly obese patients were correlated. We found a positive correlation between SIRT1 mRNA expression and HOMA-IR value ($r=0.654$, $p=0.048$) in SHS group.

Discussion

Adipose tissue is not simply a storage depot for energy but rather an endocrine organ. VAT is known to release large quantities of adipokines and FFAs into the portal vein, being one of the most predictive factors of NAFLD [7, 9]. The sequence of events and the mediators linking abdominal fat to liver disease progression are not well defined [7]. Information on site-related gene expression of SIRT1, adiponectin, FOXO1, and PPARs in human AT is limited. The aim of this study was to compare the relative mRNA expression of SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β/δ in morbidly obese patients with different grades of hepatic steatosis. We evaluated gene expression in various abdominal tissues—visceral, subcutaneous, and retroperitoneal—to understand the role of different adipose depots in NAFLD obese patients.

Almost nothing is known about PPARs expression in human adipose tissue related to NAFLD. Transgenic expression of an activated form of PPAR β/δ in AT produces lean mice that are resistant to obesity and tissue steatosis [40]. We found no difference in PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression in various abdominal adipose depots between HS and SHS morbidly obese patients. A recent study published by our group suggests a probable imbalance between PPAR β/δ (involved in fatty acid oxidation) and PPAR γ 1-3 (related to adipogenesis) expression regulating adipocytes development in obesity [41]. PPAR expression in AT could be associated with obesity [41] but, according to our present results, may be not related to NAFLD severity.

An increased number of evidence has linked NAFLD and metabolic syndrome with an excess of visceral fat [7, 9]. Although the data are mainly epidemiologic, the pathogenesis of NAFLD and metabolic syndrome seems to have a common pathophysiologic mechanism [19]. VAT tissue releases greater quantities of adipokines and excess FFAs into the portal vein, exposing the liver to higher FFA

concentrations [7, 9]. There is one study that analyzed adiponectin expression in human AT related to NAFLD [42]. By the other side, neither study has been yet described about SIRT1 and FOXO1 mRNA expression in human AT of morbidly obese patients related to NAFLD. Our results indicate a reduced SIRT1 mRNA expression in SHS compared to HS morbidly obese patients, only in VAT. We did not find any difference in adiponectin and FOXO1 mRNA expression between HS and SHS in this tissue.

A few number of studies have suggested the protective effects of SIRT1 on the pathogenesis of NAFLD. Pfluger et al. found that transgenic mice moderately overexpressing SIRT1, when on a high fatty acid diet, are almost entirely protected from hepatic steatosis [17]. Yamazaki et al., using a SIRT1 specific activator (SRT1720), found that SRT1720 treatment significantly reduced triglycerides and aminotransferase levels, lipogenic genes expression (acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase), and FFA serum levels in MSG mice [43].

Also, SIRT1 is involved in fatty acid mobilization in AT [32] and has been related to the stimulus of mitochondrial biogenesis [12]. Recent studies emphasize the role of mitochondrial dysfunction in the development and progression of NAFLD [17, 44]. Maassen et al. have recently published the hypothesis that one of the functions of mitochondria in AT is to prevent leakage of fatty acids into the circulation, which could attenuate the development of ectopic triacylglycerol deposits in the liver [45]. Therefore, downregulation of SIRT1 in VAT of obese patients with severe steatosis could impair mitochondrial activity, increase the release of FFA into the portal circulation, and augment the hepatic oxidative stress and inflammation-related genes expression which contribute to the development of steatohepatitis [17, 44, 46].

The present study is the first report to analyze SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β/δ expression in SAT of morbidly obese patients with different degrees of steatosis. A previous study had discussed the role of subcutaneous fat in NAFLD [17], but we found no difference in gene expression in SAT between simple and severe steatosis. There are no studies on RAT related to NAFLD. No statistically significant difference was observed in SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3, and PPAR β/δ mRNA expression in this tissue in HS and SHS patients.

In the present study, we evaluated the gene mRNA expression levels, which may not necessarily equate to protein synthesis. Therefore, further studies are necessary to reveal this.

The molecular mechanisms underlying the relationship between fat liver accumulation and insulin resistance have not been evaluated in humans [28]. NAFLD was significantly associated with HOMA-IR, which is more marked in the presence of NASH [28]. Park et al., studying the

prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease among Korean adults, found that NAFLD was significantly associated with elevated HOMA-IR [47]. In our study, we observed that the HOMA-IR mean value in HS was statistically smaller in SHS and that in SHS group, SIRT1 correlated positively with HOMA-IR, suggesting that lower SIRT1 mRNA expression could also be involved in glucose and insulin metabolism damaging in SHS patients.

In summary, the present study shows that SIRT1 relative mRNA expression was lower in VAT of SHS patients when compared with HS patients. We suggest that downregulation of SIRT1 in VAT of SHS could impair mitochondria biogenesis and fatty acid oxidation, promoting severe hepatic steatosis in morbidly obese patients. VAT plays an important role in the pathogenesis of hepatic steatosis because it supplies fat to the liver via the portal vein, and SIRT1 could prevent FFAs from being released from VAT. Nevertheless, our study really provided a molecular evidence for the use of SIRT1 as a therapy for the management of NAFLD. More research is necessary to better the association between VAT and steatosis.

Acknowledgments This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Dr. R. Margis is recipient of a research fellowship from the CNPq.

References

- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104:531–43.
- Cota D, Proulx K, Seeley RJ. The role of CNS sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology*. 2007;132:2158–68.
- Levvraz C, Verdumo C, Giustu V. Localization of adipose tissue: clinical implications. *Rev Med Suisse*. 2008;4:844–7.
- Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition*. 2003;19:457–66.
- Arner P. Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochem Soc Trans*. 2001;29:72–5.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:367–77.
- Marchesini G, Moscatiello S, Domizio SD, et al. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:S74–80.
- Busetto L, Tregnaghi A, Marchi FD, et al. Liver volume and visceral obesity in women with hepatic steatosis undergoing gastric banding. *Obes Res*. 2002;10:408–11.
- Shifflet A, Wu GY. Non-alcoholic steatohepatitis: an overview. *J Formos Med Assoc*. 2009;108:4–12.
- Chen CH, Huang MH, Yang JC, et al. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population of Taiwan: metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in non-obese adults. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40:745–52.
- Yang Y, Fu W, Chen J, et al. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol*. 2007;9:1253–62.
- Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in disease of aging? *Trends Biochem Sci*. 2007;32:555–60.
- Yang T, Fu M, Pestell R, et al. Sirt1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17:186–91.
- Picard F, Guarente L. Molecular links between aging and adipose tissue. *Int J Obes*. 2005;29:36S–9.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005;434:113–8.
- Milne JC, Lambert PD, Schenk S, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007;450:712–6.
- Pfluger PT, Herranz D, Miguel SV, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *PNAS*. 2008;105:9793–8.
- Deng XQ, Chen LL, Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int*. 2007;27:708–15.
- Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. 2009;13:9–19.
- Tsai YS, Maeda N. PPAR γ : a critical determinant of body fat distribution in human and mice. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15:81–5.
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, et al. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372:51–6.
- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. Sirt1 regulated aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2007;100:1512–21.
- Ma H, Gomez V, Lu L, et al. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;24:233–7.
- Aygun C, Senturk O, Hulagu S. Serum levels of hepatoprotective peptide adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:175–80.
- Calvert VS, Collantes R, Elariny H, et al. A systems biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis. *Hepatology*. 2007;46:166–72.
- Qu S, Altomonte J, Perdomo G, et al. Aberrant Forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology*. 2006;147:5641–52.
- Fan WQ, Imamura T, Sonoda N, et al. FOXO1 transrepresses PPAR γ transactivation, coordinating an insulin-induced feed-forward response in adipocytes. *J Biol Chem*. 2009;284:12188–97.
- Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Increased expression and activity of transcriptional factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes*. 2008;57:1355–62.
- Semple RK, Krishna V, Chatterjee VKK, et al. PPAR γ and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 2006;116:581–9.
- Kota BP, Huang THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005;51:85–94.
- Sharma AM, Staels B. Review: peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue—understanding obesity-related change in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:386–95.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ . *Nature*. 2004;429:771–6.
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biochem Chem*. 2003;278:34258–76.
- Qin X, Xie X, Fan Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses

- hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology*. 2008;48:432–41.
35. Padoin AV, Mottin CC, Moretto M, et al. A comparison of wedge and needle hepatic biopsy in open bariatric surgery. *Obesity Surgery*. 2006;16:178–82.
 36. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol*. 1998;15:246–58.
 37. Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
 38. Matthews DR, Hosker JR, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–9.
 39. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40:S5–10.
 40. Wang YX, Lee CH, Tiep S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113:159–70.
 41. Bortolotto JW, Margis R, Ferreira AC, et al. Adipose tissue distribution and quantification of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperi-
toneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. *Obes Surg*. 2007;17:934–40.
 42. Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, et al. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg*. 2006;16:1118–25.
 43. Yamazaki Y, Usui I, Kanatani Y. Treatment with SRT1720, a SIRT1 Activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E1179–86.
 44. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2008;14:193–9.
 45. Maassen JA, Romijn JA, Heine RJ. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: do adipocytes consume sufficient amounts of oxygen to oxidize fatty acids? *Diabetologia*. 2008;51:907–8.
 46. Pitt HÁ. Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB*. 2007;9:92–7.
 47. Park SH, Jeon WK, Kim HJ, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastro Hepatol*. 2006;21:138–43.

4. CAPITULO II

Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPAR γ 1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes

(manuscrito submetido para publicação no periódico In Vivo, sendo seu código a seqüência: 1950-D)

Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPAR γ 1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes

Cíntia dos Santos Costa^a; Francieli Rohden^a; Thais Ortiz Hammes^a; Rogério Margis^{a,b}; Josiane Woutheres Bortolotto^a; Alexandre Vontobel Padoin^c; Cláudio Cora Mottin^c; Regina Maria Guaragna^a.

^a Departamento de Bioquímica – UFRGS; ^b Centro de Biotecnologia – UFRGS; ^c Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica, Hospital São Lucas – PUCRS.

Correspondence to Regina Maria Guaragna

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo CEP 90035-003 Porto Alegre RS Brazil

e-mail: rguaragna@terra.com.br

Tel: +55 51 3308 5546 or +55 51 3308 5539 / FAX number: +55 51 3308 5540

Key words: adipocytes, SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3, resveratrol.

Abbreviated running title: Resveratrol modulation on SIRT1, FOXO1, adiponectin and PPAR γ mRNA expression in visceral adipocytes

Classification: experimental study

Date of submission: 29, October, 2009

Abstract

Background & aims: The SIRT1 enzyme is involved in adipose tissue lipolysis. FOXO1 is a protein that plays a significant role in regulating metabolism. Adiponectin is an adipokine, secreted by the adipose tissue, which has been considered to have an anti-obesity function. PPAR γ is one of the key actors in adipocytes differentiation. This study was undertaken to investigate whether resveratrol can regulate SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ in human adipose tissue. *Material and Methods:* The effects of resveratrol were analyzed in freshly isolated adipocytes prepared from visceral fat tissue samples obtained during bariatric surgery. Genes mRNA levels were determined by qRT-PCR. *Results:* Our results show that resveratrol modulates the studied genes, increasing SIRT1 ($p=0.021$), FOXO1 ($p=0.001$) and adiponectin ($p=0.025$) mRNA expression; and decreasing PPAR γ 1-3 ($p=0.003$) mRNA in human visceral adipocytes. *Conclusions:* Resveratrol, *in vitro* and at low concentration, modulates genes that are related to lipid metabolism, possibly preventing metabolic disease in human visceral adipose tissue.

1. Introduction

Obesity is related to the metabolic syndrome, and visceral adipose tissue (VAT) has been proposed to mediate this relationship.¹ The study of adipose tissue (AT), particularly adipocytes, is central to the understanding of metabolic abnormalities associated with the development of weight gain.² Adipocytes are involved in energy balance regulation by endocrine and nonendocrine mechanisms, which can be controlled by various hormones, cytokines and nutrients.² During the last couple of years several studies have used *in vitro* and *in vivo* systems to focus on various biological effects of resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene).³ Some of these results indicate that resveratrol mediated effects that are consistent with metabolic syndrome prevention, in obese mice and 3T3-L1 adipocytes.^{4,5,6}

Sirtuin 1 (SIRT1) is one of the seven mammalian homologs of Sir2 family that catalyzes NAD⁺-dependent protein deacetylation.⁷ Scientists have been proposing that SIRT1 might be a target protein to prevent and control obesity and related diseases.^{2, 8} In yeast, resveratrol significantly increases SIRT1 activity through an allosteric interaction, resulting in the increase of SIRT1 affinity for both NAD⁺ and the acetylated substrate.⁹ In mice on a high-caloric diet, resveratrol produces SIRT1-dependent effects that are consistent with improved cellular function and organism health.⁴

Forkhead/winged helix1 (FOXO1) is a transcription factor found to inhibit adipogenesis.¹⁰ Subauste and Burant found that treatment with resveratrol was able to increase FOXO1 levels in 3T3-L1 adipocytes.¹¹ Moreover, a recent study of Wang and Tong shows that FOXO1 can function as a transrepressor of PPAR γ in white AT through a direct protein-protein interaction.¹⁰

Adiponectin is an adipocyte-derived protein that has anti-obesity, antidiabetic and anti-inflammatory properties.¹² Rogers *et al.* recently found that resveratrol treatment of ethanol-fed mice markedly increased serum adiponectin concentrations with prevention of hepatic fat accumulation.¹³ SIRT1 and FOXO1 are apparently involved in transcriptional regulation of adiponectin in mice AT.¹³

The nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family has been intensively study in the past several years.¹⁴ PPAR family comprises three isotypes: PPAR α , PPAR γ and PPAR β/δ .¹⁵ The nuclear hormone receptor PPAR γ is a central regulator of adipogenesis and plays a dominant role in fat tissue development.¹⁵ As studied by Floyd *et al.*, resveratrol negatively modulates PPAR γ protein levels in 3T3-L1 adipocytes.⁵ It has been reported that SIRT1 represses PPAR γ in white AT by docking with its cofactors NCoR (nuclear receptor co-repressor).⁸ No studies have been done about resveratrol modulation on PPAR β/δ in human adipocytes.

To date, there are few reports linking dietary compounds to human adipocytes' genes expression in the literature. On the other hand, there are lots of papers citing VAT playing an important role in the metabolic syndrome.¹⁶ The great quantities of cytokines and free fatty acids released from VAT contribute to the development of obesity-related disorders such as insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), hypertension, dyslipidemia and cardiovascular disease.¹ Therefore, this article will focus of the modulation by resveratrol on SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ relative mRNA expression in isolated visceral adipocytes of morbidly obese patients. The results of this study will provide important information regarding visceral adipocytes and obesity modulation by resveratrol, as well as dietetic medical research.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of human isolated adipocytes

VAT samples were obtained from 4 morbidly obese patients (BMI \geq 40 kg/m²) who underwent open Roux-en-Y gastric bypass (RYGBP) at Centro de Obesidade Mórvida of Hospital São Lucas of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (COM/PUCRS, Brazil). Patient's weights were stable for at least one year. No subjects were taking any medications affecting adipocyte metabolism. The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n° 2007/936). All subjects were informed about the aim of the study and signed the informed consent form.

Adipocytes were isolated according to a previous described method.^{17,18} Sample of VAT (10g) was immediately immersed in Hanks' medium kept at 4 °C, and brought to the laboratory to start cell preparation within 15 minutes after tissue sampling. Adipocytes were isolated by collagenase digestion (0.5 mg/mL; type II; Sigma) at 37 °C during 55 min, in Hank's medium buffered with 20 mmol/L HEPES (Sigma) and supplemented with 200 nmol/L adenosine (Sigma) and 4% (wt/vol) fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma). Cells were filtered

through a 500- μ m mesh nylon filter and washed three times in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4% fatty acid-free bovine serum albumin.^{17, 18}

2.2. Adipocytes incubation

Isolated adipocytes were incubated at 37°C under 5% CO₂ in DMEM containing 4% fatty acid-free bovine serum albumin in a final volume of 1 mL with resveratrol (Sigma) at 1 μ M (resveratrol group; n=10) or without resveratrol (control group; n=13) for 4 hours.^{17,18} To determine the culture time and concentration, we first treated adipocytes for different times (4, 5 and 6 hours) with resveratrol at different concentrations (1, 10 and 30 μ M) and analyzed SIRT1 mRNA expression. We found no difference between the tested concentrations and times. Thus, 1 μ M at 4 hours was used to modulate isolated adipocytes to achieve resveratrol modulation with minimal cytotoxicity. Resveratrol stock solutions (1 mM) were prepared in absolute ethanol and stored at -20 °C in sterilized eppendorfs, away from light. Dilutions were held, direct in to the medium, at 37 °C for at least 1 hour before addition cell addition. The average cell number in the incubation medium varied from 50,000 to 150,000 cell/mL. At the end of the incubation periods, the infranatant was removed by aspiration and cells were immediately immersed in Trizol reagent for total RNA extraction.

2.3. Analysis of mRNA expression

Approximately 2 μ g of total RNA obtained from Trizol were added to each cDNA synthesis reaction using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Reactions were performed at 42°C for 1h using the primer T23V (5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV 3'). Quantification real-time polymerase chain reaction (qRT-PCRs) amplification was carried out using specific primer pairs designed with Primer 3 calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) and synthesized by Prodimol (São Paulo, Brazil). The sequences of the primers used are listed in Table I. Applied-Biosystem 7500

real-time cycler was used to carry out the qPCRs. Reaction settings comprised of an initial denaturation step of 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15s at 95 °C, 10s at 60 °C, 15s at 72 °C and 35s at 60 °C; samples were held for 15s at 95°C for annealing, and then heated for 1 min at 60°C with a ramp of 0.1°C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were done on a final volume of 20 µL, composed of 10 µL of each reverse transcription sample diluted 40 to 100 times, 2 µL 10 times PCR buffer, 1.2 µL of 50 mM MgCl₂, 0.1 µL of 5 mM dNTPs, 0.4 µL of 10 µM primer pairs, 4.25 µL of water, 2.0 µL of SYBR green (1:10.000 Molecular Probe), and 0.05 µL of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µL) (Invitrogen).

2.4. Data analyses

The gene expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (threshold cycle) method.¹⁹ For each well, analyzed in quadruplicate, a ΔC_T value was obtained by subtracting the beta-2-microglobulin (B2M) C_T value from the C_T value of the interest gene. The ΔC_T mean value obtained from the control group of each gene was used to calculate the $\Delta\Delta C_t$ of the respectively gene ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

2.5. Statistics

Results were analyzed with the parametric independent sample T-test. Data are shown as mean \pm standard error and they were calculated using the SPSS program (version 15.0). Differences were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

The adipocytes were isolated from obese patients with similar biochemical and anthropometric parameters (Table II). The ability of 1 µM resveratrol to modulate SIRT1,

FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression in isolated visceral adipocytes was investigated. The expression of genes mRNA in visceral adipocytes of morbidly obese subjects was assessed by qRT-PCR (Figure 1). Resveratrol significantly modulated the SIRT1 mRNA pattern in isolated visceral adipocytes ($p=0.021$). The relative amounts of SIRT1 mRNA were higher in resveratrol-treated cells (1.84 ± 0.29) compared to the control (1.10 ± 0.14). In addition, results showed that FOXO1 mRNA expression was statistically increased in adipocytes treated with 1 μ M resveratrol ($p=0.001$). Amounts of FOXO1 were higher in treated (41.9 ± 12.5) compared to control (1.07 ± 0.12) cells. Moreover, resveratrol-treated cells showed significantly increased adiponectin mRNA expression (4.24 ± 1.62) compared to control (1.17 ± 0.20) ($p=0.025$). Considering PPAR γ 1-3, resveratrol significantly down modulates the mRNA expression ($p=0.003$). Resveratrol decreased PPAR γ 1-3 quantities in treated visceral adipocyte cells (0.34 ± 0.01) compared with the control (1.08 ± 0.12). Finally, resveratrol has no effect on adipocytes PPAR β/δ mRNA expression ($p=0.312$). Amounts of PPAR β/δ mRNA were 1.13 ± 0.15 in control and 0.80 ± 0.06 in the resveratrol group.

4. Discussion

Adipose tissue accumulation, especially VAT, is closely associated with metabolic syndrome.¹⁶ Adipocytes can be controlled under the influence of various nutrients.² Resveratrol has been identified as a potent modulator of adipocytes' metabolism.⁸ Information related to resveratrol modulation on human visceral adipocytes is limited. This study aimed at verifying the ability of resveratrol to modulate SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression on human isolated visceral adipocyte cells. Although resveratrol is absorbed efficiently by humans, it has a very low systemic bioavailability.²⁰ We found that resveratrol, *in vitro* and in low concentrations (1 μ M), could be sufficient to alter genes expression in human visceral adipocytes culture, increasing SIRT1, FOXO1 and adiponectin mRNA quantities and

decreasing PPAR γ 1-3 mRNA amounts. Resveratrol did not modulate PPAR β/δ mRNA in human adipocytes, at this concentration.

SIRT1 is a NAD⁺-dependent enzyme that is involved in a variety of biological processes such as fatty acids mobilization in AT, stimulus of mitochondrial biogenesis and prevention of metabolic syndrome.^{21, 22} Recently, the authors of the present study found that decreased SIRT1 mRNA expression in VAT of morbidly obese patients could be involved with the worsening of non-alcoholic fat liver disease (*to be published*). Resveratrol is one of the natural compounds which are able to activate SIRT1.¹⁶ Shan *et al.* found that when porcine adipocyte cells are exposed to resveratrol, SIRT1 mRNA levels were increased.²¹ In agreement, another study found that resveratrol significantly increased SIRT1 mRNA expression in pig adipocytes.² The present study is the first done, to our knowledge, on resveratrol modulation on SIRT1 mRNA expression in human adipocytes. The present results of qRT-PCR show that 1 μ M resveratrol increased SIRT1 mRNA expression in human visceral adipocyte cells. Picard *et al.* have shown that resveratrol reduces blood TG content, stimulates free fatty acid release and inhibits adipocyte differentiation and fat accumulation by activation of SIRT1 in 3T3-L1 adipocytes.⁸ Moreover, Logauge *et al.* found that treatment of mice with resveratrol, through increasing SIRT1 activity, significantly increases mitochondrial activity in brown AT.⁷ Mitochondria malfunction, especially in VAT, is central to the development of metabolic syndrome.²³ We suggest that resveratrol SIRT1 stimulation can possibly act on human visceral lipid metabolism, improving adipocytes activity.

Forkhead proteins and FOXO1 in particular, play a significant role in regulating whole body energy metabolism.²⁴ FOXO1, depending on tissue localization, may have protective or negative effects on insulin resistance, diabetes and vascular function.²⁵ In adipose tissue, it seems that FOXO1 improves glucose tolerance and insulin sensitivity.²⁵ The present results show that resveratrol upregulated FOXO1 mRNA expression in mature adipocytes. Bai *et al.* found that resveratrol significantly decreased the expression of FOXO1 mRNA in pig preadipocytes.²

However, Subauste and Burant found that treatment with resveratrol was able to increase FOXO1 protein levels, decreasing the generation of reactive oxygen species (ROS) and reversing the changes associated with fatty acid overloading, in 3T3-L1 adipocytes.¹¹ ROS production has been established as an essential contributor in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance.¹¹ Furthermore, Qiao *et al.* recently suggest that SIRT1 deacetylates FOXO1, promoting its transcriptional activity.²⁶ Then, it is possible that resveratrol can be a health nutrient for human visceral adipocytes, since it induces SIRT1 and FOXO1 activation.

Adiponectin is an adipocyte-derived protein that has anti-obesity, antidiabetic and anti-inflammatory properties.¹² Rogers *et al.* found that resveratrol treatment of ethanol-fed mice markedly increased serum adiponectin concentrations with prevention of hepatic fat accumulation.¹³ The authors observed that the adiponectin upregulation was associated with increased mRNA levels of SIRT1 and FOXO1 in mice adipose tissue. VAT is known to release free fatty acid (FFA) directly into the portal circulation, a mechanism that can improve the development of NAFLD.² Another study found that resveratrol treatment increased adiponectin serum concentration, improved dyslipidemia, hyperinsulinemia and hypertension and produced anti-inflammatory effects in VAT of obese Zucker rats.⁶ Furthermore, Qiao *et al.* suggest that SIRT1 increases adiponectin transcription by activating FOXO1 in 3T3-L1 cells.²⁶ Once adiponectin is considered to be a protective cytokine, one can conclude that resveratrol, through adiponectin upregulation, possibly has a protective role in human visceral adipocytes metabolism.

The PPAR γ is a nuclear receptor that is regarded as a master regulator of adipogenesis.⁸ Wang *et al.* described that overexpression of PPAR β/δ in AT displays an upregulation of genes involved in fatty acid oxidation and energy dissipation.²⁸ A recent study published by our group suggests that a probable imbalance between PPAR β/δ (involved in fatty acid oxidation) and PPAR γ 1-3 (related to adipogenesis) expression can regulate adipocytes' development in obesity.²⁸ In the present study, results show that resveratrol significantly decreases PPAR γ 1-3,

but does not modulate PPAR β/δ mRNA expression in human visceral adipocytes. Nothing is known about resveratrol modulation of PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression in human VAT. In murine 3T3-L1 preadipocytes, resveratrol functions as a nutrition inhibitor of PPAR γ activity expression.⁵ Rayalam *et al.* found that resveratrol downregulated PPAR γ in mice 3T3-L1 cell.²⁹ Resveratrol was shown to decrease adipogenesis in pig primary preadipocytes.³⁰ Moreover, Picard *et al.* had shown that SIRT1 promotes fat mobilization by repressing PPAR γ 1-3 in mice adipocytes.⁸ Also, FOXO1 represses PPAR γ gene expression in primary adipocytes and increases insulin sensitivity.²⁵ The results of the present study suggest that resveratrol is probably an important nutrient related to the control of obesity in visceral human AT, since it can modulate SIRT1, FOXO1 and PPAR γ 1-3.

In the present study we evaluated the gene expression levels and the modulation by resveratrol but message does not necessarily equate to protein synthesis. Therefore, further studies are necessary to reveal the post-transcriptional control.

In summary, the present results show that resveratrol positively modulates SIRT1, adiponectin and FOXO1 and decreases PPAR γ 1-3 mRNA expression. It is possible that these genes' pathways are interconnecting in the same way in human visceral adipose depot, and that resveratrol has a potential therapeutic use for obesity-induced dysfunctional adipocytes. The expression pattern of the studied genes will contribute to understanding the association between resveratrol and visceral adipocytes and may provide data for using this nutrient as a future human therapy for obesity and metabolic syndrome protection. More researches is necessary for better understanding this relationship.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Dr. R. Margis is recipient of a research fellowship from the CNPq.

References

1. Marchesini G, Moscatiello S, Domizio SD et al. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 93: S74-S80, 2008
2. Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 307: 129-140, 2008
3. Harikumar KB and Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7: 1020-1035, 2008
4. Baur, JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342, 2006
5. Floyed ZE, Wang ZQ, Kilroy G, Cefalu WT. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol. *Metabolism Clinical and Experimental* 57: 32-38, 2008
6. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology* 77: 1053-1063, 2009
7. Lagouge M, Argmann C, Hines ZG, Meziane H, Lerin C, Daussin F et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109-1122, 2006
8. Picard F, Kurtev M, Chungn N, Ngarm AT, Senawong T, Oliveira RM et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ . *Nature* 429: 771-776, 2004
9. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196, 2003

10. Wang F and Tong Q. SIRT2 suppress adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma. *Mol Biol Cell* 20: 801-808, 2009
11. Subauste AR and Burant CF. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: 159-164, 2007
12. Ma H, Gomez V, Lu L, Yang X, Wu X and Xiao SY. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24: 233-237, 2009
13. Rogers CO, Ajmo JM and You M. Adiponectin and alcoholic fatty liver disease. *Life* 60: 790-797, 2008
14. Kota BP, Huang THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 51: 85-94, 2005
15. Semple RK, Chatterjee VKK, Rahilly SO. PPAR γ and human metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116: 581-589, 2006
16. Mitsuishi M, Miyashita K, Itoh H. Metabolic Syndrome. *Ex Nippon Rinsho* 67: 321-326, 2009
17. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. *J Biol Chem* 239: 375-380, 1964
18. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP et al. Insulin Acutely Regulates the Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Human Adipocytes. *Diabetes* 48: 699- 705, 1999
19. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408, 2001
20. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE and Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 32: 1377-138, 2004

21. Shan TZ, Ren Y, Wu T, Liu CH, Wang YW. Porcine sirtuin 1 gene clone, expression pattern and regulation by resveratrol. *J Anim Sci* 87: 895-904, 2009
22. Alcaín FJ, Villalba JM. Sirtuin activators. *Expert Opin Ther Pat* 19: 403-414, 2009
23. Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S. Defective Mitochondrial Biogenesis A Hallmark of the High Cardiovascular Risk in the Metabolic Syndrome? *Circulation Research* 100: 795-806, 2007
24. Gross DN, Van Den Heuvel AP, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 27: 2320-2336, 2008
25. Pillarisetti S. A Review of Sirt1 and Sirt1 Modulators in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 3: 156-164, 2008
26. Qiao L and Shao J. SIRT1 Regulates Adiponectin Gene Expression through Foxo1-C/Enhancer-binding Protein Transcriptional Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 39915–39924, 2006
27. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. *Cell* 113: 159–170, 2003
28. Bortolotto JW, Margis R, Ferreira ACB, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM. Adipose tissue distribution and quantification of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. *Obesity Surgery* 17: 934-940, 2007
29. Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA and Baile CA. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 22: 1367-1371, 2008
30. Pang WJ, Sun SD, Bai L, Yang YJ, Yang GS. Effects of resveratrol on pig primary preadipocytes proliferation, differentiation and transcription expression of Sirt1 gene. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 22: 850-855, 2006.

Titles

Table I: Oligonucleotides used in qRT-PCRs.

Table II: Anthropometrics and biologic parameters of morbidly obese patients.

Figure 1: Effects of 1 μ M resveratrol on SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression in isolated human visceral adipocytes.

Tables

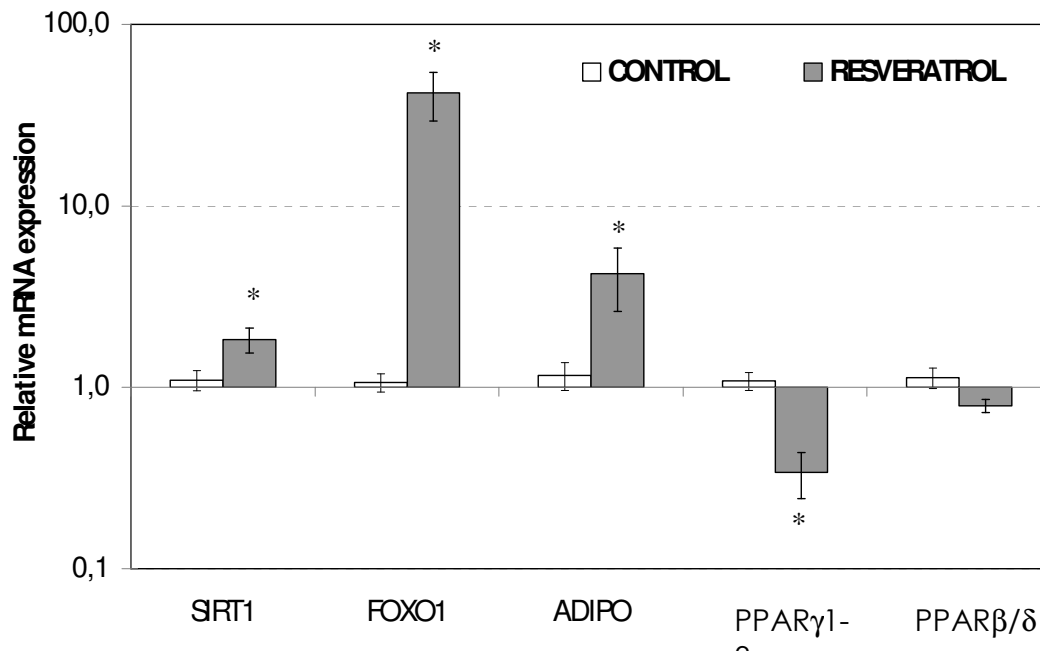
Table I: Oligonucleotides used in qRT-PCR.

B2M	Forward 5' - TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT- 3'
	Reverse 5' - TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT- 3'
SIRT1	Forward 5' - GAGTGGCAAAGGAGCAGA - 3'
	Reverse 5' - TCTGGCATGTCCCCTACTATC- 3'
Adiponectin	Forward 5' - TGGTGAGAAGGGTGAGAA- 3'
	Reverse 5' - AGATCTTGGTAAAGCGAATG- 3'
FOXO1	Forward 5' - TGGACATGCTCAGCAGACATC- 3'
	Reverse 5' - TTGGGTCAGGCGGTTCA- 3'
PPARγ1-3	Forward 5' - AGGCCATTTTCTCAAAC - 3'
	Reverse 5' - AGAAATGCTGGAGAAGTCAACA- 3'
PPAR β/δ	Forward 5' - AATGCCTACCTGAAAACTTCAAC- 3'
	Reverse 5' - GTGCACGCTGATTCCTTGT- 3'

Table II: Anthropometrics and biologic parameters of morbidly obese patients (mean \pm SE).

	Mean (\pmSE)
BMI (kg/m ²)	46.78 (\pm 2.06)
Waist (cm)	134.75 (\pm 5.08)
Hip (cm)	146.0 (\pm 4.57)
Age (years)	41.75 (\pm 2.80)
ALT (U/L)	24.50 (\pm 3.12)
AST (U/L)	30.25 (\pm 4.46)
Triglycerides (mg/dL)	151.0 (\pm 17.11)
Total cholesterol (mg/dL)	181.0 (\pm 9.61)
HDL-C (mg/dL)	45.0 (\pm 0.89)
LDL-C (mg/dL)	102.75 (\pm 10.52)
HOMA-IR ³⁸	10.75 (\pm 2.06)

Figure 1: Effects of 1 μ M resveratrol on SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression on isolated human visceral adipocytes.



The parametric independent sample T-test was used to compare the expression pattern of SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA in treated human visceral adipocytes after four hours of incubation with 1 μ M of resveratrol. Open boxes indicate the control values. The values are presented as logarithmic mean \pm standard error. Relative expressions were normalized against B2M (Δ Ct) and calibrated to the mean value of control cells in each gene ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). (*) represents a statistically significant difference between treated and control cells ($P \leq 0.05$).

5. DISCUSSÃO

A obesidade, caracterizada pelo excesso de TA, está associada a inúmeras comorbidades metabólicas, entre elas, a esteatose (Marchesini *et al*, 2008). A prevalência de NAFLD entre pessoas eutróficas é estimada entre 10 a 20 %; entre obesos, entre 60 a 74 %; e entre obesos mórbidos, é maior que 90% (Vetelainen *et al*, 2007). No entanto, o exato mecanismo molecular pelo qual o excesso de TA contribui para o acúmulo hepático de gordura, ainda não está claro (Paschos e Paletas, 2009). Especialmente o TAV parece ser o elo entre o aumento de peso e o acúmulo de lipídeo no fígado (Marchesini *et al*, 2009). A importância da gordura visceral na patogênese da NAFLD também tem sido demonstrada em modelos animais. Estudo experimental mostra que ressecção cirúrgica dos depósitos de gordura intra-abdominal reverte a esteatose em ratos obesos (Gabriely e Barzilai, 2003). Sabe-se que o TAV é lipoliticamente mais ativo do que o tecido subcutâneo e que a liberação de grandes quantidades de citocinas e ácidos graxos, oriundos do TAV diretamente na veia porta, expõe o fígado a maior concentração de ácidos graxos livres (AGL) e adipocitocinas, sendo este um dos mecanismos que contribui para a injúria hepática (Saito *et al*, 2007).

Estudos em modelo animal revelaram que alguns genes podem estar envolvidos na patogênese da esteatose, tais como SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ (Gavrilova *et al*, 2003; Rogers *et al*, 2008; Pfluger *et al*, 2008; Qin *et al*, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a expressão destes genes em tecidos adiposos humanos. Na primeira parte deste trabalho, avaliou-se a expressão relativa do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ em tecido adiposo retroperitoneal, subcutâneo e visceral de pacientes obesos grau III com diferentes níveis de esteatose.

Comparando os dois grupos estudados, nossos resultados mostram uma diminuição significativa da expressão de SIRT1 no TAV de indivíduos obesos grau III com diagnóstico de esteatose severa associada ou não à fibrose e necroinflamação do parênquima hepático. Não foi

observada diferença na expressão de SIRT1 no tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo entre os grupos estudados. Não foi observada diferença na expressão de adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ entre os grupos estudados em nenhum dos três tecidos. Considerado os dados clínicos, observamos que o valor médio de HOMA-IR foi maior em obesos esteatóticos severos. Dados de correlação revelaram, que no TAV dos indivíduos esteatóticos severos, a expressão do mRNA de SIRT1 correlacionou-se diretamente com os valores de HOMA-IR.

A perda do peso é considerada essencial ao tratamento de pacientes com esteatose hepática (Wang *et al*, 2009). É bastante reconhecido o papel da restrição calórica na redução de peso (Deng *et al*, 2007). Estudos recentes indicam a SIRT1 como um gene que mimetiza os efeitos da restrição calórica (Picard e Guarente, 2005). A idéia de estudar a ação da SIRT1 na NAFLD surgiu a partir destas observações. Deng e colaboradores avaliaram a expressão da SIRT1 por *western blot* no fígado de animais induzidos à NAFLD através de dieta (Deng *et al*, 2007). Os autores encontraram que a expressão de SIRT1 diminui na doença hepática (Deng *et al*, 2007). Foi visto também que ratos transgênicos com aumento na expressão de SIRT1 estão protegidos da NAFLD induzida por dieta (Pfluger *et al*, 2008). Yamazaki e colaboradores, usando um ativador específico para SIRT1 (SRT720), encontraram que o tratamento com SRT1720 reduziu significativamente os níveis de triglicerídeos e aminotransferases séricas, a expressão de genes lipogênicos (acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase) e AG, em ratos MSG (Yamazaki *et al*, 2009).

Revisando a literatura podemos afirmar que, até o momento, este é o primeiro estudo que quantifica e compara a expressão relativa do transcrito reverso de SIRT1 em diferentes TA's entre pacientes obesos com diferentes níveis de esteatose, apesar da estreita relação entre TAV e acúmulo hepático de lipídeos. Nossos resultados indicam que a expressão relativa do mRNA de SIRT1 foi vinte vezes menor no TAV de indivíduos obesos com esteatose severa, comparada a obesos com esteatose simples ou moderada, sugerindo possível efeito protetor da SIRT1 no TAV contra NAFLD de pacientes obesos grau III.

A seguir citamos duas possíveis rotas para a ação benéfica da SIRT1 contra NAFLD, a partir de dados de outros estudos:

1. Papel regulador da SIRT1 na disfunção mitocondrial;

Estudos revelam que a enzima SIRT1 está envolvida no estímulo à biogênese mitocondrial (Westphal *et al*, 2007). Publicações recentes ressaltam o papel da disfunção mitocondrial na NAFLD (Pfluger *et al*, 2008; Wei *et al*, 2008). Maassen e colaboradores sugeriram a hipótese de que uma das funções das mitocôndrias no TA é prevenir a liberação de ácidos graxos na circulação, o que poderia atenuar o acúmulo de triglicerídeos no fígado (Maassen *et al*, 2008). Portanto, o baixo padrão de expressão de SIRT1 pode estimular a disfunção mitocondrial, favorecendo a evolução da NAFLD.

2. Papel da SIRT1 nas rotas de síntese e degradação de lipídeos;

Picard e colaboradores descreveram o papel da SIRT1 na mobilização de ácidos graxos do TA (Picard *et al*, 2004). Devido às conclusões de Picard, muitos estudos têm investigado a ação da SIRT1 no metabolismo energético, especialmente no metabolismo lipídico (Picard *et al*, 2004; Picard e Guarente, 2005). Estudo recente realizado em ratos MSG apontou que tratamento com SRT1720 reduziu o acúmulo hepático de lipídeos devido à redução significativa da expressão de acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (FAS) (Yamazaki *et al*, 2009). Feige e colaboradores recentemente observaram que camundongos tratados com SRT1720, apresentam aumento da ação da enzima proteína quinase ativada por AMP (AMPK), no tecido adiposo marrom, estimulando o metabolismo oxidativo (Feige *et al*, 2008). Além disso, estudos indicam que a ativação da AMPK reduz a ação da ACC (Qureschi e Abrams, 2007; Wang *et al*, 2009), diminuindo a concentração de malonil-CoA, provocando um aumento na ação da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) e, conseqüentemente, a oxidação de lipídios; evitando o acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático (Wang *et al*, 2009).

Assim, a baixa expressão do mRNA de SIRT1 no TAV de pacientes obesos com esteatose grave, encontrada em nosso trabalho, poderia prejudicar a atividade mitocondrial, diminuir a oxidação de AG e conseqüentemente aumentar a liberação de AGL na circulação portal. Logo, a terapêutica baseada na ação da SIRT1 no TAV, representa uma área promissora para NAFLD, devendo ser investigada de forma mais aprofundada.

O papel da adiponectina como gene protetor da NAFLD tem sido cada vez mais reconhecido (Wang *et al*, 2009). No entanto, apesar dos avanços das pesquisas realizadas nos últimos anos, as vias moleculares e os mecanismos celulares que respaldam a ação hepatoprotetora da adiponectina permanecem pouco caracterizados (Wang *et al*, 2009). Em humanos, a baixa concentração de adiponectina sérica, condição que caracteriza a obesidade, representa fator de risco independente para a NAFLD (Kamada *et al*, 2008; Wang *et al*, 2009). Apenas um estudo analisa a expressão relativa do mRNA deste gene em tecido adiposo intra-abdominal de pacientes obesos com diferentes níveis de esteatose (Baranova *et al*, 2006). No estudo citado, Baranova e colaboradores sugerem que o baixo nível de expressão de adiponectina pode predispor ao desenvolvimento de NASH (Baranova *et al*, 2006). No entanto, os dados encontrados neste trabalho mostram que não houve diferença estatística na expressão de adiponectina entre pacientes obesos mórbidos com diferentes níveis de esteatose.

Já foi descrito o papel do fator de transcrição FOXO1 na NAFLD em modelos experimentais (Valenti *et al*, 2008). Considerando a expressão de FOXO1 em tecido adiposo de obesos com diferentes níveis de esteatose, podemos afirmar que nada ainda foi publicado. Em nosso trabalho, a expressão relativa do mRNA de FOXO1 não apresentou diferenças significativas entre obesos com diferentes níveis de esteatose nos três tecidos estudados.

Poucas informações estão disponíveis a respeito da expressão de PPARs em relação à NAFLD. Estudo experimental observa em ratos transgênicos com ativação de PPAR β/δ ,

apresentam resistência à obesidade e à esteatose (Wang *et al*, 2003). Nada se sabe sobre a expressão de PPARs em tecidos adiposo humano relacionado à progressão da NAFLD. Os resultados deste estudo não apontam diferença na expressão de PPAR γ e PPAR β/δ entre os grupos estudados. Um estudo publicado recentemente por nosso grupo sugere que a relação entre PPAR γ e PPAR β/δ possa estar relacionada à obesidade (Bortolotto *et al*, 2007). Assim, é possível que a expressão de PPARs no TA esteja associada à obesidade apenas, e não à severidade da NAFLD. Entretanto, mais estudos são necessários para validar esta observação.

A resistência à insulina também é considerado fator de risco para o desenvolvimento de formas mais graves de NAFLD (Park *et al*, 2006; Calvert *et al*, 2007). No entanto, os mecanismos moleculares que explicam a relação entre acúmulo hepático de lipídios e resistência à insulina ainda não estão claros (Calvert *et al*, 2007). Em nosso estudo, observamos que o valor médio de HOMA-IR foi menor em obesos com esteatose simples ou moderada. Park e colaboradores estudando a prevalência e os fatores de risco para NAFLD entre coreanos com idade adulta, encontrou que NAFLD está estatisticamente associado a elevado valor de HOMA-IR (Park *et al*, 2006).

Dentre as limitações da primeira parte do presente estudo, ressalta-se que a análise dos transcritos dos genes estudados deve ser complementada pela quantificação da proteína sintetizada.

Considerando o papel hepatoprotetor de SIRT1 surgem dois questionamentos: (1) é possível modular exogenamente a expressão deste gene; (2) a alimentação seria capaz de modular a expressão dos genes estudados. Evidências sugerem que resveratrol é um nutriente com potencial efeito protetor contra doenças metabólicas (Cucciolla *et al*, 2007). Além disso, resveratrol parece estar envolvido na modulação dos níveis de SIRT1, adiponectina, FOXO1 e PPAR γ (Bai *et al*, 2008; Rogers *et al*, 2008; Rayalam *et al*, 2008; Wang e Tong, 2009). Assim,

na segunda parte deste trabalho, avaliou-se a modulação via resveratrol da expressão de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ em adipócitos isolados do tecido visceral.

O estudo do TA, particularmente dos adipócitos, é central para o entendimento das anormalidades metabólicas associadas com o ganho de peso (Bai *et al*, 2008). Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional (Fonseca-Alaniz *et al*, 2006). Por esta característica estas células são entendidas como unidades funcionais do tecido adiposo. No entanto, a biossíntese e o acúmulo de triacilglicerol pode não ser exclusiva dos adipócitos. Este processo foi descrito em outros tecidos, onde o acúmulo de ácidos graxos é considerado anormal, provocando o que se conhece como lipotoxicidade (Fonseca-Alaniz *et al*, 2007). Os adipócitos estão envolvidos na regulação do balanço metabólico por mecanismos endócrinos e não- endócrinos que podem ser controlados, sob a influência de diversos hormônios, citocinas e nutrientes, tal como o resveratrol (Bai *et al*, 2008).

Durante os últimos anos, várias pesquisas têm analisado os efeitos biológicos do resveratrol (Harikumar e Aggarwal, 2008; Floyed *et al*, 2008). Alguns destes estudos, realizados em ratos obesos e células 3T3-L1, mostram potenciais efeitos positivos deste nutriente na prevenção da síndrome metabólica e esteatose (Baur *et al*, 2006; Rogers *et al*, 2008; Floyed *et al*, 2008). Revisando a literatura, foi possível constatar que não existem dados referentes à modulação por resveratrol na expressão relativa do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ em adipócitos isolados do TAV de humanos. Os resultados encontrados na segunda parte deste trabalho indicam que resveratrol, *in vitro* e em baixa concentração (1 μ M), é capaz de aumentar a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectin e FOXO1 e inibir a expressão do mRNA de PPAR γ 1-3 em adipócitos isolados do tecido visceral de obesos grau III. No entanto, resveratrol não modulou a expressão do mRNA de PPAR β/δ , nesta concentração e modelo celular estudados.

SIRT1 está envolvida em uma variedade de processos biológicos como a mobilização de ácidos graxos do TA, o estímulo à biogênese mitocondrial e a prevenção da síndrome metabólica (Shan *et al*, 2009; Alcaín e Villalba, 2009). Além disso, nossos resultados quanto à expressão basal de SIRT1 em obesos com diferentes graus de esteatose sugerem possível efeito hepatoprotetor da SIRT1 no TAV. Como citado anteriormente, não existem na literatura dados sobre a modulação por resveratrol na expressão do mRNA de SIRT1 em tecido adiposo de humanos. Contudo, dois estudos encontraram que a expressão do mRNA de SIRT1 aumentou significativamente após exposição de adipócitos de porcos à resveratrol (Shan *et al*, 2009; Bai *et al*, 2008). Trabalhos recentes mostram que resveratrol, através de ativação da enzima SIRT1, reduz o teor de triglicérides no sangue, inibe a diferenciação dos adipócitos (Picard *et al*, 2004) e aumenta a atividade mitocondrial em células 3T3-L1 (Lagouge *et al*, 2006). Nossos resultados indicam que resveratrol possui efeito modulador positivo na expressão do mRNA de SIRT1 em adipócitos de TAV de humanos. Dessa forma, o aumento na expressão do mRNA de SIRT1, após exposição ao resveratrol, poderia ser considerado um fator protetor para os adipócitos do TAV, em humanos.

A adiponectina é uma adipocitocina sensibilizadora de insulina (Wang *et al*, 2009). Seus níveis se correlacionam negativamente com obesidade, níveis de triglicérides e LDL-c e, positivamente, com HDL-c (Yamamoto *et al*, 2004). Estudo realizado em camundongos Zuckers obesos indica que tratamento com resveratrol aumentou a concentração sérica de adiponectina, melhorando os níveis de dislipidemia, hiperinsulinemia e hipertensão arterial e estimulando efeitos anti-inflamatórios no TAV (Rivera *et al*, 2009). Rogers e colaboradores encontraram que o tratamento com resveratrol aumentou significativamente as concentrações de adiponectina sérica e preveniu a deposição de gordura hepática, em camundongos (Rogers *et al*, 2008). Assim, uma vez que a adiponectina tem sido entendida como uma adipocitocina com múltiplos efeitos benéficos sobre as complicações clínicas da obesidade (Wang *et al*, 2009), pode-se concluir que

resveratrol, através de ativação da adiponectina, apresenta um provável efeito protetor nos adipócitos do TAV, em humanos.

Considerando o fator de transcrição FOXO1, foi descrito que o aumento de sua expressão em tecido adiposo está associado à diminuição da diferenciação de adipócitos (Karim *et al*, 2006) e a promoção da sensibilização à ação da insulina (Pillarsetti, 2008). Quanto à modulação da expressão de FOXO1 por resveratrol, nada ainda foi descrito em humanos. Trabalhos utilizando outros modelos já foram publicados, no entanto, suas conclusões são opostas. Bai e colaboradores observaram que resveratrol diminuiu significativamente a expressão de mRNA de FOXO1 em pré-adipócitos de suínos (Bai *et al*, 2008), ao passo que Subauste e Burant observaram que o tratamento com resveratrol foi capaz de aumentar os níveis de FOXO1, em células 3T3-L1 (Subauste e Burant, 2007). No último estudo citado, o aumento da expressão de FOXO1 foi acompanhado de diminuição na geração de espécies reativas de oxigênio e das mudanças associadas com o acúmulo de ácidos graxos na célula (Subauste e Burant, 2007). A produção de espécies reativas de oxigênio contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina e formas mais graves de NAFLD em indivíduos obesos (Subauste e Burant, 2007; Marchesini *et al*, 2009). Nossos resultados mostram que a expressão relativa de mRNA de FOXO1 em adipócitos isolados do TAV de humanos sofreu modulação positiva após exposição ao resveratrol, sugerindo novamente, efeito positivo deste fitoesterol em adipócitos de humanos.

Revisando a literatura, podemos descrever estudos experimentais que analisam e relacionam a expressão de SIRT1, adiponectina e FOXO1 (Rogers *et al*, 2008; Qiao e Shao 2006). Qiao e Shao recentemente sugeriram que SIRT1 deacetila FOXO1, promovendo a sua ativação e estimulando a transcrição de adiponectina, em células 3T3-L1 (Qiao e Shao, 2006). Considerando a ação do resveratrol, Rogers e colaboradores encontraram que tratamento com resveratrol aumentou a concentração sérica de adiponectina, protegendo camundongos contra acúmulo hepático de lipídeos. Os autores observaram ainda que o aumento na expressão sérica de adiponectina estava associado a um aumento na expressão do mRNA de SIRT1 e FOXO1 em

tecido adiposo dos animais. Nosso trabalho mostrou que a expressão de SIRT, FOXO1 e adiponectina aumentou após incubação com 1 μ M de resveratrol, em adipócitos isolados do TAV de humanos.

Além da expressão de SIRT1, FOXO1 e adiponectina, analisamos a modulação do resveratrol na expressão de PPAR γ e PPAR β/δ . Nada se sabe sobre a modulação do resveratrol na expressão de PPAR γ 1-3 e PPAR β/δ em adipócitos humanos. No entanto, dois estudos mostram a ação inibidora do resveratrol na expressão de PPAR γ , em células 3T3-L1 (Floyed *et al*, 2005; Rayalam *et al*, 2008). Estudos utilizando modelo experimental sugerem que pode existir associação entre a expressão do mRNA de SIRT1, FOXO1 e PPAR γ . Picard e colaboradores mostraram que SIRT1 promove a mobilização de gordura, reprimindo PPAR γ em células 3T3-L1 (Picard *et al*, 2004). Outro estudo observa que FOXO1 reprime a expressão de PPAR γ em adipócitos, aumentando a sensibilidade à insulina (Pillarsetti, 2008). Nossos resultados mostram que resveratrol modula negativamente a expressão do mRNA de PPAR γ e não influencia a expressão de PPAR β/δ . Assim, podemos sugerir ação do resveratrol como potencial nutriente relacionado ao controle da obesidade visceral de humanos, uma vez que modula SIRT1, FOXO1 e PPAR γ 1-3 em adipócitos isolados deste tecido.

Assim, observando os resultados da segunda parte deste trabalho, pode-se concluir que resveratrol é capaz de modular a expressão de SIRT1, adiponectina, FOXO1 e PPAR γ 1-3 em adipócitos isolados do TAV de humanos. Ainda, é possível sugerir que a ação do resveratrol em adipócitos do tecido visceral seja benéfica à saúde humana, uma vez que: (1) induz a ativação SIRT1, adiponectina e FOXO1 e (2) iniba a ação do PPAR γ 1-3.

De uma maneira geral, o padrão de expressão do mRNA de SIRT1 em obesos com diferentes níveis de esteatose sugere o papel hepatoprotetor destes genes no TAV, em humanos. Os achados quanto à modulação exercida por resveratrol nos adipócitos isolados do TAV de

humanos evidenciam o efeito estimulador na expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina e FOXO1 e inibidor na expressão do mRNA de PPAR γ 1-3, bem como sugerem um possível efeito protetor deste nutriente nas células estudadas. Enfim, conclui-se que a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina, FOXO1 e PPAR γ 1-3 e a modulação exercida por resveratrol sob a expressão destes genes, possam ser importantes alvos de estudo em virtude de suas relações com a gênese da obesidade e da esteatose.

6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados deste estudo, pode-se concluir:

- A expressão do mRNA de SIRT1 no TAV está diminuída em pacientes esteatóticos severos, comparada à pacientes obesos grau III esteatóticos simples;
- A expressão do mRNA de FOXO1, PPAR γ 1-3 e PPAR β/δ não é diferente em pacientes obesos grau III com diferentes níveis de esteatose;
- o valor de HOMA-IR é maior em pacientes esteatóticos severos;
- a expressão de SIRT1 correlaciona positivamente com o valor de HOMA-IR ;
- Resveratrol é capaz de modular positivamente a expressão do mRNA de SIRT1, adiponectina e FOXO1 em adipócitos isolados do TAV de pacientes obesos grau III;
- Resveratrol é capaz de modular negativamente a expressão do mRNA de PPAR γ 1-3 em adipócitos isolados do TAV pacientes obesos grau III;
- Resveratrol não é capaz de modular a expressão do mRNA de PPAR β/δ em adipócitos isolados do TAV pacientes obesos grau III, em um tempo de cultura de 4 horas.

7. PERSPECTIVAS

Considerando o papel da PGC1 α (Westphal *et al*, 2007) e NFk- β na expressão da SIRT1 (Pfluger *et al*, 2008; Wang *et al*, 2009) pretende-se, como perspectiva deste trabalho, avaliar a expressão de mRNA de PGC1 α , NFk- β , UCP2 e C/EBP α nas mesmas amostras de tecido adiposo retroperitoneal, subcutâneo e visceral de indivíduos obesos grau III com diferentes níveis de esteatose. Ainda, pretendemos quantificar e analisar a expressão protéica de SIRT1, adiponectina, FOXO1, PPAR γ e PPAR β/δ e dos genes citados acima, em tecido adiposo retroperitoneal, subcutâneo e visceral de indivíduos obesos grau III com diferentes níveis de esteatose hepática. Além disso, pretendemos analisar a modulação do resveratrol sob a expressão do mRNA de PGC1 α , NFk- β , UCP2 e C/EBP α em adipócitos isolados do TAV de humanos, além da análise da expressão protéica dos genes estudados neste trabalho e dos citados acima em adipócitos isolados do TAV de humanos, após modulação por resveratrol.

8. REFERÊNCIAS

Alcaín FJ e Villalba JM. Sirtuin activators. **Expert Opin Ther Pat**; 19: 403-14, 2009

Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, Quon MJ e Karnieli E. FOXO1 represses peroxisome proliferator activated receptor γ 1 and γ 2 gene promoters in primary adipocytes. **J Biol Chem**; 281: 19881–19891, 2006

Backesjo CM, Li Y, Lindgren U e Haldosén LA. Activation of Sirt1 Decreases Adipocyte Formation During Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **J Bone Miner Res**; 21: 993-1002, 2006

Bai L, Pang WJ, Yang YJ e Yang GS. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. **Mol Cell Biochem**; 307: 129-140, 2008

Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V e Younossi ZM. Gene Expression of Leptin, Resistin, and Adiponectin in the White Adipose Tissue of Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. **Obes Surgery**; 16, 1118-1125, 2006

Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi A, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW e Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. **Expert Rev Cardio Ther**; 6: 343-68, 2008

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jmeson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwin D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta E, Couteur DL, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, Cabo R e Sinclair D. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**; 444: 337-342, 2006

- Bertagnolli SMM, Rossato SB, Silva VL, Cervo T, Sautter CK, Hecktheuer LH e Penna NG. Influência da maceração carbônica e da irradiação ultravioleta nos níveis de trans-resveratrol em vinhos de uva *cabernet sauvignon*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; 43: 71- 77, 2007
- Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W e Guarente L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. **Aging cell**; 6: 759 – 767, 2007
- Bortolotto JW, Margis R, Ferreira ACB, Padoin AV, Mottin CC e Guaragna RM. Adipose tissue distribution and quantification of PPAR β/δ and PPAR γ 1-3 mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. **Obesity Surgery**; 17: 934-940, 2007
- Burt AD, Mutton A e Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. **Semin Diagn Pathol**; 15: 246-258, 1998
- Calvert VS, Collantes R, Elariny H, Afendy A, Baranova A, Mendoza M, Goodman Z, Liotta LA, Petricoin EF e Younossi ZM. A Systems Biology Approach to the Pathogenesis of Obesity-related Nonalcoholic Fatty Liver Disease Using Reverse Phase Protein Microarrays for Multiplexed Cell Signaling Analysis. **Hepatology**; 46: 166-172, 2007
- Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V e Ragione FD. Resveratrol: From Basic Science to the Clinic. **Cell Cycle**; 6: 2495-2510, 2007
- Deng XQ, Chen LL e Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. **Liver International**; 27: 708-715, 2007

- Diep QN, Touyz RM e Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogenactivated protein kinase. **Hypertension** 36: 851–5, 2000.
- Diez JJ e Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **European Journal of Endocrinology**; 148: 293–300, 2003
- Fan JG e Farrell GC. VAT fat is bad for the liver, SAT fat is not! **Journal of Gastroenterology and Hepatology**; 23: 823–832, 2008
- Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Mataki C, Elliott PJ e Auwerx J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. **Cell Metab**; 8:347-58, 2008
- Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**; 19:483–499, 2005
- Floyed ZE, Wang ZQ, Kilroy G e Cefalu WT. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol. **Metabolism Clinical and Experimental**; 57: 32-38, 2008
- Fonseca-Alaniz MH., Takada J, Alonso-Vale MIC e Lima FB. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab**; 50: 216-229, 2006
- Fonseca-Alaniz MH., Takada J, Alonso-Vale MIC e Lima FB. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**; 83: 192-203, 2007
- Friedman JR e Kaestner KH The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. **Cell Mol Life Sci**; 63: 2317–2328, 2006

- Gabriely I e Barzilai N. Surgical removal of visceral adipose tissue effects on insulin action. **Curr Diab Rep**; 3: 201-206, 2003
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicoli CJ, Vinson C, Gonzalez FJ e Reitman ML. Liver Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Contributes to Hepatic Steatosis, Triglyceride Clearance, and Regulation of Body Fat Mass. **The Journal of Biochemical Chemistry**; 278: 34258-34276, 2003
- Gray SG e Ekstrom TJ. The Human Histone Deacetylase Family. **Experimental Cell Research**; 262: 75–83, 2001
- Grimaldi, PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. **Prog Lipid Res**; 40: 269-281, 2001.
- Grinius L, Kessler C, Schroeder J e Handwerger S. Forkhead transcription factor FOXO1A is critical for induction of human decidualization. **Journal of Endocrinology**; 189: 179–187, 2006
- Guri AJ, Hontecillas R e Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptors: Bridging metabolic syndrome with molecular nutrition. **Clin Nutrition**; 25: 871-885, 2006.
- Harikumar KB e Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic disease. **Cell cycle**; 7: 1020 – 1035, 2008
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Washida N, Tokuyama K, Hayashi K e Itoh H. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; 372: 51–56, 2008
- Hermsdorff HHM e Monteiro JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**; 6: 803-811, 2004

- Huang H e Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. **Journal of Cell Science**; 120: 2479-87, 2007
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro; 2004.
- Jun DW, Han JH, Kim SH, Jang EC, Kim NI, Lee JS, Song MH, Kim SH, Jô YJ e Park YS. Association between low thigh fat and non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatology**; 23: 888–893, 2008
- Kamada Y, Takehara T e Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. **J Gastroenterol**; 43: 811-822, 2008
- Karim MA, Craig RL, Wang X, Hale TC e Elbein SC. Analysis of *FOXO1A* as a candidate gene for type 2 diabetes. **Molecular Genetics and Metabolism**; 88: 171–177, 2006
- Kaser S, Moschen A and Cayon A. Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR e Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**; 54: 117-121, 2005
- Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, Wright CVE, White MF, Arden KC e Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. **The Journal of Clinical Investigation**; 110: 1839–1847, 2002
- Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. **Journal of Clinical Investigation**; 113: 1530 -15 32, 2004
- Kota BP, Huang THW e Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**; 51: 85 – 94, 2005

- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P e Auwerx J. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**; 127: 1109-1122, 2006
- Lefterova MI e Lazer MA New developments in adipogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**; 20: 107-114, 2009
- Maassen JA, Romijn JA e Heine RJ. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: do adipocytes consume sufficient amounts of oxygen to oxidize fatty acids? **Diabetologia**; 51: 907-908, 2008
- Ma H, Gomez V, Lu L, Yang X, Wu X e Xiao SY. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatology**; 24: 233-237, 2009
- Marchesini G, Moscatiello S, Domizio SD e Forlani G. Obesity-associated liver disease. **J Clin Endocrinol Metab**; 93:74-80, 2009
- Meirhaeghe A. e Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. **Mol Genet and Metab**; 83: 93-102, 2004
- Mitsuishi M, Miyashita K e Itoh H. Metabolic Syndrome. **Nippon Rinsho**; 67: 321-326, 2009
- Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, Arden KC e Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. **Developmental Cell**; 4: 119–129, 2003
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and

Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.

Circulation 106:3143–421, 2002

Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC e Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated breceptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. **PNAS**; 98: 5306-5311, 2001

Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA e Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. **European Journal of Endocrinology**; 152 113–118, 2005

Pang WJ, Sun SD, Bai L, Yang YJ e Yang GS. Effects of resveratrol on pig primary preadipocytes proliferation, differentiation and transcription expression of Sirt1 gene. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**; 22: 850-855, 2006

Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho OK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK e Kim BI. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**; 21: 138-143, 2006

Paschos P e Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. **Hippokratia**; 13: 9-19, 2009

Peterlin BL, Alexander G, Tabby D e Reichenberger E. Oligomerization state-dependent elevations of adiponectin in chronic daily headache. **Neurology**; 70: 1905-1911, 2008

Picard F e Guarente L. Molecular links between aging and adipose tissue. **International Journal of Obesity**; 29:36-39, 2005

- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Oliveira RM, Leid M, McBurney MW e Guarent L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ . **Nature**; 429: 771-776, 2004
- Pillariseti S. A Review of Sirt1 and Sirt1 Modulators in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**; 3: 156-164, 2008
- Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M e Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **PNAS**; 105: 9793-9798, 2008
- Qiao L e Shao J. SIRT1 Regulates Adiponectin Gene Expression through Foxo1-C/Enhancer-binding Protein Transcriptional Complex. **The Journal of Biological Chemistry**; 281: 39915–39924, 2006
- Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y e Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. **Hepatology**; 48: 432-441, 2008
- Qureshi K e Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**; 14: 3540-3553, 2007
- Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA e Baile CA. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Phytother Res**; 22: 1367–1371, 2008
- Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG e Zanella MT. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. **Arq Bras Endocrinol Metab**; 50: 230-238, 2006
- Richards AA, Stephens T, Charlton HK, Jones A, Macdonald GA, Prins JB e Whitehead JP. Adiponectin Multimerization Is Dependent on Conserved Lysines in the Collagenous Domain:

Evidence for Regulation of Multimerization by Alterations in Posttranslational Modifications.

Molecular Endocrinology; 20: 1673–1687, 2006

Rivera L, Moron R, Zarzuelo A e Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. **Biochemical Pharmacology**; 77: 1053-1063, 2009

Rogers CO, Ajmo JM e You M. Adiponectin and alcoholic fatty liver disease. **Life**; 60:790-797, 2008

Saito T, Misawa K e Kawata S. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. **International Medicine**; 46:101-103, 2007

Sasaki T, Maier B, Koclega KD, Chruszcz M, Gluba W, Stukenberg PT, Minor W e Scrbale. Phosphorylation Regulates SIRT1 Function. **Plos one**; 3: 1 – 13, 2008

Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL e Boeke JD. The Biochemistry of Sirtuins. **Annu. Rev. Biochem**; 75:435–65, 2006

Sautter CK, Denardin S, Alves AO, Mallmann CA, Penna NG e Hecktheuer LH. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**; 25: 437-442, 2005

Shan TZ, Ren Y, Wu T, Liu CH e Wang YW. Porcine sirtuin 1 gene clone, expression pattern, and regulation by resveratrol. **J Anim Sci**; 87(3):895-904, 2009

Sharma AM e Staels B. Review: Peroxisome Proliferator-activated receptor γ and adipose tissue – understanding obesity-related change in regulation of lipid and glucose metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; 92: 386 – 395, 2007

Shifflet A e Wu GY. Non-alcoholic steatohepatitis: an overview. **J Formos Med Assoc**; 108: 4-12, 2009

- Sowemimo AO, Yood SM, Courtney J, Moore J, Huang M, Ross R, McMillian U, Ojo P e Reinhold. Natural history of morbid obesity without surgical intervention. **Surgery for Obesity and Related Diseases**; 3: 73-77, 2007
- Spiegelman BM e Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**; 104: 531 – 543, 2001
- Spiegelman BM. PPAR γ adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Perspectives in Diabetes**; 47: 507-14, 1998
- Subauste AR e Burant CF. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 293: 159-164, 2007
- Tavares V, Hirata MH e Hirata RCD. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab**; 51: 526-533, 2007
- Tchernof A, Belanger C, Morisset AS, Richard C, Mailloux J, Laberge P e Dupont P. Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women. **Diabetes**; 55: 1353-1360, 2006
- Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, Lattuada E, Roviario G e Fargion S. Increased expression and activity of transcriptional factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. **Diabetes**; 57: 1355-1362, 2008
- Vetelainen R, Vliet A, Gouma DJ e Gulik TM. Steatosis as a Risk Factor in Liver Surgery. **Ann Surg**; 245: 20–30, 2007
- Yamamoto Y, Hirose H, Saito H, Nishikai K e Saruta T. Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: two-year follow-up study in Japanese population. **J Clin Endocrinol Metab**; 89: 87-90, 2004

- Yamazaki Y, Usui I, Kanatani Y, Matsuya Y, Tsuneyama K, Fujisaka S, Bukhari A, Suzuki H, Senda S, Imanishi S, Hirata K, Ishiki M, Hayashi R, Urakaze M, Nemoto H, Kobayashi M e Tobe K. Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2009. *In press*
- Yang T, Fu M, Pestell R e Sauve AA. Sirt1 and endocrine signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**; 17:186 – 191, 2006
- Yang, JY, Della-Fera MA, Rayalama S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ e Baile CA. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. **Life Sciences**; 82: 1032-1039, 2008
- Wahli W, Braissant O e Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: *transcriptional* regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. **Chem Biol** ; 2: 261–6, 1995
- Wang F e Tong Q. SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma. **Mol Biol Cell**; 20: 801-808, 2009
- Wang YX, Lee CH e, Timp S. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell** 113: 159-170, 2003
- Wang Y, Zhou M, Lam KSL e Xu A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. **Arq Bras Endocrinol Metab**; 53: 201-212, 2009
- Wei Y, Rector RS, Thyfault JP e Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **World J Gastroenterol**; 14: 193-199, 2008
- Westphal CH, Dipp MA e Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in disease of aging? **Trends in Biochemical Sciences**; 32: 555 – 560, 2007

World Health Organization. Obesity and overweight. [Matéria publicada em Setembro de 2006].

Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em: 7 de novembro de 2008

World Health Organization. Obesity: prevention and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on Obesity. Geneva, 1998

ANEXO 1 – LISTA DE FIGURAS**INTRODUÇÃO**

Figura 1. Visão esquemática do processo de diferenciação do adipócitos	12
Figura 2. Estrutura em 3D da SIRT1 humana	15
Figura 3. Estrutura da adiponectina humana	16
Figura 4. Estrutura do resveratrol	20

CAPITULO 2

Figura 1. Effects of 1 μ M resveratrol on SIRT1, FOXO1, adiponectin, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA expression on isolated human visceral adipocytes	50
---	----

ANEXO 2 – LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 1**

Table 1. Oligonucleotides used in qRT-PCR	29
Table 2. Anthropometric and biological parameters of morbidly obese patients with HS and SHS	30
Table 3. Comparative analyses of SIRT1, adiponectin, FOXO1, PPAR γ 1-3 and PPAR β/δ mRNA levels in VAT, SAT and RAT of two groups of obese patients.....	30

CAPÍTULO 2

Table 1. Oligonucleotides used in qRT-PCR	48
Table 2. Anthropometrics and biological parameters of morbidly obese patients (mean \pm SE) ..	49

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O projeto de pesquisa intitulado: “**Análise e quantificação da expressão do mRNA de SIRT1 em tecido adiposo e sua modulação por resveratrol e por diferentes ácidos graxos em adipócitos isolados**” será realizado pela UFRGS, com pacientes obesos mórbidos do Centro de Obesidade Mórbida do Hospital São Lucas da PUC. O pesquisador responsável é: Cíntia dos Santos Costa. Este trabalho é orientado pela Proessora Dra. Regina Maria Viera da Costa Guaragna, do departamento de Bioquímica da UFRGS.

Esta pesquisa tem por objetivos gerais: (1) Analisar e quantificar a expressão de mRNA de SIRT1 em tecido adiposo visceral, subcutâneo e retroperitoneal em obesos grau III e não-obesos; (2) analisar a ação do resveratrol e diferentes ácidos graxos na expressão do mRNA de SIRT1 em adipócitos isolados de tecido visceral de obesos grau III. Também tem por objetivos específicos: (1) relacionar a expressão do mRNA SIRT1 entre os tecidos adiposos analisados e comparar obesos grau III e não obesos; (2) correlacionar a expressão do mRNA SIRT1 com adiponectina, FOXO1, PPPAR γ 1-3 e PPAR β/δ entre os tecidos adiposos analisados e comparar obesos grau III e não obesos; (3) analisar e quantificar a expressão de mRNA de SIRT1 em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos grau III; (4) determinar a concentração do resveratrol e tempo de incubação para a modulação da SIRT1 em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos grau III; (5) determinar a concentração do diferentes ácidos graxos e tempo de incubação para a modulação da SIRT1 em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos grau III. Este trabalho também tem objetivo acadêmico, pois se trata da tese de mestrado da aluna Cíntia dos Santos Costa.

Os participantes do estudo aderirão ao mesmo voluntariamente, podendo a sua participação ser interrompida em qualquer etapa, sem nenhum prejuízo ou punição. A qualquer momento, os participantes poderão solicitar informações sobre os procedimentos relacionados a este estudo. Todos os cuidados serão tomados para garantir o sigilo e a confidencialidade das informações, preservando a identidade dos participantes. Haverá divulgação dos resultados da pesquisa. **Desde já, agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais, através dos telefones 8132-0852 e 3308-5545.**

Assinatura do responsável: _____

Regina Maria Viera da Costa Guaragna

Coordenadora do Projeto. Depto Bioquímica UFRGS

rguaragna@terra.com.br

Telefone: 3332-2129/9984-4286

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

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

_____, _____ de _____ de 2005.

Assinatura do voluntário