

UFRGS-UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Efeitos de dieta hiperlipídica com gordura saturada e monoinsaturada
em parâmetros bioquímicos de ratos wistar.**

Mestrando: Ana Lúcia Hoefel

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Vannmacher

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2011.

*“Escolhe um trabalho de que gostes, e
não terás que trabalhar nem um dia na
tua vida.”*

Confúcio

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Hélio e Guida (mãe de coração) e a Eloá (*in memorian*) pelo amor, carinho e dedicação, com eles aprendi os maiores valores que o ser humano pode ter: honestidade e amor ao próximo.

Ao meu irmão, Beto, pelo apoio e pelo amor.

Ao professor Romeu Ernesto Riegel, meu primeiro professor de bioquímica, que foi quem me fez amar esta ciência.

Ao professor Juvenal Soares Dias da Costa, quem primeiro acreditou em minha capacidade.

À minha amiga-irmã de coração Ana Paula Tibola, e as irmãzinhas Simone e Patrícia, a tia Helena e o tio Nelson, sem vocês, não teria chegado aqui, seu apoio foi fundamental. Obrigada por me acolherem na família de braços abertos.

Às minhas grandes amigas, Simone Luz, Fernanda Hansen, Cíntia Battú e Letícia Pettenuzzo, obrigada pelo apoio e amizade, pelas conversas e por terem compartilhado comigo do conhecimento e tornando os dias no laboratório 27 sempre muito agradáveis.

À todos colegas do Laboratório de Estudo do Metabolismo Energético do Sistema Nervoso Central e do Metabolismo Intermediário (Laboratório 27, Departamento de Bioquímica – UFRGS), especialmente ao Adriano Assis, que muito me ajudou nos experimentos.

Ao PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica (UFRGS), às agências financiadoras brasileiras e rio-grandense de fomento à pesquisa e de bolsas de pós-graduação – CAPES, CNPq, PROPESQ/UFRGS e FAPERGS.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

A Cléia, pela paciência, sempre. À Bebel por ser sempre prestativa.

Aos funcionários do CREAL, aos 'meninos' da portaria Rodrigo e Eduardo.

Aos professores do PPG – Bioquímica da UFRGS.

Ao Professor Perry, de quem sempre lembrarei com carinho e sentirei saudades, agradeço a ele por ter me recebido no laboratório, por ter compartilhado comigo um pouco de seu conhecimento e por ter confiado em mim.

Ao meu orientador Clóvis, pela amizade, pelas palavras carinhosas nos momentos difíceis, pela compreensão e paciência, pelos ensinamentos enfim e, acima de tudo por ser um exemplo de pesquisador.

Resumo

Tendo em vista que populações de países industrializados aumentaram significativamente o consumo total de gordura, especialmente a saturada, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de dietas ricas em gordura saturada ou com azeite de oliva virgem sobre peso corporal, consumo calórico e parâmetros bioquímicos em ratos.

Quatro grupos de animais foram alimentados durante 16 semanas com 4 diferentes dietas: normocalórica com 9,12% óleo de soja (NOS); hipercalórica óleo de oliva (HOO), com 43,2% óleo de oliva virgem; hipercalórica com 43,2% de gordura saturada (ácidos palmítico, mirístico e esteárico) (HGS); e normocalórica com 43,2% de gordura saturada (NGS). Após o período de tratamento, foram realizadas medidas de síntese e concentração de glicogênio hepático, dosagens de colesterol total e triacilgliceróis em plasma e fígado e testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI). Animais foram sacrificados por decapitação, sangue foi coletado para as dosagens bioquímicas e fatias de fígado (100-150mg) foram pesadas para as incubações e dosagens bioquímicas. Tecido adiposo foi retirado e pesado para comparação entre os grupos.

Durante todo o período de tratamento, animais do grupo HGS consumiram mais e os do grupo HOO menos calorias diárias. Ratos que comeram dieta com gordura saturada '*ad libitum*', isto é, HGS e NOS, tinham maior peso corporal do que os outros, mas os ratos com dieta HGS tiveram maior deposição de gordura retroperitoneal. Em fígado, a síntese e a concentração de glicogênio foram maiores nos ratos que comeram dieta rica em gordura saturada (HGS e NGS). Em músculo sóleo a síntese de glicogênio

só estava aumentada nos animais do grupo NGS. A captação de glicose em músculo sóleo não apresentou diferenças entre os grupos. O GTT teve área sob a curva (AUC) maior no grupo HOO, mas o ITT foi normal. Em plasma, o colesterol total foi maior em HGS e menor em NGS e os triacilgliceróis foram menores em HOO e maiores em HGS. Em fígado, colesterol total e triacilgliceróis estavam elevados em todos os animais com dietas HL, porém, foram mais altos no grupo HOO com relação aos outros grupos. A atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1) que é relacionada com colesterol HDL, foi menor no grupo HGS. A dosagem de ácidos graxos livres (AGLs) não mostrou diferença significativa entre os grupos, mas observou-se uma tendência a aumento nos animais HGS.

Estes resultados sugerem uma correlação positiva entre o consumo de dietas hiperlipídicas com alterações metabólicas. A dieta hiperlipídica com gordura saturada quando ingerida '*ad libitum*' causou efeitos negativos sobre parâmetros tais como consumo calórico total, perfil lipídico e deposição de gordura, embora a dieta rica em gordura monoinsaturada tenha causado elevação na AUC do GTT e elevação da concentração de CT e TAG em fígado sem alterações no plasma. Mais estudos são necessários para compreensão dos efeitos de tais dietas em parâmetros como tolerância à glicose, síntese e concentração hepática de glicogênio, concentração de TAG e colesterol hepático. O presente estudo estende o conhecimento sobre suas ações no metabolismo intermediário.

Abstract

Given that populations of industrialized countries increased the total intake of dietary fat, especially saturated fat, in relation to other types of fat, the objective of the present investigation was to evaluate the effects of consumption of diets rich in saturated fat or with virgin olive oil on body weight, caloric consumption and some biochemical parameters in rats.

Four groups of animals were fed for 16 weeks with four different diets: normocaloric with 9.12% of the soybean oil (NSO); hipercaloric olive oil (HOO), with 43.2% of the virgin olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF), with 43.2 % of the saturated fat (palmitic, stearic and myristic acids) and normocaloric with 43.2% saturated fat (NSF). After the treatment, animals were sacrificed by decapitation, blood was collected for biochemical testing and liver slices (100-150 mg) were weighed for incubations and biochemical measurements. Adipose tissue was removed and weighed for comparison between groups. Hepatic glycogen synthesis and concentration, total cholesterol and triacylglycerol in plasma and liver and glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed.

Throughout the treatment period, the HGS group consumed more and HOO group less calories daily. Rats that ate a diet with saturated fat '*ad libitum*', ie HGS and HOO, had higher body weight than others, but HGS had higher retroperitoneal fat deposition. In liver, glycogen synthesis and concentration were higher in rats under a diet rich in saturated fat (HGS and NGS). In soleus muscle glycogen synthesis was increased only in group NGS. The glucose uptake in soleus muscle showed no differences between groups. The GTT had area under the curve (AUC) higher in group HOO, but the ITT was normal. In

plasma, total cholesterol was higher in HGS and lowest in NGS and triacylglycerols were lower in HOO and larger in HGS. In liver, total cholesterol and triacylglycerols were elevated in all animals under HL diets, however, were higher in group HOO than in the others. The activity of the paraoxonase 1 enzyme (PON1), that is related to HDL cholesterol, was lower in HGS. The determination of free fatty acids (FFAs) showed no significant difference between groups, but there was a tendency to increase in animals HGS. These results suggest a positive correlation between the consumption of high fat diets with metabolic changes. The high fat diet with saturated fat intake when '*ad libitum*' caused negative effects on parameters such as total calories, cholesterol and fat deposition, although the diet rich in monounsaturated fat has caused an increase in the AUC of GTT and increased concentration of TC and TAG in liver without changes in plasma. More studies are needed to understand the effects of such diets on parameters such as glucose tolerance, synthesis and hepatic glycogen concentration, TAG concentration and hepatic cholesterol. The present study extends knowledge about their actions in intermediary metabolism.

ÍNDICE

Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Lista de Abreviaturas.....	X
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tabelas	XIV
Parte I. Introdução	
1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	19
3. Desenho experimental	20
Parte II. Resultados	
Capítulo 1. Effects of high fat diet with fat acid saturated or monounsaturated in some biochemical parameters in rats	24
Parte III.	
4. Discussão	57
5. Conclusões.....	63
6. Perspectivas.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	65

Lista de Abreviaturas

NOS: normocalórica óleo soja 9,12% (controle)

HOO: hipercalórica óleo de oliva virgem 43,2%

HGS: hipercalórica gordura saturada 43,2%

NGS: normocalórica gordura saturada 43,2%

TTG: Teste de tolerância à glicose

TTI: Teste de tolerância à insulina

AUC: área under the curve

PON1: paraoxonase 1

AGLs: Ácidos Graxos Livres

EO: Estresse Oxidativo

SOD: Superóxido Dismutase

CAT: Catalase

DCV: Doenças cardiovasculares

DMII: Diabetes Mellitus Tipo II

IMC: Índice de Massa Corporal

POF: Pesquisa de Orçamentos Familiares

RI: Resistência à insulina

TAG: Triacilglicerol

ω 6: Ácidos Graxos Ômega ω 6

ω 3 Ácidos Graxos Ômega 3

PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados

LDL: Lipoproteínas de baixa densidade - Low density lipoproteins

CH₃: Grupo metila

COOH: Grupo carboxila

DAC: Doenças coronarianas

CT: Colesterol total

HDL: Lipoproteínas de Alta Densidade - *High Density Lipoprotein*

NEFAs: Ácidos Graxos Não Esterificados

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada

CL: Colesterol Livre

DAG: Diacilglicerol

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

O₂: Oxigênio

O₂^{•-}: Radical superóxido

OH[•]: Radical hidroxil

HO₂[•]: Hidroxiperoxil

RO₂[•]: Peroxil

RO[•]: Alkoxil

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

ADN: Ácido desoxirribonucléico

GAPDH: Gliceraldeído-3-P-desidrogenase

PKC: Proteína Cinase C

AO: Antioxidantes

GSH: Glutationa

GSSG: Glutationa dissulfeto

Mn-SOD: Complexo SOD dependente de manganês

Cu/Zn-SOD: Complexo SOD dependente de Cobre/Zinco

GPx: Glutationa Peroxidase

GR: Glutationa Redutase

Trx: Tioredoxina

TrxR: Tioredoxina Redutase

NADPH: nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato

TrxR: Dissulfeto do sítio ativo da Tioredoxina

IRS-1: Substrato de Receptor de Insulina

PKC θ : Proteína Cinase C θ

PI3-K: Fosfatidilinositol 3-cinase

NF- κ B: Fator Nuclear – κ B

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

IL₆: Interleucina 6

SNC: Sistema nervoso central

AGS: Ácido Graxo Sintase

CPT I: Carnitina Palmitoil Transferase I

CPT II: Carnitina Palmitoil Transferase II

ACC: Acetil CoA-carboxilase

FAS: Ácido Graxo Sintase

AMPK: Proteína cinase ativada por AMP

DM: Diabetes Mellitus

DMI: Diabetes Mellitus Tipo I

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

IP: intraperitoneal

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Lista de Figuras	Pág.
Figura 1. Estimativa de ingestão de ácidos graxos ao longo do tempo	6
Figura 2. Mecanismos pelos quais hiperglicemia produz EROs	14

Lista de Tabelas

Pág.

Tabela 1. Composição das dietas 22

PARTE I

1. Introdução

Dieta e nutrição são fatores importantes na promoção e manutenção da saúde. Pesquisas (PERICHART-PERERA et al, 2010; SIRI-TARINO e cols, 2010; SACKS & KATAN 2002; HUNTER e cols, 2010) mostram a existência de forte associação entre dieta e algumas doenças crônicas. Essas doenças crônicas sobrecarregam os serviços de saúde gerando custos elevados, em 2001, no mundo inteiro, elas contribuíram com 60% das 56,5 milhões mortes ocorridas e isto representou 46% do custo total de doenças. Estima-se que até 2020 estes valores alcancem o patamar de 57% (WHO, 2003).

Quase metade das mortes ocorridas por doenças crônicas são atribuídas às doenças cardiovasculares (DCV), obesidade e *diabetes mellitus* tipo II (DMII) e estes não são problemas apenas de regiões desenvolvidas. A projeção para 2020 é que $\frac{3}{4}$ de todas as mortes que ocorrerão no mundo serão por doenças crônicas, destas, estima-se cerca de 70% sejam devidas ao DMII (WHO, 2003).

A obesidade é uma doença crônica e o principal fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças inter-relacionadas. Pesquisas de cunho epidemiológico têm mostrado que a prevalência de sobrepeso e obesidade está aumentando de maneira exponencial em todos os países, tanto naqueles desenvolvidos como em desenvolvimento (ECKEL e KRAUSS, 1998; ALLISON et al, 1999; MUST et al, 1999; TROJANO & FLEGAL, 1998; WHO, 1998). Cerca de 50% dos adultos dos Canadá e de alguns países da Europa Ocidental apresentam índice de massa corporal (IMC), que é obtido através da equação peso em kg/m^2 , superior a 25kg/m^2 , e em alguns subgrupos a

prevalência de sobrepeso é superior a 70%. Nos Estados Unidos, mais do que metade da população tem sobrepeso ou obesidade, e isso ocorre independente de faixa etária ou sexo (STEIN & COLDITZ, 2004). Estima-se que no mundo todo mais de 1 bilhão de pessoas tenha excesso de peso e 300 milhões estão obesos (WHO, 1999; FLEGAL, et al, 1998; SMYTH & HERON, 2006; WHO, 2003).

No Brasil, a prevalência de sobrepeso em adultos também pode ser considerada um problema de saúde pública. A *Pesquisa de Orçamentos Familiares* (POF 2002-2003) revelou uma prevalência de 41,1% entre os homens e 40% entre as mulheres acima de 20 anos (IBGE, 2004). Apesar de todo empenho de cientistas e profissionais de saúde a incidência de sobrepeso e obesidade continua aumentando rapidamente em todo o mundo e vários países estão experimentando o que tem sido denominado de '*epidemia de obesidade*'. (SMYTH & HERON, 2006; WOODS et al, 2003).

As causas dessa epidemia ainda não estão completamente esclarecidas, porque a obesidade é uma doença complexa e multifatorial, onde predisposição genética e fatores ambientais estão envolvidos (BLUNDELL & COOLING, 1999; MORENTIN et al. 2009; STEIN & COLDITZ, 2004). Vários estudos têm mostrado a relação entre aumento na disponibilidade e no consumo de dietas hiperlipídicas, altamente calóricas e palatáveis combinados com estilo de vida sedentário e a incidência de obesidade (WOODS et al, 2004; LAFONTAN & LANGIN, 2009). Embora o peso corporal seja muito bem controlado por diversos mecanismos homeostáticos, quando humanos ou animais são submetidos a dietas com elevado teor de lipídeo este balanço é

rompido e ambos tornam-se obesos e com as complicações relacionadas (WOODS et al, 2003).

Estudos com humanos obesos mostram que o aumento do peso corporal é apenas um dos muitos sintomas apresentados, com hiperinsulinemia, hiperleptinemia e resistência à insulina (RI) sendo bastante freqüente entre estes. Em estudos com ratos que eram alimentados com dietas hiperlipídicas ou hipolipídicas, os primeiros apresentaram níveis mais altos de insulina e leptina de jejum quando comparados com aqueles alimentados com dietas hipolipídicas, além disso, o aumento nas concentrações desses hormônios era diretamente correlacionado com o peso corporal (WOODS et al, 2003). Entre os distúrbios metabólicos relacionados com a obesidade o mais incidente é a RI, uma desordem em que ocorre um prejuízo na resposta fisiológica à insulina, e é comumente associada a doenças (HEGARTY et al, 2003). A principal característica deste distúrbio é a incapacidade da insulina em diminuir a produção hepática de glicose e aumentar a utilização desta pelos tecidos (WALKER, 1995).

1.1 Gordura Dietética e Dietas hiperlipídicas

O termo 'gordura dietética' inclui os lipídeos de plantas e tecidos animais que são ingeridos nos alimentos. Em uma definição simplista, gorduras são sólidas e os óleos são líquidos à temperatura ambiente, ambos constituem uma mistura de triacilglicerol (TAG) com uma quantidade menor de outros constituintes. (WHO, 1993)

Gorduras e óleos são importante fonte de energia para o organismo. A ingestão mínima recomendada de gordura está na faixa de 15-20% do total de calorias diárias para a maioria dos humanos adultos e a ingestão máxima está na faixa de 30 a 35% do total de calorias ingeridas diariamente, sendo que, até 10% do total de calorias podem ser advindas de gordura saturada (WHO, 1993).

O papel dos óleos e gorduras na alimentação humana é um tópico amplamente estudado e os resultados encontrados em muitas pesquisas apontam para o fato de que o consumo destes nutrientes apresenta benefícios e riscos para populações (WHO, 1993).

Evidências sugerem que na Era Paleolítica os humanos desenvolveram-se consumindo uma dieta que continha quantidades menores de gordura saturada e ácidos graxos *trans* em relação à dieta atual, e uma proporção semelhante de ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ (1-2:1) (Figura 1) (SIMOPOULOS, 1999).

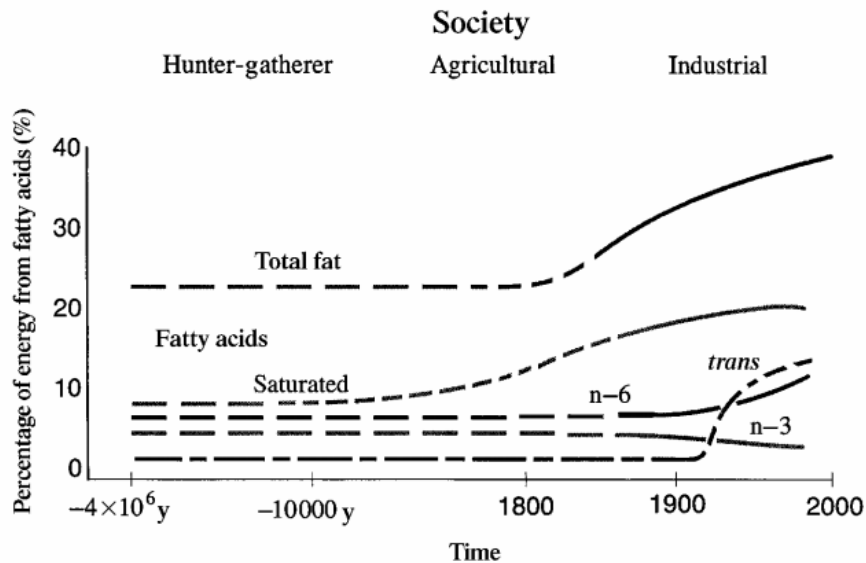


Figura 1: Estimativa da ingestão de ácidos graxos ao longo do tempo. Esquema hipotético mostra as relativas porcentagens de gordura e das diferentes famílias de ácidos graxos na nutrição humana conforme extrapolação a partir de análises de estudos sobre a alimentação do homem da Era Paleolítica (homens caçadores-coletores) até os dias atuais, considerando suas supostas mudanças durante os últimos 100 anos (SIMOPOULOS, 1999).

Dietas hiperlipídicas tem sido tema de muitos estudos nas últimas décadas, vários deles apontam para os riscos à saúde de uma dieta com elevado teor de lipídeos, porém, nem toda gordura dietética é prejudicial, por exemplo, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) possuem efeitos benéficos sobre a saúde e somente os ácidos graxos saturados mostram efeitos prejudiciais, a denominada '*dieta aterogênica*' é rica em gordura saturada e é responsável por aumentar níveis de lipoproteínas de baixa densidade (Low density lipoproteins – LDL) (RAVNSKOV, 1998; SIMOPOULOS, 1999).

1.2 Ácidos graxos Saturados e Monoinsaturados

Ácidos graxos geralmente são cadeias alifáticas retas com um grupo metila (CH_3) em uma das extremidades (denominada carbono ω) e um grupo

carboxila (COOH) na outra extremidade. Em seres humanos, a maioria dos ácidos graxos tem um número par de átomos de carbono. Ácidos graxos saturados possuem somente ligações simples e os ácidos graxos insaturados possuem ligações duplas entre os átomos, estas podem ser uma, como é o caso da gordura monoinsaturada ou mais, quando é denominada poliinsaturada. Quanto maior o número de insaturações, mais susceptível é o ácido graxo à oxidação. Os ácidos graxos saturados mais comuns em células de mamíferos são o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) (SMITH e cols, 2007).

Dietas ricas em gordura saturada e pobres em gordura poliinsaturada, como a observada no padrão ocidental são consideradas a principal causa de aterosclerose e DCV, em particular doenças coronarianas (DAC) (SIMOPOULOS, 1999). Modelos experimentais realizados com gordura saturada, utilizando os ácidos graxos: láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) mostram que estes ácidos graxos saturados estão implicados na elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), TAG, LDL, elevação da pressão arterial e RI (BENOIT et al., 2009; TREMBLAY, 2004). Estudos recentes relacionam a ingestão de ácido graxo saturado, especialmente o ácido palmítico com diminuição da sinalização da insulina no sistema nervoso central causando resistência à insulina no cérebro e conduzindo a obesidade com todas as suas características correlacionadas (BENOIT et al, 2009).

Ao contrário dos ácidos graxos saturados, o ácido graxo poliinsaturado linoléico (18:2 W6) reduz moderadamente níveis de CT e LDL séricos, e o ácido graxo monoinsaturado oléico (18:1 W9) parece não ter efeitos sobre níveis de LDL, mas aumenta níveis de lipoproteínas de alta densidade (*high*

density lipoprotein HDL) modestamente (WHO, 1993; RAVNSKOV, 1998; PEREZ-JIMENEZ et al, 2005).

A chamada “*dieta Mediterrânea*” cuja principal característica é a presença do azeite de oliva, rica em gordura monoinsaturada, é relacionada com baixos índices de DCV, doenças neurodegenerativas e incidência de alguns tipos de câncer. A maioria das pesquisas relaciona estes efeitos aos vários compostos presentes no azeite de oliva, especialmente antioxidantes e compostos fenólicos (CICERALE, e cols, 2010; PEREZ-JIMENEZ et al, 2005; MACHOWETZ, et al. 2007), embora resultados recentes tenham mostrado que os efeitos do azeite de oliva na redução da pressão arterial são devido ao elevado teor de ácido oléico presente no azeite (TERÉS et al, 2008). Seja por seu alto conteúdo de compostos fenólicos antioxidantes ou pelo alto teor de gordura monoinsaturada (70 a 80%) (TERÉS et al, 2008) presente neste tipo de gordura, o consumo elevado do azeite de oliva por algumas populações tem mostrado efeitos benéficos sobre a saúde, com níveis diminuídos de CT, partículas LDL e TAG plasmáticos, com diminuída incidência de DCV. (WATERMAN et al, 2007). Além disto, estudos de laboratório têm mostrado que o ácido oléico no hipotálamo possui efeito ‘mimético’ à insulina diminuindo a produção hepática de glicose e a ingestão calórica, conseqüentemente, também o peso corporal (OBICI et al, 2002).

1.3 Obesidade

A obesidade é uma doença complexa e de origem multifatorial caracterizada por acúmulo de excesso de gordura corporal. Em termos

simples, pode-se dizer que obesidade ocorre quando existe um balanço energético positivo, ou seja, quando a ingestão calórica excede o gasto energético. (BLUNDELL & COOLING, 1999; MORENTIN et al, 2009).

Em humanos ou animais obesos, a presença de excesso de adiposidade corporal induz um estado inflamatório que está implicado em várias desordens metabólicas. O tecido adiposo hipertrofiado secreta moléculas que acabam induzindo resposta pró-inflamatória com recrutamento de macrófagos para o local (FERRANTE, 2007).

No tecido adiposo, maior reservatório de energia e combustível metabólico para o organismo, as reservas estão na forma de TAG. Fatores que controlam o estoque e mobilização destes TAG são importantes reguladores do acúmulo de lípidos. Sob estímulos específicos lipases podem rapidamente liberar ácidos graxos não esterificados (NEFAs) a partir dos TAG, que são então utilizados pelas células para gerar energia (LAFONTAN & LANGIN, 2009). Quando ocorre liberação excessiva de NEFAs sem concomitante utilização pelos tecidos, pode ocorrer acúmulo de metabólitos tóxicos em tecidos não-adiposos como músculo esquelético, células β pancreáticas e fígado, induzindo inflamação crônica com infiltração e ativação de macrófagos, acarretando disfunção e morte celular e RI num processo denominado lipotoxicidade. (PRIEUR e cols, 2009; WANG et al, 2008). Os metabólitos lipídicos que causam disfunção são LDLs oxidadas e glicadas, produtos finais de glicação avançada (AGEs), AGLs, colesterol livre (CL), excesso de TAG, diacilglicerol (DAG) e ceramidas (PRIEUR e cols, 2009). Por isso, a obesidade é considerada um estado pró-inflamatório. (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006).

Na maioria das pessoas, com dietas equilibradas, não existe grande variação no peso corporal ao longo do tempo, embora ocorram variações na ingestão calórica. Para manter esta homeostasia existem mecanismos de controle deste processo que fazem com que o peso corporal seja firmemente regulado através da integração de sinais periféricos e centrais que refletem a disponibilidade de energia (BENOIT et al, 2009).

Apesar dos mecanismos disponíveis para a regulação do peso corporal, estudos têm mostrado que quando animais ou humanos são submetidos a dietas com elevados teores de lipídeos regularmente, a quantidade de energia estocada como lipídeo pode aumentar e ocorrer o desenvolvimento de obesidade (WOODS et al, 2004).

1.4. Resistência à Insulina (RI)

A resistência à insulina (RI) é definida como a incapacidade do organismo em responder normalmente às ações da insulina e é uma característica do DMII (JIANG & ZHANG, 2005)

A RI tem é um estado patológico cujas características são a capacidade prejudicada da insulina em diminuir a produção hepática de glicose e a lipólise do tecido adiposo bem como de estimular a entrada de glicose nos tecidos adiposo e muscular. O músculo é responsável por 70-80% da entrada de glicose estimulada pela insulina e é considerado o mais importante local de ação do hormônio. Nos quadros de RI, as células β pancreáticas são forçadas a aumentar a secreção de insulina o que leva à hipertrofia e hiperplasia, além disto, apresentam também glicotoxicidade e lipotoxicidade que, somados ao

EO, podem ocasionar morte destas células. Por essa razão, este estado apresenta um importante papel no desenvolvimento da deterioração progressiva que ocorre nas células β no DMII (DeFRONZO et al, 1981; UNGER & ORCI, 2001).

Tecidos como o cérebro e os eritrócitos apresentam uma demanda ininterrupta por glicose, satisfeita nos períodos de jejum por meio da produção de glicose pelo fígado e em pequena extensão pelos rins num processo denominado gliconeogênese. Em diabéticos a taxa de produção de glicose hepática está aumentada após uma noite de jejum, a superprodução de glicose pelo fígado ocorre mesmo na presença de níveis plasmáticos de insulina de jejum aumentadas, indicando severa resistência ao efeito supressor da insulina sobre a produção hepática de glicose. Este aumento da produção hepática de glicose é explicado pelo aumento da gliconeogênese e não pela glicogenólise (DeFRONZO, 2009).

Embora nem todos os indivíduos obesos sejam diabéticos conforme aumenta o IMC, aumenta o risco do desenvolvimento de DMII (COLDITZ et al, 1995).

1.5 Teoria glicotóxica, teoria lipotóxica, estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Embora seja um dos tópicos mais estudados nas últimas décadas, a etiopatogenia do DMII não está completamente elucidada. Atualmente 2 teorias são propostas para explicá-la: a glicotóxica e a lipotóxica.

Segundo Brownlee (2005) todas as alterações que ocorrem na etiopatogenia do DMII são decorrentes de um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ocorrem principalmente nas células que não têm capacidade de diminuir seus transportadores de glicose, isto ocasiona uma elevada concentração intracelular desta molécula e um conseqüente aumento na produção de EROs. Aumento da concentração intracelular de glicose ocasiona um aumento da oxidação de acetil-CoA no ciclo de Krebs, com conseqüente aumento da oxidação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) na cadeia de transporte de elétrons, resultando num aumento no gradiente de voltagem através da membrana mitocondrial interna até atingir um limiar crítico (DU et al, 2000). Quando o limiar crítico é atingido, ocasiona um refluxo de elétrons do complexo III para a ubiquinona e desta para o oxigênio (O_2), formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) dando início à cadeia de formação de espécies EROs. (DU et al, 2000).

‘Espécies Reativas de Oxigênio’ é um termo coletivo que inclui tanto radicais oxigênio quanto certos não radicais que são agentes oxidantes ou são facilmente convertidos em radicais, entre os radicais estão o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), hidroxiperoxil ($HO_2^{\cdot-}$), peroxil (RO_2^{\cdot}), alkoxil (RO^{\cdot}) entre outros, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos não radicais incluído no termo ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Fisiologicamente, EROs são mediadores de cascata de sinalização celular de organismos aeróbios (DROGË 2002; THANNICKAL & FANBURG, 2002), porém sua produção excessiva pode levar a um desbalanço entre o sistema pró-oxidante e antioxidante, levando ao EO. EO pode levar à perda de função celular, dano ao ácido desoxirribonucléico (ADN), necrose e apoptose.

Quando ocorre quebra do ADN a enzima poli-ADP(ribose)-polimerase é ativada (DU et al, 2003) o que acaba inibindo a enzima gliceraldeído-3-P-desidrogenase (GAPDH) gerando aumento na concentração de gliceraldeído-3-fosfato o que leva a aumento nas vias do poliol, da formação de AGEs, da ativação da proteína cinase C (PKC) β e da via das hexosaminas (SALVEMINI et al, 1999). Células possuem sistemas antioxidantes (AO), i.e, sistemas de destoxificação de EROs (NORDBERG & ARNÉR, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Entre os sistemas antioxidantes estão: a SOD, o tripeptídeo γ -glutamil-cisteínil-glicina (GSH) e a CAT. SOD (E.C.1.15.1.1) composto pela Mn-SOD (mitocondrial) e Cu/Zn-SOD (citosólica) promovem a redução do radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . O sistema GSH, um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteínil-glicina) existe no organismo na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), a interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada ocorre em conjunto com a glutathiona peroxidase (GPx) e Glutathiona redutase (GR) e cujo resultado final é a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. CAT (E.C. 1.11.1.6) atua na dismutação de H_2O_2 em oxigênio e água. (NORDBERG & ARNÉR, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Outro sistema antioxidante importante é o da tioredoxina (Trx), formado pela tioredoxina redutase (TrxR), pela proteína tioredoxina (Trx) e nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Neste sistema, TrxR, reduz o dissulfeto do sítio ativo da Trx a ditiol usando o NAPH como doador de elétrons (NORDBERG & ARNÉR, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Junto com o sistema GSH este sistema é reconhecido como o principal regulador do

ambiente redox intracelular e atua na defesa antioxidante (NORDBERG & ARNÉR, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

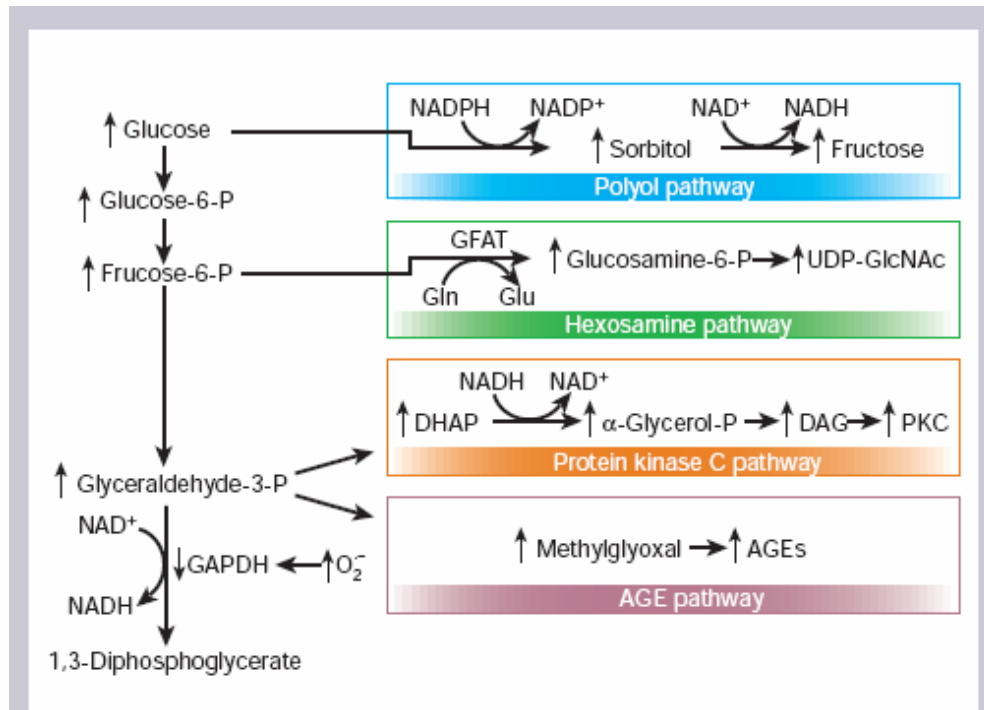


Figura 2: Adaptado de Brownlee: mecanismos pelos quais hiperglicemia induz superprodução mitocondrial de superóxido ativando as 4 vias que promovem dano oxidativo (BROWNLEE, 2001).

Segundo a teoria lipotóxica, a obesidade leva a um aumento dos ácidos graxos circulantes que por sua vez provocam aumento intracelular de acil-CoA de cadeia longa e de DAG. Aumento de acil-CoA de cadeia longa aumenta a síntese de ceramida, a qual aumenta a produção de peroxinitrito. Por sua vez, o aumento de DAG intracelular ativa a PKC δ que fosforila o substrato de receptor de insulina (IRS1) em serina, diminuindo a sua participação na sinalização da insulina (UNGER & ORCI, 2001; McGARRY, 2002)

Diversas isoformas de uma classe de PKC serina-treonina cinase estão envolvidas em vias de transdução de sinal que direcionam processos fisiológicos incluindo proliferação e diferenciação celular, expressão de genes, transporte através da membrana, organização do citoesqueleto e proteínas da

matriz extra-celular. PKCs se tornam ativas quando movem-se para a superfície interna da membrana celular onde interagem com outras proteínas e receptores modificando a sinalização celular (BENOIT et al, 2009).

Acredita-se que PKCs são mediadoras de doenças metabólicas induzidas pela gordura dietética através da translocação da PKC θ para a membrana celular que inibe sinalização da insulina por aumentar a fosforilação do IRS-1 em serina-treonina (BENOIT et al, 2009). Como consequência há inibição da fosforilação da tirosina do IRS-1 (ITANI *et al.*, 2000), menor ligação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) e menor translocação do transportador de glicose (GLUT 4) para a membrana estimulada por insulina (GRIFFIN et al, 1999).

O acúmulo de TAG intracelulares também está associado com ativação da PKC- θ (GRIFFIN et al, 1999). Alteração na ativação de isoformas da PKC pode contribuir para a ativação do fator nuclear – κ B (NF- κ B) (ITANI et al, 2002). NF- κ B é um termo coletivo que se refere a uma classe de fatores de transcrição diméricos membro da família Rel de proteínas ativadoras transcricionais (THANOS & MANIATIS, 1995). NF- κ B existe no citoplasma na forma de um complexo inativo, como um heterodímero composto de 2 subunidades, ligadas à proteínas inibitórias da família I κ B. Estímulos estressores celulares, desencadeiam a fosforilação de I κ B que então é degradado pela ubiquitina resultando na liberação de NF- κ B que é translocado do citosol para o núcleo (BARNES & KARIN, 1997), onde induz a transcrição de genes pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (BARNES & KARIN, 1997).

1.6 Lipotoxicidade Hipotalâmica

Até recentemente, acreditava-se que o metabolismo lipídico no sistema nervoso central era irrelevante, e a glicose a única molécula importante para este órgão, ou, alternativamente, corpos cetônicos em períodos de jejum. Na visão ortodoxa, lipídeos eram considerados como moléculas estruturais ou sinalizadoras no sistema nervoso central (SNC), com um papel negligenciável ou ausente como combustível metabólico. Recentes evidências provenientes de pesquisas científicas realizadas na última década mostraram que os lipídeos circulantes podem ser '*sentidos*' pelo hipotálamo que é o principal local onde convergem impulsos neurais centrais e periféricos (MORENTIN et al, 2009).

O papel de neuropeptídeos na regulação da ingestão alimentar e gasto energético está bem estabelecido, mas, dados de pesquisas atuais tem mostrado que a modulação do metabolismo lipídico no hipotálamo também é um mecanismo importante nesta regulação. Sob condições lipogênicas, a glicose que entra na célula é convertida a piruvato que entra para a mitocôndria e é convertido a acetil-CoA que então é transportado como citrato de volta ao citosol, onde a enzima citrato-liase (E.C.C 4.1.3.8) cliva citrato em acetil-CoA e oxalacetato. Acetil-CoA citosólico é substrato para a enzima acetil CoA carboxilase (E.C. 6.4.1.2) que cataliza a carboxilação de acetil CoA a malonil-CoA em uma reação dependente de ATP. Acetil-CoA e malonil-coA são empregados para a produção do ácido graxo de 16 carbonos denominado palmitato, pelo complexo ácido graxo sintase (AGS). Este ácido graxo pode originar diferentes compostos como TAG ou fosfolipídeos e derivados de membrana, além ser metabolizado, dependendo do requerimento energético da célula. Quando destinado a ser metabolizado na mitocôndria, o ácido graxo é

primeiro ativado na membrana mitocondrial externa e em seguida esse acil-CoA de cadeia longa é translocado para a matriz mitocondrial por meio da carnitina palmitoil transferase I e II (CPT I e II) onde ocorre a β -oxidação (MORENTIN et al, 2009; SMITH e cols, 2007).

Malonil-CoA é um intermediário da biossíntese de ácidos graxos e seus níveis variam de acordo com o equilíbrio entre as atividades das enzimas acetil CoA-carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e malonil-CoA descarboxilase. Ambas as enzimas são reguladas por uma cinase *upstream* comum, a proteína cinase ativada por AMP (AMPK). AMPK ativada fosforila e inibe ACC, enquanto ativa malonil-CoA descarboxilase, isto reduz os níveis de malonil-CoA, o fluxo de substrato para a biosíntese de ácidos graxos e promove estímulo para ingestão de alimentos, algumas drogas com efeito anoréxico fazem o contrário, ou seja, promovem o acúmulo de malonil-CoA no hipotálamo que é 'sentido' como sinal de abundância de nutrientes por neurônios críticos que regulam a ingestão de alimentos. O jejum diminui conteúdo de malonil-CoA hipotalâmico (FOLMES & LOPASCHUK, 2007; MORENTIN et al, 2009).

O hipotálamo é um importante regulador do comportamento alimentar. Anatomicamente, é dividido em 2 regiões denominadas hipotálamo ventromedial e hipotálamo ventrolateral. A região ventromedial é denominada 'centro da saciedade' e lesões nesta região provocam superalimentação, obesidade e declínio na produção de glucagon. Na região lateral existe o 'centro da alimentação', lesões na região ventrolateral causam perda de apetite e de peso (FOLMES & LOPASCHUK, 2007).

Além do controle da ingestão alimentar, o hipotálamo tem importante função no controle do gasto de energia pelo organismo, no conteúdo de gordura corporal e na produção hepática de glicose. Estudos feitos com animais de laboratório mostraram que a insulina atua no hipotálamo diminuindo a produção hepática de glicose. Em estados patológicos tais como obesidade e DMII a sinalização hipotalâmica da insulina é prejudicada (NISWENDER e cols, 2004; MAYER & BELSHAM, 2010).

1.7 Diabetes Mellitus (DM)

O DM é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na ação ou secreção de insulina, ou em ambos. A forma mais prevalente de DM é a DMII. Em pacientes DMII, a maior causa de morte são as DCV (STAMLER et al, 1993). Entre as complicações crônicas mais prevalentes no DM estão a nefropatia, com falência renal, retinopatia evoluindo para cegueira, cardiopatia com possibilidade de falha cardíaca e neuropatia com neurodegeneração, que frequentemente aumenta a prevalência de úlceras nos pés e amputações (STAMLER et al, 1993).

Existem 3 formas principais de diabetes: o Diabetes Mellitus Tipo I (DMI) que é causada por reação auto-imune, com destruição total das células β -pancreáticas que leva a absoluta deficiência de insulina, geralmente ocorre em crianças e/ou adultos jovens e requer tratamento com insulina; o Diabetes Mellitus Tipo II que chega a 85-95% de todos os casos diagnosticados e é caracterizado por resistência à ação da insulina, num primeiro momento e não

necessariamente requer terapia com o hormônio; e o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) que inicia-se durante a gestação, podendo ou não permanece após o término deste período. (NARAYAN, et al, SD)

A prevalência do DMII vem aumentando de maneira exponencial tanto em países economicamente ricos como em países em desenvolvimento. Arábia Saudita, Estados Unidos, Suíça e Áustria apresentam elevada prevalência já Noruega, China e Islândia apresentam baixa prevalência. Estima-se que ao final do século 21 ocorra aumento de 2,5 vezes na prevalência de DM em países como África sub-Saariana, Índia e América Latina, com aumento pouco menor, cerca de 50% nos países que já tiveram grande aumento na prevalência do DM durante o século 20 (GINTER & SIMKO, 2010).

2. Objetivos

2.1. Geral

Levando em consideração que nos países industrializados o consumo de dietas com elevado aporte calórico e ricas em gorduras, especialmente a saturada, é em grande parte responsável pela epidemia de obesidade e seus problemas relacionados. E, que os custos gerados pelos problemas associados às doenças crônicas são elevados e tem forte impacto na economia, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos de dietas enriquecidas com diferentes lipídeos sobre parâmetros do metabolismo de ratos.

2.2. Específicos

- Tratar animais com dietas hiperlipídicas com 2 diferentes composições de lipídios: dieta rica em gordura monoinsaturada ou em ácido graxo saturado durante 16 semanas verificando dados de consumo alimentar diário e peso corporal semanal;

- Após 16 semanas de consumo destas dietas verificar a presença, ou não, de alteração no ganho de peso, síntese de glicogênio hepático e muscular, captação de glicose em músculo e perfil lipídico nestes animais.

- Investigar se a dieta com predominância de ácidos graxos saturados causa alterações metabólicas independentemente da quantidade calórica.

- Investigar se o tipo de gordura na dieta provoca diferenças na ingestão calórica total e no peso do animal.

- Investigar se dietas hiperlipídicas são capazes de causar resistência à insulina

3. Desenho experimental

3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 21-23°C, com ciclo de luminosidade claro-escuro de 12/12 horas.

Quarenta ratos Wistar (70 dias de vida) foram utilizados para o protocolo experimental.

Ao início do protocolo, animais foram pesados e divididos em 4 grupos com 3 dietas diferentes: normocalórica óleo de soja (NOS) com 9,12% óleo de soja; hipercalórica óleo de oliva (HOO) com 43,2% óleo de oliva virgem; hipercalórico saturado (HGS) com ácidos palmítico, mirístico e esteárico 43,2%; normocalórica com gordura saturada (NGS) com 43,2% gordura saturada, cada grupo com 10 animais.

Os animais foram alojados em grupos de 5 por caixa, ratos NGS foram alojados individualmente. Os grupos NOS, HOO e HGS tinham livre acesso à comida e o grupo NGS recebia a mesma quantidade em calorias diárias que o grupo NOS, todos os animais tinham livre acesso água.

Durante 16 semanas os animais foram mantidos nas respectivas dietas.

3.2 Dietas

Composição das dietas:

Nutrientes	Normocalórica óleo de soja		Hipercalórica óleo de oliva		Hipercalórica gordura saturada		Normocalórico gordura saturada	
	NOS		HOO		HGS		NGS	
	g	Kcal%	g	Kcal%	g	Kcal%	g	Kcal%
Proteína	26,9	27,25	26,9	21,53	26,9	21,53	26,9	21,53
Carboidrato	62,8	63,63	41,8	33,45	41,8	33,45	41,8	33,45
Lípídeo	4,0	9,12	25,0	45,02	25,0	45,02	25,0	45,02
Kcal/g	3,95		5,0		5,0		5,0	
Amido	62,8	63,63	41,8	33,45	41,8	33,45	41,8	33,45
Proteína ¹	26,9	27,25	26,9	21,53	26,9	21,53	26,9	21,53
Vitaminas ²	1,0	--	--	--	--	--	--	--
Minerais ³	4,0	--	--	--	--	--	--	--
Fibras	1,0	--	--	--	--	--	--	--
D-L- Metionina ³	0,3	--	--	--	--	--	--	--
Óleo de soja	4,0	9,12	1,0	1,8	1,0	1,8	1,0	1,8
Ac Palmítico	--	--	--	--	7,8	14,04	7,8	14,04
Ac Mirístico	--	--	--	--	3,6	6,48	3,6	6,48
Ac Esteárico	--	--	--	--	3,8	6,84	3,8	6,84
Azeite de oliva	--	--	24,0	43,2	8,8	15,84	8,8	15,84

Tabela1: Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental

1 Proteína isolada de soja, 92% de pureza (Solae do Brasil, São Paulo, Brasil).

2 Mistura vitamínica (mg/100g de ração): vitamina A,4; vitamina D, 0,5; vitamina E, 10; menadiona, 05; colina, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacina, 4; ácido pantotênico, 4; riboflavina, 0,8; tiamina, 0,5; piridoxina, 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B12, 0,003.

3 Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄,1556; MgSO₄,229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2,2; CuSO₄.5H₂O, 1,9; CoCl₂.6 H₂O, 0,09).

PARTE II

Capítulo 1

**Effects of high fat diet with fat acid saturated or monounsaturated
on some biochemical parameters in rats**

Manuscrito enviado para a Cell Biochemistry and Function

Effects of high fat diet with fat acid saturated or monounsaturated on some biochemical parameters in rats

Hoefel, A.¹, Hansen, F.¹, Rosa, P.D.¹, de Assis, A.M.¹, da Silveira, S.L.¹, Denardin, C.C.¹, Pettenuzzo, L.¹, Augusti, P.R.², Somacal S.², Emanuelli T., Wannmacher C.M.D.^{1,3}, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul (RS), Brasil.

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria

³ Corresponding author: Clóvis Milton Duval Wannmacher; anahoefel; Ramiro Barcelos, 2600 annex, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035000; phone 51 33085538 fax 51 3308 5540

Head title: **High fat diet and biochemical parameters in rat**

Abstract

Populations of industrialized countries increased the intake of saturated in relation to other fats and this has lead to an increase in the prevalence of certain chronic diseases. We evaluated the effect of high fat diets, or with monounsaturated or saturated fat on body weight, caloric intake and some biochemical parameters in rats. Four groups of rats were fed for 16 weeks with diets: normocaloric (9.12% soy oil, NSO); hypercaloric (43.8% olive oil, HOO); hypercaloric (43.8% saturated fat, palmitic, myristic, stearic acids, HSF) and normocaloric (43.8% saturated fat, NSF). HSF rats consumed more

calories daily than others, but HSF e HOO rats had higher body weight. In liver, glycogen concentration and synthesis was higher in rats HSF and NSF. In soleus muscle, glycogen synthesis was increased in rats of the group NSF. In plasma, total cholesterol was higher in HSF and lower NSF rats and triacylglycerol were lower in HOO and higher in HSF rats in relation to the other. In liver, total cholesterol and triacylglycerol were elevated in all rats with high fat diet, but, HOO rats had the highest values. Paraoxonase 1 activity whose is related to high density lipoprotein cholesterol (HDL) was lower in rats HSF. In HOO rats glucose tolerance test (GTT) was altered but insulin tolerance test (ITT) was normal. These results suggest that both saturated and monounsaturated fat causes damaging effects when ingested in high percentage. However, more studies are necessary to understand the mechanisms by which theses diets cause metabolic alterations.

Key words: Saturated/monounsaturated fat, glycogen synthesis, paraoxonase activity,

Introduction

Diet and nutrition are important factors in promoting and maintaining health[1]. High fat/calorie diet lead to chronic disease, these chronic disease overwhelm health services generating high costs. In 2001 they contributed to 60% of the 56,5 million deaths and this represented 46% of the total cost of illness. It is estimated that by 2020 these values reach a plateau of 57%[2]. Nearly half of all deaths from chronic diseases are attributed to cardiovascular diseases (CVD), obesity and diabetes and these are not just problems of developing regions[2].

The prevalence of overweight and obesity is increasing exponentially in many countries[3, 4]. It is estimated that worldwide, more than 1 billion people are with overweight and 300 million are obese[2,5,6].

Obesity is characterized by the accumulation of body fat. Is a complex and multifactorial disease where genetic predisposition and environmental factors are involved[7, 8]. In simple terms, obesity occurs when energy intake exceeds expenditure[9]. Obesity is the major risk factor for development of the insulin resistance (IR) and diabetes mellitus type II (DMII). Among diabetics, the major cause of death are CVD and renal failure[10].

In obesity states occurs increased circulating fatty acids that in turn, causes the increase of intracellular acyl-CoA long chain and diacylglycerols (DAG). This increase in intracellular DAG activates PKCs which than phosphorylates insulin receptor substrate (IRS1) on serine residue reducing his stake in insulin signaling[11]. PKCs become active when they move to the inner surface of the cell membrane where become active e interact with proteins and receptors modifying signaling[9]. Dietary saturated fat acid can stimulate PKCs to migrate for the cellular membrane[9].

The central nervous system (CNS) has mechanisms to maintain homeostasis of body weight, which is tightly regulated for central and peripheral signals reflecting the availability of body energy[9]. In spite of the existence of these mechanisms, when humans or rodents are exposed to hypercaloric diets lose this mechanism and they become obese[12].

Fat and oils are one important source of energy for the body. Evidence suggests that the Paleolithic Age Humans evolved eating a diet that contained smaller amounts of saturated fat and *trans* fatty acids in relation to the current diet[13].

Diets high in saturated fat and poor in polyunsaturated fat, as observed in the western standard are considered the main cause of atherosclerosis and CVD, particularly coronary heart disease[13]. Besides elevating total cholesterol (TC), triacylglycerols (TAG) and low density lipoproteins (LDL) levels[9,14], saturated fat is related with decreased insulin signaling at the level of CNS causing insulin resistance in the brain, hyperphagia and leading to obesity[9].

The so-called “*Mediterranean Diet*” in which the main source of dietary lipid is the olive oil, rich in monounsaturated fat, is associated with low rates of CVD, neurodegenerative diseases and the incidence of cancers[15]. Laboratory studies shown that oleic acid mimics the action of insulin in the hypothalamus, decreasing food intake and hepatic glucose production and thus regulating of body weight[16].

Whereas the consumption of high fat / calories diets, especially saturated fat, in industrialized countries, is in part responsible for the epidemic of obesity and its related problems, also that the costs generated by problems associated with chronic diseases is high and has a strong impact on the economy, the objective of this study is to assess the effects of high fat diet in some metabolic parameters in rats.

Material and methods

Chemicals

D-[U-¹⁴C]glucose (297 mCi/mmol) and [U-¹⁴C]alanine (157 mCi/mmol) were purchased from Amersham International (Little Chalfont, Bucks, UK). Triton X-100 (Labsynth Produtos de Laboratório Ltda, SP, Brazil), bovine albumin (J. T. Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ, USA). Optiphase Hi-Safe 3 was purchased from Perkin-Elmer (RJ, Brazil). TCA from Merck S.A. (RS, Brazil). D-Glucose from Quimbrás (RJ, Brazil). POP and POPOP from Sigma (St. Louis/EUA). Kits for dosage NEFAs from Roche (Germany). Kits for dosage TAG and cholesterol from Diagnostica SA (MG, Brazil).

Animals and Diets

Seventy-two adult Wistar rats (male, 60 days old) from the Central Animal House of the Department of Biochemistry divided into two experiments (40 and 32 rats) were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) at a room temperature of 22±2°C. The protocol used for this research was employed according to guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of Veterinary Medicine and Animal Science from the University of São Paulo, Brazil.

The supplemented diets had 43.2% of total calories as fat, varying only in fat quality, in group NSO, 9.12% of total caloric intake was from soy oil. While in the HOO group 43.2% of total fats came from virgin olive oil, on high fat diet with saturated fat (HSF), 15.84% came from virgin olive oil, 14.04% of palmitic acid (16:0), 6.48% myristic acid (14:0) and 6.84% stearic acid (18:0). During the treatment period (16 weeks), animals had free access to water.

Fat determination in the feces

The fat determination in the feces was accomplished by the method Bligh-Dyer[17]. Shortly, samples of feces (2,5 grams) were placed in *Falcon* tubes and added chloroform and methanol (1:2) and distilled water. After agitation for 30 minutes, chloroform and Na₂SO₄ 1,5% (1:1) were added and the samples were agitated for more 2 minutes. Soon after the samples were centrifuged and the layer containing the fat was removed and placed in test tubes containing 0,8 grams of Na₂SO₄ and immediately vortexed vigorously and filtered. 5 mL of the filtrate were collected and placed in becker previously weighed without humidity, solvent and humidity removed and weighed again.

Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)

When we verified the glycogen metabolism (synthesis and concentration) results intrigued us, and we checked in the second group of rats the GTT and ITT after 6 h of starvation. In GTT a 50% glucose solution was injected into the animals (2 mg/kg ip). ITT was accomplished 3 days after GTT. Insulin (1 U insulin/kg) was injected IP. Blood was collected by a small puncture on the tail immediately prior to the injection, as well as 30, 60, and 120 min afterward. At each time-point, glucose was measured by a glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics, USA).

Tissue Preparation

Rats were killed by decapitation without anesthesia. Plasma was collected immediately and stored at -70 °C until analyzed. Fat tissues, liver and soleus muscle were immediately removed and weighted.

Paraoxonase I (PON1) activity

PON1 activity was assessed by measuring the rate of paraoxon hydrolysis to yield p-nitrophenol, at 412 nm and 25°C as previously described[18].

Protein quantification

Protein was measured according to Lowry et al.[19] using bovine serum albumin as the standard.

Blood Biochemical Parameters

Plasma triacylglycerol (TAG) and total cholesterol (TC) levels were measured using commercial kits (Labtest, MG, Brazil). Reactions were performed using the Labmax apparatus (Labtest, MG, Brazil). Plasma free fatty acids activities were measured using commercial kits (Roche Diagnostics, Germany and MP Biomedicals, NY, USA, respectively).

Glycogen Synthesis in liver and muscle

For the measurement of glycogen synthesis, the liver and soleus was dissected and cut into 300 µm slices using a McIlwain tissue chopper (100-120 mg). It was incubated in a beaker with a medium containing Dulbecco buffer 2,7 mM (pH 7.3), 5 mM glucose and 0.3 µCi D[U-¹⁴C]glucose or 0,2 mM alanine and 0.3 µCi [U-¹⁴C]alanine.

Incubations were carried out in ambient content that was gassed with a 95% O₂:5% CO₂ and incubated at 37°C for 1 h in a metabolic shaker (60 cycles/min), according to the method of Dolnikoff et al.[20]. Incubation was stopped by placing the bottles in ice.

KOH 60% (1 ml) was added to each beaker and immediately, 15 min in a boiling water bath, ethanol was added to the tubes precipitate glycogen. After precipitation, suspended was glycogen in water, and the scintillation liquid (Opti-Phase HiSafe3 from PerkinElmer-USA) was added. The samples were assessed in a scintillation liquid counter.

Glycogen concentration liver

The glycogen concentration was made from slices of liver maintained in KOH 30% were placed in a water bath at 100 °C and subjected to other subsequent steps as described above. After obtaining the glycogen pellet, that was dissolved in Milli-Q water and an aliquot was removed for estimation of glycogen content by the colorimetric method Krisman[21], with color reagent produced from a solution of KI, I₂ and saturated solution CaCl₂. The reading was held on Beckman DU 640 spectrophotometer provided by the Departament of Biochemistry.

Statistical Analysis

Comparisons between different groups were performed employing ANOVA or repeated measure analysis (RMA) or area under the curve (AUC) followed by the post hoc Tukey test when F values were significant. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

Results

Parameters of caloric intake and body weight

The data chart 1 show the average caloric intake of rats. The RMA showed that the groups had a small decline in consumption from 4 weeks and this decrease was similar for all groups. The RMA also showed that the caloric intake of the rats HSF group was always larger than the other groups (days x groups interaction, $F_{(45,720)} = 1.8$; $p < 0.05$). Rats consuming high fat diets (HFD) ‘*ad libitum*’ showed higher weight gains (57.3% for HSF and 37.2% for HOO) when compared to the other groups ($F_{(3, 58)} = 16.32$, $p < 0.01$) (Figure 2). The RMA also revealed that the NSF rats gained less weight than the other groups ($F_{(45,870)} = 4.79$; $p < 0.01$).

Parameters of the weights are presented in Table 2. No difference was found between the weights of epididymal adipose tissue between groups, however, the HSF rats had

greater accumulation of abdominal adipose tissue than the other ($F_{(3,58)} = 13.59$; $p < 0.01$).

Evaluating the caloric intake we expected a different effect on weight gain observed in the group HSF. We then evaluated the loss of fat in the feces, which could explain a lower weight gain than expected in rats HSF, since their caloric intake was higher than other. We observed a greater loss fat in the feces of HSF and NSF animals ($F_{(3,36)} = 6.49$; $p < 0.001$) (Figure 3).

Glycogen synthesis in liver and muscle

Figure 4 shows the effect of diets on hepatic glycogen synthesis, for the direct and indirect pathways. Glycogen synthesis from glucose ($F_{(3,30)} = 5.75$; $P < 0.003$) (Figure 4A) and from alanine ($F_{(3,30)} = 17.23$, $p < 0.001$) (Figure 4B) were higher in HSF and NSF rats. In soleus muscle, glycogen synthesis (Figure 4C) was increased in the NSF rats in relation to the group NSO ($F_{(3,26)} = 3.79$; $P < 0.02$).

Glycogen concentration in liver

In order to evaluate the effect of treatments on liver glycogen content, we measured the glycogen concentration. As shown in figure 5, the rats HSF and NSF had the highest concentrations of glycogen ($F_{(3,23)} = 6.12$; $p < 0.003$). Glucose uptake in soleus muscle showed no differences between the groups (data not shown).

Glucose Tolerance Test and Insulin Tolerance Test

GTT (Figure 6A), was altered in rats HOO who had higher levels after glucose administration when compared to the others. Analysis of the values of AUC showed that group HOO was different from the others ($F_{(3,29)} = 5.38$, $p < 0.005$).

The analysis of the ITT did not show difference between the groups (30, 60 or 120 min) (Figure 6B).

Biochemical parameters

Biochemical parameters are presented in Table 2. We evaluate the effects of diets in total cholesterol (TC) and triacylglycerol (TAG) in plasma and liver. In plasma, HSF rats had higher levels of TC and NSF rats levels smaller ($F_{(3,28)} = 20.24$; $p < 0.001$). The content of TAG was higher in HSF rats and lower in HOO rats when compared with others ($F_{(3,28)} = 22.39$; $p < 0.001$).

In liver, TC content was elevated in all groups receiving high fat diet (HFD), however, the rats of group HOO had the highest values ($F_{(3,28)} = 40.99$ $p < 0.001$). Regarding the content of TAG, was only found to be higher in HOO rats ($F_{(3,28)} = 7.73$, $p < 0.001$).

Paraoxonase 1 (PON1) activity, which is related to High Density Lipoprotein (HDL) cholesterol, was decreased in HSF rats ($F_{(3,23)} = 3.98$, $p < 0.02$).

Discussion

In our study, rats exposed to HFD for 16 weeks had alterations in caloric intake, body fat deposition and some biochemical parameters. The intake of saturated fat ‘*ad libitum*’ increased the daily caloric intake (Figure 1) and deposition of retroperitoneal fat (Table 2). This does not happen with the animals that ate a diet rich in monounsaturated fat. Studies comparing the effects of both fats showed that they have opposite effects on food intake [9,16], body weight [9,16,22], fat deposition [9,16, 22] and metabolic parameters [9,16].

Control of metabolism and food intake occurs partly at the level of the hypothalamus [22,23]. There, saturated and monounsaturated fatty acids triggers responses opposing signaling [24]. In rats, administration of oleic acid in the third

ventricle decreased food intake and inhibited hepatic glucose production. The use of inhibitors of K^+ channels sensitive to ATP (K^+_{ATP}) blocked the effect of oleic acid suggesting that its action occurs via this mechanism[16]. The palmitic acid administered centrally in the hypothalamus caused insulin resistance in the CNS compromising the ability of this hormone in regulating food intake and energy expenditure[7, 9]. Palmitic acid activates a PKC serine-threonine kinases; PKC- θ , so that migrates to the intracellular pool to the surface of the membrane where it interacts with receptors and alter cell signaling, including metabolic alterations and response to food intake[9]. In the present investigation, rats that consumed HFD '*ad libitum*' (HSF and HOO) gained more weight (Figure 2), however, the rats HSF had higher retroperitoneal fat deposition (Table 1). In humans monounsaturated fat was associated with a lower deposition of fat in the abdominal region[25]. Rats NSF did not show excess weight gain, what agree with Woods et al.[26] that demonstrated that association of obesity with high fat diet is due to excessive consumption and not to the diet itself. Due to the higher caloric intake of rats of the group HSF, it was expected a higher body weight gain compared to group NSF[9,12, 26]. However, since rats HSF and NSF had greater loss of lipids in the feces (Figure 3), this might prevented the excessive weight gain of rats HSF, but did not cause malnutrition in rats of the group NSF.

Epidemiological[27] and experimental[9, 28, 29] studies indicated that palmitic acid is related to changes in parameters of insulin response. To verify effects of type of fat on metabolism of glycogen, we evaluated in liver, glycogen synthesis from glucose and alanine and glycogen concentration, and, in soleus muscle, glucose uptake and glycogen synthesis. In liver, glycogen synthesis was increased, from glucose and alanine (gluconeogenesis indirectly) in rats HSF and NSF (Figure 4A and 4B). Duarte et al.[30] using glucose as substrate found similar results in rats with high fat diet and without

insulin resistance. Moreover, the glycogen concentration in liver (Figure 5) was also increased in rats HSF and NSF. A study using HFD for a period of 12 months found a decrease in hepatic glycogen synthesis from glucose [29], however, the animals were insulin resistant (IR). In these states, the hepatic concentration and synthesis of glycogen were reduced[31]. In diabetic patients and in states of IR occur difficulty in stop hepatic glucose production (HGP) with increased gluconeogenesis and glycogen synthesis from alanine[32]. Skeletal muscle represents the major site of peripheral glucose metabolism. Here, IR manifests primarily as a reduction in glycogen synthesis stimulated by insulin. The investigation of glycogen synthesis in soleus muscle from glucose showed that only rats NSF had an increased synthesis as compared with rats HSF and HOO (Figure 4C). In relation to glucose uptake, all rats were equals. Studies using HFD with saturated fat have found a decrease in glucose uptake in muscle[33]. Incubation of this fatty acid in primary cultures of rat skeletal muscle cells with concentrations between 20 and 400 μM for 24 hours caused a decrease in a dose-dependent both on glucose uptake and glycogen synthesis stimulated by insulin even at a concentration of 20 μM [28].

With respect to GTT and ITT, the HOO rats had alteration in GTT with an AUC greater than all the others (Figure 6A and 6B), but, the ITT was normal in these rats. Data from other experimental protocols show that oleic acid improves insulin response[16,34]. These results may indicate changes in insulin secretion and this involves B cell. In these cells chronic exposure to high levels of oleic acid alters insulin secretion in response to stimulation with glucose[35]. Fatty acids promote mitochondrial uncoupling[36], both through UCP-dependent and UCP-independent. Increased expression of UCP decreases the ratio ATP:ADP by uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation, thereby decreasing insulin secretion stimulated by glucose without changes in glucose

metabolism[37]. If this increased AUC in GTT in HOO rats is due decreased insulin secretion UCP-mediated or decreased expression gene associated with stimulated insulin secretion as verified by Pinnich et al.[38] is actually under investigation.

There is a relationship between high intake of saturated fat with CVD[39], increased plasma levels TC, TAG and LDL and decreased HDL[40]. On the other hand, are well-established beneficial effects of a diet rich in olive oil in reducing CVD[15] and positive changes in lipid profile[34]. Our results indicate that plasma quality and quantity of fat influence the lipid profile. Rats HSF had high levels of TC and TAG, the same did not happen with the rats NSF and HOO. In liver, TC and TAG concentrations were high in all groups consuming HFD (HSF, HOO, NSF), however, were higher in group HOO.

The effects of olive oil in reducing plasma lipid levels are well documented in the literature[34], however, we found no studies evaluating the effect of this type of fat in tissues. HepG2 cells showed higher TAG accumulation when treated for 6h with oleate or palmitate with the same period of time, but no increased deposition of TAG[41].

This could explain the increased liver TAG in rats of the group HOO. PON1 is an antioxidant enzyme associated with HDL and its activity is inversely related to risk of CVD[42]. Determination of serum PON1 revealed a decrease in rats HSF compared to the others, and these animals also had hypercholesterolemia.

In summary, the present study suggest that consumption of diets with moderate levels of fat acid, both saturated or monounsaturated, provokes negative effects on metabolism. Saturated fat when '*ad libitum*' changed significantly caloric intake, fat deposition, hepatic glycogen synthesis and plasma lipid profile. But, diet with monounsaturated fat also showed negative effects in TC and TAG content in liver and in AUC of the TTG.

Funding

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), IBN-NET.

References

- 1 Perichart-Perera O, Balas-Nakash M, Rodriguez-Cano A, et al. Correlates of Dietary Energy Sources with Cardiovascular Disease Risk Markers in Mexican School-Age Children. *J Am Diet Assoc* 2010; 110(2): 253-260
- 2 WHO - World Health Organization: Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases. *FAO/WHO Technical Report* 2003; 916
- 3 Allison DB, Fontaine KR, Manson JA, *et al.* Annual deaths attributable to obesity in the US. *JAMA* 1999; 282(16):1530-38
- 4 Must A, Spadano J, Coakley EH, et al. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; 282(16):1523-9
- 5 WHO - World Health Organization: Obesity – preventing and managing the global epidemic. Geneva: *FAO/WHO Technical Report*; 1999; 894
- 6 Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine* 2006; 12(1): 75-80
- 7 Morentin PBM, Varela L, Ferno J, et al. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1801(3):350-361
- 8 Stein CJ and Colditz GA. The Epidemic of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2522-25

- 9 Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* 2009; 119(9): 2577-89
- 10 ADA - American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 27 (suppl 1) S5-S10
- 11 McGarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type diabetes. *Diabetes* 2002; 51(1):7-18
- 12 Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, et al. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiology & Behavior* 2004; 83(4):573-78
- 13 Simopoulos A. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 70(suppl3):560-69
- 14 Tremblay AJ, Després JP, Piché ME, et al. Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation and components of the insulin resistance syndrome. *Metabolism* 2004; 53(3):310-7
- 15 Perez-Gimenez F, Alvarez de CF, Badimon L, et al. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 2004; 35(7):421-4
- 16 Obici S, Feng Z, Morgan K, et al. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 2002; 51(2):271-5
- 17 Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol* 1959; 37(8):911-7
- 18 Bolayirli IM, Aslan M, Balci H, et al. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. *Life Sci* 2007 ; 81(2):121-7

- 19 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75
- 20 Dolnikoff M, Martín-Hidalgo A, Machado UF, *et al.* Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes Rel Metab Dis* 2001; 25(3):426-33
- 21 Krisman CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical Biochemistry* 1962, 4(1):17-23
- 22 Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, *et al.* Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998. 280(5368):1378-83
- 23 Schwartz MW, Woods SC, Porte D JR, *et al.* Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404(6778):661-71
- 24 Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000; 288(5475):2379-81
- 25 Panigua JA, de La Sacristana AG, Romero I, *et al.* Monounsaturated Fat Rich Diet Prevents Central Body Fat Distribution and Decreases Postprandial Adiponectin Expression Induced by a Carbohydrate-Rich Diet in Insulin-Resistant Subjects. *Diabetes Care* 2007; 30(7):1717-23
- 26 Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, *et al.*; A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutrition* 2003; 133(4):1081-87
- 27 Marshall JA, Hamman RF, Baxter J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol* 1991; 134(6):590-603

- 28 Hirabara SM, Curi R, Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J Cel Physiol* 2010; 222(1):187-94
- 29 De Assis AM, Rieger DK, Longoni A. High Fat and Highly Thermolyzed Fat Diets Promote Insulin Resistance and Increase DNA Damage in Rats. *Ex Biol Med* 2009; 234(11):1296-304
- 30 Duarte ACGO, Fonseca DF, Manzoni MSJ, et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev Nutr* 2006; 19(3):341-8
- 31 Gannon MC, Nuttall FQ. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein and mRNA in rats. *Diabetologia* 1997; 40(7):758-63
- 32 DeFronzo RA. Banting Lecture. From triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009; 58(4):773-95
- 33 Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997; 46(11):1768-74.
- 34 Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11(2):458-79
- 35 Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet, F. Uncoupling Protein 2: A Possible Link Between Fatty Acid Excess and Impaired Glucose-Induced Insulin Secretion?. *Diabetes* 2001; 50(4):803-9
- 36 Skulachev VP. Uncoupling: New approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1363(2):100–124
- 37 Klingenberg M, Huang SG. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1415(2):271–96

- 38 Pinnick K, Neville M, Clark A, Fielding B. Reversibility of Metabolic and Morphological Changes Associated With Chronic Exposure of Pancreatic Islet b-Cells to Fatty Acids. *J Cell Biochem.* 2010; 109(4):683-92
- 39 Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, et al. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. *Circulation* 1993; 88(6):2771-9
- 40 LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D, et al. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 1990; 81(5):1721-33
- 41 Lee J, Cho HK, Kwon YH. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism* 2010; 59(7):927-34
42. Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(3):261-7

Table 1: Body weight, adipose tissues weight and soleus muscle weight of rats fed different diets.

Data are mean \pm SD for 17-18 animals per group. a $P < 0,001$

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Body, adipose tissues and

soleus muscle weight (g)	NSO	HOO	HSF	NSF
Initial body weight 2 m old	254,5 \pm 29,3	249,1 \pm 18,5	248,8 \pm 19,0	248,1 \pm 20,5
Final body weight 6 m old	355,9 \pm 29,0	388,1 \pm 31,4	408,1 ^a \pm 32,7	344,8 \pm 21,3
Body weight gain	101,3 \pm 18,2	139,0 ^b \pm 31,5	159,3 ^a \pm 21,4	96,7 \pm 21,5
Retroperitoneal adipose tissue	6,6 \pm 1,6	8,9 \pm 2,9	11,5 ^a \pm 2,4	7,4 \pm 2,2
Epididymal adipose tissue	8,4 \pm 2,7	9,3 \pm 2,4	8,2 \pm 2,6	7,2 \pm 2,0
Total adipose	15,0 \pm 3,7	18,2 ^a \pm 4,9	19,7 ^a \pm 4,2	14,6 \pm 4,1
Soleus muscle	120,0 \pm 4,1	130,4 \pm 8,2	131,3 \pm 2,6	112,8 \pm 5,1

Table 2: Biochemical parameters of the animals fed different diets

Data are mean \pm SD for 9 animals per group. *P<0.05 different from the others; a

P<0,001;b P<0,001

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

	NSO	HOO	HSF	NSF
Cholesterol (mg/dL)	90,3 \pm 9,8	100,1 \pm 11,9	115,9* \pm 11,5	78,6 \pm 7,0
Cholesterol (mg/100 mg of liver)	0,29 \pm 0,03	0,43 ^a \pm 0,04	0,34 ^b \pm 0,02	0,32 ^b \pm 0,02
Triglycerides (mg/dL)	153,7 \pm 31,7	97,9 \pm 18,2	210,2* \pm 30,0	126,0 \pm 32,2
Triglycerides (mg/100 mg of liver)	2,4 \pm 0,36	3,9* \pm 1,0	2,7 \pm 0,6	2,4 \pm 0,70
Non-esterified fatty acids (mg/dL)	591,6 \pm 205,0	454,7 \pm 53,6	621,09 \pm 156,6	485,0 \pm 67,6
Glucose (mg/dL)	111,0 \pm 2,7	104,0 \pm 4,4	104,0 \pm 0,9	110,0 \pm 3,6
Paroxonase I activity (U / mL)	228,0 \pm 21,4	230,5 \pm 56,9	166,4* \pm 35,3	219,5 \pm 27,3

Legends

Figure 1: Average weekly caloric consumption

Data are mean \pm SD for 17-18 animals per group. Consumption of animals from group saturated was significantly higher than the other groups (Repeated measure analysis of variance, days x groups interaction ($F_{(45,720)} = 1.78$, $p < 0.05$).

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Figure 2: Average weekly body weight

Data are mean \pm SD for 17-18 animals per group. Body weight of animals from groups saturated and olive are significantly higher than the other groups (Repeated measure analysis of variance, week x groups interaction ($F_{(3, 58)} = 16.32$, $p < 0.01$).

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Figure 3: Loss of lipids in the feces

Data are mean \pm SD for 8 animals per group. Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Tukey test.

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Figure 4: Glycogen synthesis in liver from D[U-¹⁴C]Glucose (A), in liver from [U-¹⁴C]alanine (B) and in soleus from D[U-¹⁴C]Glucose (C) in rats after 16 weeks of different nutritional treatments.

Data are mean \pm SD for 9 animals per group and are expressed as pmol of glucose (A and C) or alanine (B) incorporated in glycogen per mg of tissue per h. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) (Tukey test)

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Figure 5: Hepatic glycogen concentration.

Data are mean \pm SD for 9-10 animals per group and are expressed as mg of glycogen/100 mg of tissue. Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Tukey HSD multiple range test

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Figure 6: Glucose Tolerance Test (A) and Insulin Tolerance Test (B) in rats after 16 weeks of different nutritional treatments.

Data are mean \pm SD for 8 animals per group and are expressed as mg/dL of glucose.

Normocaloric Soy Oil (NSO) = normocaloric diet predominantly with soy oil; hipercaloric olive oil (HOO) = high fat hypercaloric diet predominantly with olive oil; hipercaloric saturated fat (HSF) = high fat hypercaloric diet predominantly with palmitic, myristic and stearic acids; normocaloric saturated fat (NSF) = saturated diet with normocaloric ingestion.

Figure 1

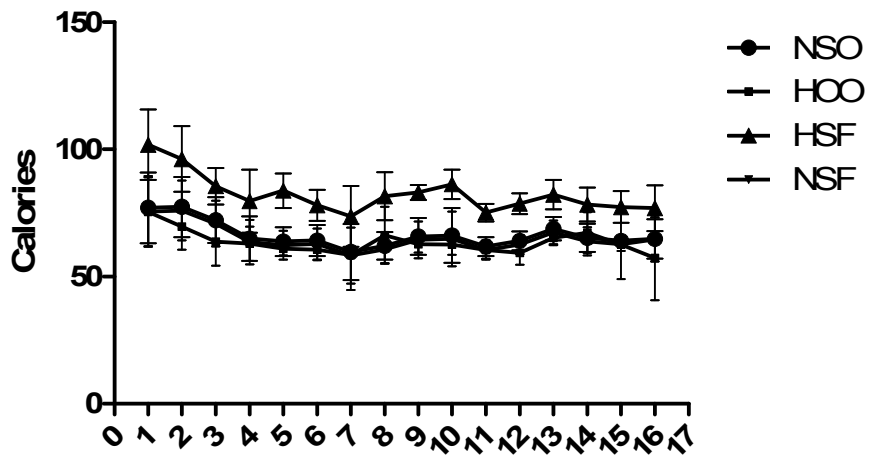


Figure 2

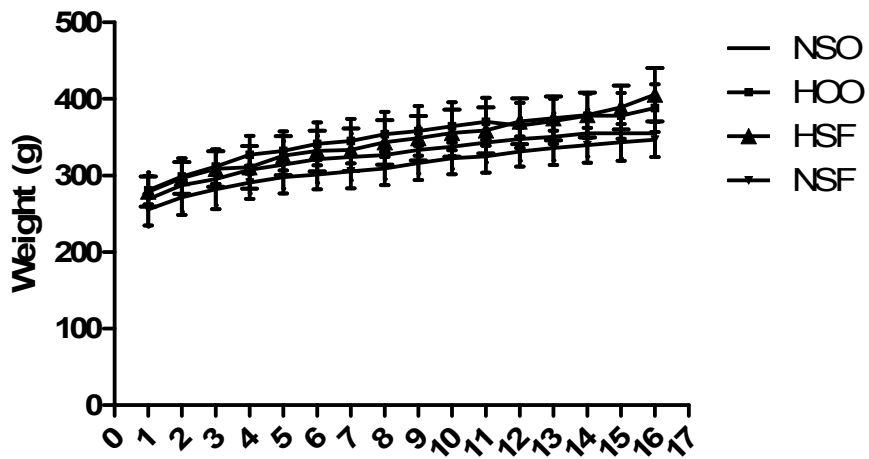


Figure 3

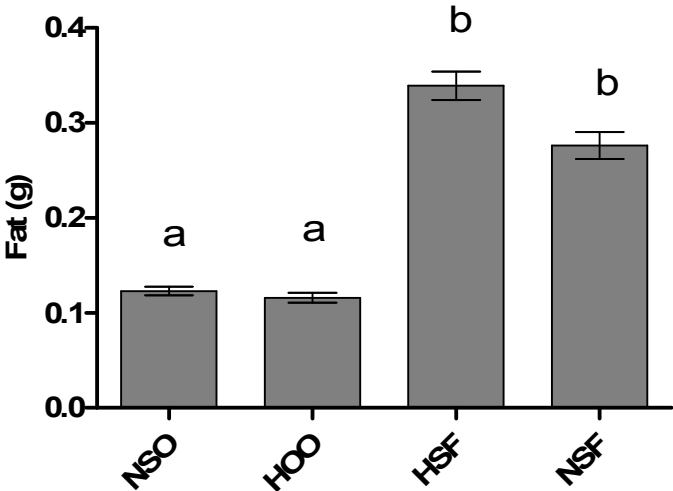


Figure 4

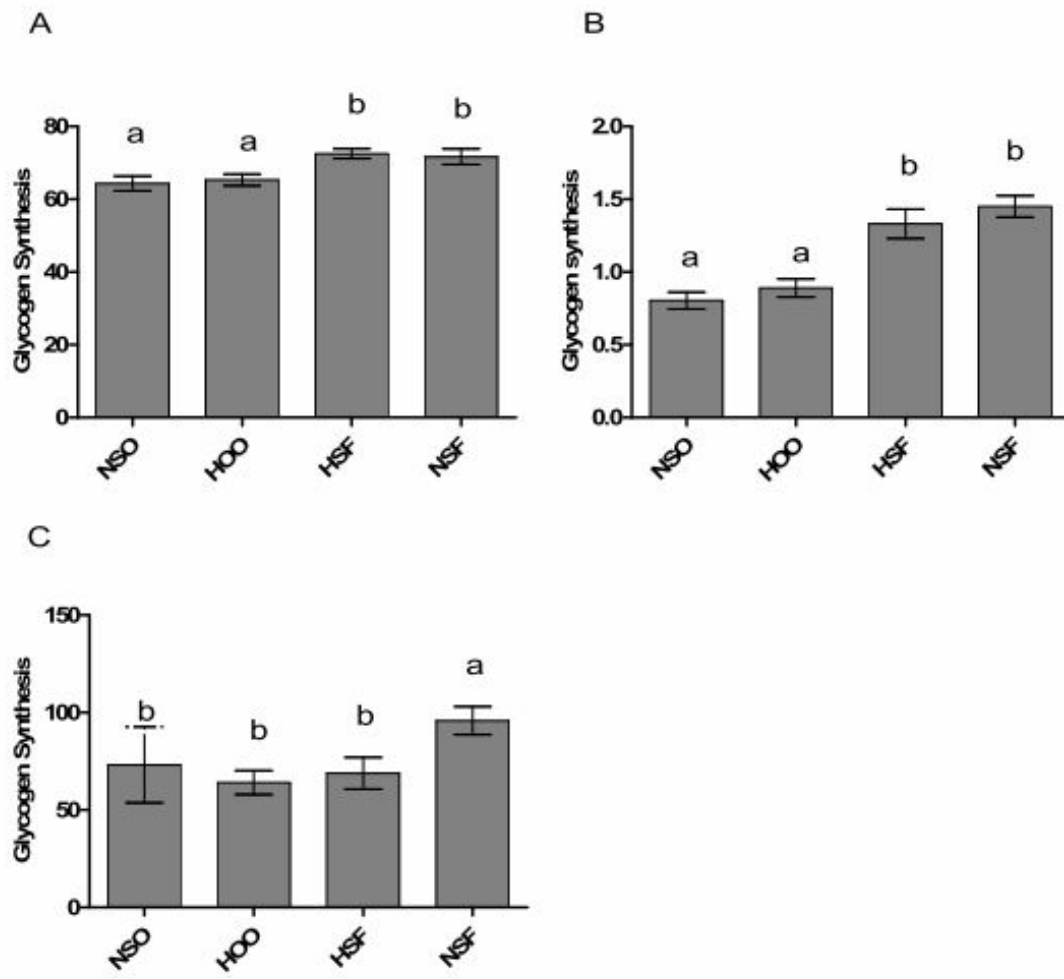


Figure 5

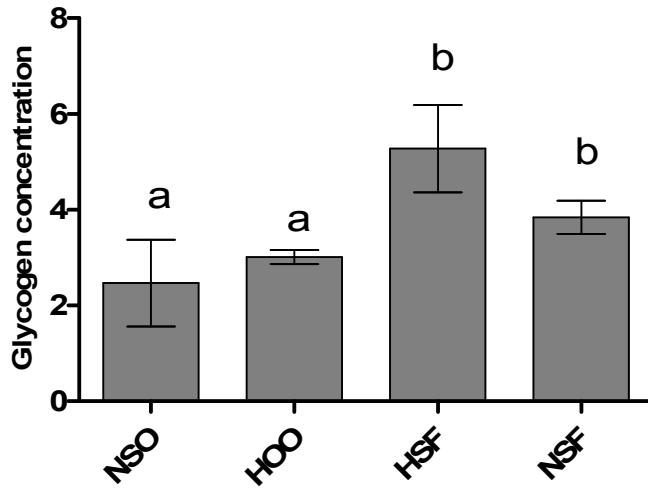
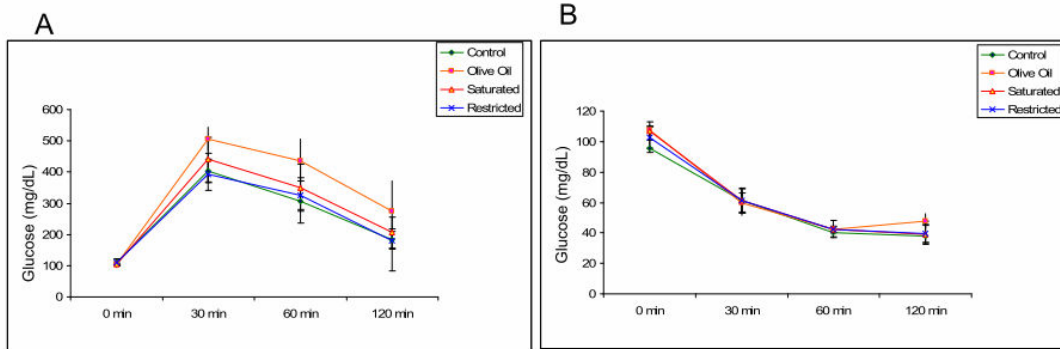


Figure 6



PARTE III

4. Discussão

Em países industrializados a ingestão de gordura é elevada, podendo alcançar até 40% do total das calorias diárias. Grande parte da gordura ingerida é saturada presente em produtos de origem animal (HU & WILLETT, 2002). Nos países da região do Mediterrâneo e partes da Ásia, de onde a oliveira, '*Olea europaea*' é nativa, o consumo do óleo de oliva, rico em gordura monoinsaturada é a principal fonte de gordura da dieta que contém cerca de 29% de lipídeos e destes, 78% vem do óleo de oliva (WATERMAN et al, 2007). A "*Dieta Mediterrânea*" é relacionada com baixos níveis de doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas (CICERALE et al, 2010; WATERMAN et al, 2007).

A obesidade tem crescido de maneira alarmante e é hoje considerada 'pandemia', principalmente naqueles países industrializados cujos valores percentuais de gordura da dieta são elevados. Curiosamente, isto não ocorre nos países que consomem a "*Dieta Mediterrânea*' (CICERALE et al, 2010).

O controle do metabolismo, ingestão alimentar e peso corporal ocorre parcialmente no núcleo hipotálamico (WOODS et al, 1998; SCHWARTZ et al, 2000). Ali sinais centrais e periféricos refletem a disponibilidade de energia (BENOIT et al, 2009). Insulina e leptina no hipotálamo estimulam a síntese de peptídeos anorexígenos e modulam os peptídeos orexígenos, diminuindo a ingestão alimentar (BENOIT et al, 2009; MORENTIN et al, 2009).

Além disto, lipídeos no SNC modulam vias metabólicas (LOFTUS et al, 2000). No hipotálamo ácidos graxos saturados e moninsaturados estimulam respostas de sinalização opostas.

Em ratos, administração do ácido oléico no terceiro ventrículo hipotalâmico diminuiu a ingestão alimentar e inibiu a produção hepática de glicose (HGP) por meio do bloqueio de canais de K^+ sensíveis a ATP (K^+_{ATP}) (OBICI et al, 2002). Já a administração de ácido palmítico centralmente provocou resistência à insulina no SNC conduzindo à obesidade (BENOIT et al, 2009; MORENTIN et al, 2009). O ácido palmítico ativa a PKC- θ , uma PKC serina-treonina cinases, que migra do *pool* intracelular para a superfície interna da membrana tornando-se ativa e modificando sinalização celular especialmente às de resposta à insulina no SNC (Benoit et al, 2009).

Em nosso protocolo experimental, o consumo de dieta rica em gordura saturada '*ad libitum*' aumentou o consumo calórico diário (Figura 1) e a quantidade de gordura retroperitoneal (Tabela 1), o mesmo não aconteceu com os animais que comeram dieta hiperlipídica com óleo de oliva (Figura 1). Estudos comprando os efeitos de ambas as gorduras mostram que elas possuem efeitos opostos sobre o consumo alimentar (OBICI et al, 2002; Benoit et al, 2009), peso corporal (OBICI et al, 2002; Benoit et al, 2009; WOODS et al, 1998), deposição de gordura (OBICI et al, 2002; Benoit et al, 2009; WOODS et al, 1998; PANIGUA et al, 2007) e parâmetros metabólicos (OBICI et al, 2002; Benoit et al, 2009).

Devido ao consumo maior dos animais do grupo HGS era esperado um ganho maior destes animais em relação ao grupo NOS (Benoit et al, 2009; WOODS et al, 2003; WOODS et al, 2004) decidimos então, investigar uma possível perda de gordura nas fezes, que foi confirmada. Os grupos HGS e NGS apresentaram maior perda lipídica nas fezes (Figura 3). Apesar disto os

animais do grupo NGS não apresentavam sinais de desnutrição, isto é, perda de peso.

A avaliação da síntese de glicogênio hepático mostrou-se aumentada nos grupos que comeram a dieta com gordura saturada (HGS e NGS), tanto a partir de glicose (via direta) quanto a partir de alanina (via indireta). Duarte *et al.* (2006) utilizando animais sem resistência à insulina e com dieta hiperlipídica encontraram resultados similares utilizando glicose como substrato. Em nosso grupo de pesquisa utilizando dietas hiperlipídicas e/ou hiperpalatáveis por períodos de 3*, 4* e 12 meses de tratamento, observou-se diminuição na concentração e/ou na síntese de glicogênio a partir de glicose nos animais que comiam dietas as hiperlipídicas e/ou hiperpalatáveis, (De Assis et al, 2009; *dados não publicados), todavia, os animais eram resistentes à insulina. Na RI e no DMII, a concentração e síntese hepática de glicogênio podem estar diminuídas (GANNON & NUTTAL, 1997).

Em períodos de jejum, em estados de resistência hepática à insulina a gliconeogênese encontra-se aumentada (BROWLEE et al, 2005). Em diabéticos a supressão da produção hepática de glicose (HGP) é prejudicada e a síntese de glicogênio a partir de alanina aumentada.

O músculo esquelético representa o principal local de metabolismo periférico da glicose. Ali, a RI manifesta-se primariamente como uma redução na síntese de glicogênio estimulada por insulina, conseqüência do transporte reduzido de glicose. A investigação da síntese de glicogênio em sóleo a partir glicose, mostrou que apenas o grupo NGS tinha uma síntese aumentada em relação ao grupo HOO. Na captação de glicose, não encontramos diferenças entre os grupos. A exposição, durante 16 semanas de dieta aos diferentes

ácidos graxos não alterou o metabolismo muscular em resposta à glicose, embora outros estudos utilizando dietas hiperlipídicas com gordura saturada tenham encontrado diminuição na captação de glicose no músculo (OAKES et al, 1997; TREMBLAY et al, 2001). Hirabara et al. (2010) avaliaram os efeitos do ácido palmítico em cultura de células musculares esqueléticas de ratos com diferentes concentrações (20, 100, 200 ou 400 μM) por 24 horas e observaram que palmítico diminuía de maneira dose-dependente tanto a captação de glicose quanto a síntese de glicogênio estimulados por insulina mesmo na concentração de 20 μM .

Para avaliar a resposta fisiológica dos ratos e as respectivas dietas à glicose ou insulina, foi realizado GTT e ITT. O grupo HOO apresentou GTT alterado, com uma área sob a curva (AUC) maior do que os outros 3 grupos mas a resposta ao ITT foi igual nos 4 grupos. Dados de outros protocolos experimentais mostram que ácido oléico melhora a resposta da insulina (CICERALE, LUCAS e KEAST, 2010; PEREZ-JIMENEZ et al, 2005). Embora estudos epidemiológicos (MARSHALL, HAMMAN & BAXTER, 1991) e experimentais (HIRABARA et al, 2010; ITANI et al, 2002; de Assis et al, 2009, BENOIT et al, 2009) relacionem o ácido graxo palmítico com alterações em parâmetros de resposta à insulina e DMTII, em nosso protocolo experimental não encontramos sinais de resistência à insulina nos grupos HGS e NGS. A maior área sob a curva encontrada nos animais do grupo HOO pode indicar uma secreção diminuída de glicose pelas células β -pancreática. Em estudos *in vitro* com célula INS, a exposição crônica ao ácido oléico alterou a secreção de insulina em resposta a estimulação com glicose (LAMELOISE et al, 2001)

Ácidos graxos promovem desacoplamento mitocondrial, tanto por meio UCP-

dependente quanto UCP-independente (SKULACHEV, 1998). Aumento da expressão de UCP diminui a razão ATP:ADP por meio de desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, desta forma, diminuindo a secreção de insulina estimulada por glicose sem alterações no metabolismo da glicose.

UCP-1 foi descoberta em 1976 (RICQUIER & KADER, 1976) em tecido adiposo marrom, depois outras UCPs foram sendo identificadas tais como UCP-2 expressada em vários tecidos como músculo, fígado, pâncreas, tecido adiposo, leucócitos, rins e neurônios e UCP-3 expressa predominantemente em coração e músculo esquelético e UCP-4 e 5 no cérebro (BOSS et al, 1997; GIMENO et al, 1997; SANCHIS et al, 1998; MAO et al, 1999; LAMELOISE et al, 2001).

Ácidos graxos ou gordura dietética aumentam mRNA da UCP-2 em vários tecidos (BOSS e cols, 1998; FLEURY et al, 1998)

Em músculo esquelético, exposição à longo prazo à FFA estimulam UCPs que, quando ativadas catalisam o transporte de prótons através da membrana interna da mitocôndria, dissipando o gradiente de prótons e diminuindo a síntese de ATP levando à produção de calor (KLINGENBERG & HUANG, 1999). Se esta aumentada AUC no TTG nos ratos HOO é devido à diminuída secreção de insulina mediada por UCP ou diminuída expressão de genes associados com o estímulo de secreção da insulina como verificado por Pinnich et al. (2010) precisa ainda ser investigado.

É bem estabelecido na literatura científica que desordens no metabolismo lipídico são determinantes de aterosclerose, dados epidemiológicos relacionam a ingestão elevada de colesterol e gordura saturada com doenças cardiovasculares (ARTRAUD-WILD et al, 1993). Dietas

com elevados teores de gordura saturada tem sido denominadas como 'dietas aterogênicas', cuja principal característica é a elevação plasmática de colesterol, TAG, LDL-colesterol somados à diminuição do HDL-colesterol (RAVNSKOV, 1998) por outro lado, vários estudos epidemiológicos desenvolvidos em diferentes países mostram os efeitos benéficos da '*Dieta Mediterrânea*', que é rica em azeite de oliva, na redução de doença cardiovascular (PEREZ-JIMENEZ et al, 2005) modificações positivas no perfil lipídico, pressão sanguínea, metabolismo da glicose, perfil antitrombótico, função endotelial, inflamação e estresse oxidativo, além de reduzir o risco de certos tipos de câncer (WATERMAN et al, 2007; PEREZ-JIMENEZ et al, 2005), A avaliação do perfil lipídico, plasmático e tecidual (fígado) indicou que, não somente a qualidade da gordura, mas também a quantidade, ambas influenciam no perfil de lipídeos. Consumo da dieta com gordura saturada '*ad libitum*' elevou níveis de colesterol plasmático e TAG, o mesmo não aconteceu quando os animais tinham o consumo calórico controlado, além disto, as concentrações de TAG e colesterol em fígado mostraram-se elevados em todos os grupos que consumiam dietas hiperlipídicas, porém, estavam maiores no grupo HOO. É bem documentado na literatura os efeitos do azeite de oliva na redução dos níveis de lipídeos plasmáticos (PEREZ-JIMENEZ et al, 2005), bem como os efeitos da gordura saturada em elevar os níveis destes, especialmente colesterol total e partículas LDL (STEINBERG et al, 1997). Segundo McGarry (2002) diabéticos e obesos geralmente apresentam aumento da concentração intracelular de TAG no fígado e no músculo o que se correlaciona proporcionalmente com a presença de resistência à insulina nestes tecidos. Em células HepG2, Lee, Cho e Kwon (2009) encontraram um

maior acúmulo de TAG quando tratadas por 6h com oleato, o tratamento com palmitato pelo mesmo período de tempo não aumentou deposição de TAG, mas sim de diacilglicerol (DAG). Isto poderia explicar esse aumento hepático de TAG nos animais do grupo HOO.

Paroxonase1 (PON1) é uma lactonase/esterase antioxidante associada ao HDL e sua atividade é inversamente relacionada ao risco de doença cardiovascular (GETZ & REARDON, 2004; MACKNESS, DURRINGTON & MACKNESS, 2000). PON1 catalisa a hidrólise de ácidos graxos oxidados de fosfolípidos e previne o acúmulo de lipídeos oxidados em lipoproteínas, especialmente o LDL (CHO, 2009). O resultado da dosagem da PON1 em soro revelou diminuição no grupo HGS em relação aos outros grupos, estes animais também apresentaram hipercolesterolemia quando comparados com os outros grupos, Rosenblat, Karry e Aviram (2006) avaliando atividade da PON1 em soro de pacientes diabéticos ou hipercolesterolêmicos, encontraram diminuição de 46% na atividade da PON1 em nos diabéticos quando comparados com controle, e de 37% em pacientes hipercolesterolêmicos também comparados aos controles. Esse resultado indica de que consumo excessivo de dieta rica em gordura saturada aumenta o risco de doença cardiovascular.

5. Conclusões

Em resumo, os animais que consumiam dieta rica em gordura saturada '*ad libitum*' comiam mais e animais que consumiam dieta rica em óleo de oliva menos calorias diárias.

Ao final das 16 semanas, o peso corporal dos animais dos grupos com dietas hiperlipídicas '*ad libitum*' foi maior do que os outros, porém, a deposição de

gordura retroperitoneal foi maior naqueles que ingeriam a dieta com gordura saturada '*ad libitum*'.

A concentração de glicogênio hepático foi maior os animais que consumiam a dieta com gordura saturada, '*ad libitum*' e normocalórica com relação aos outros grupos.

A síntese de glicogênio em fígado mostrou-se aumentada, tanto a partir de glicose (via direta) quanto a partir de alanina (via indireta) nos animais que consumiram a dieta com gordura saturada '*ad libitum*' e normocalórica.

Em sóleo a síntese só estava aumentada nos animais que tinham dieta com gordura saturada e normocalórica.

Não houve diferenças na captação de glicose em sóleo.

Em plasma, observamos que não somente a qualidade da gordura ingerida, mas também a quantidade pode afetar o perfil lipídico, animais que ingeriam a dieta com gordura saturada e normocalórica não apresentaram alterações, já aqueles que comeram '*ad libitum*' apresentaram alterações negativas no perfil lipídico. Os animais que ingeriam dieta com óleo de oliva não apresentaram alterações no perfil lipídico plasmático.

O perfil lipídico tecidual (fígado) mostrou-se alterado em todas as dietas hiperlipídicas, todos os grupos tinham valores maiores que o grupo controle, e os maiores valores encontrados foram do grupo que consumia óleo de oliva.

Analisando o consumo calórico diário ao longo do tratamento, observamos que o tipo de gordura ingerida (mono *versus* saturada) pode afetar a resposta metabólica de saciedade, animais que consumiam a gordura monoinsaturada sempre ingeriam menos calorias diárias mesmo com livre acesso à comida.

O GTT mostrou-se alterado, com uma AUC maior no grupo que consumia dieta com óleo de oliva, não observamos alterações no ITT.

6. Perspectivas

- Repetir o protocolo experimental utilizando com fonte de gordura saturada manteiga animal e acrescentando um grupo com óleo de oliva extra-virgem;
- Verificar possíveis efeitos destas dietas sobre vias de sinalização da insulina em hipotálamo;
- Verificar efeitos destas dietas sobre vias de sinalização da insulina em músculo sóleo;
- Verificar parâmetros de estresse oxidativo em fígado, rins e sistema nervoso central;
- Verificar parâmetros de resistência à insulina tais como imunoreatividade da insulina e HOMA;
- Verificar proteínas hepáticas para tentar entender o mecanismo pelo qual o óleo de oliva aumentou a concentração hepática de colesterol e TAG;

7. Referências Bibliográficas

ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v.27 (suppl 1) S5-S10

ALLISON, DB; *et al.* Annual deaths attributable to obesity in the US. **JAMA.** New York, vol. 282, n.16, p.1530-38, out.1999.

ARTAUD-WILD, S.M.; CONNOR, S.L.; SEXTON, G. *et al.* Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. **Circulation.** v.88, n.6, p.2771-9, 1993.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.** v.336, n.15, p.1066-71, abr 1997.

BENOIT, S.C.; KEMP, C.J.; ELIAS, C.F. *et al.* Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. **J Clin Invest.** v.119, n.9, p.2577-89, Set 2009.

BLIGH, E.G. and DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can.J.Biochem.Physiol.** v.37, n.8, p.911-7, 1959.

BLUNDELL, J.E. & COOLING, J.; High-fat and low-fat (behavioural) phenotypes: biology or environment?. **Proc Nutr Soc.** v.58, n.4, p.773-7, nov.1999.

BOLAYIRLI, I.M. ; ASLAN, M. ; BALCI, H. *et al.* Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. **Life Sci.** v.81, n.2, p.121-7, 2007.

BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett.** v. 408, n.1, p.39-42, 1997.

BOSS, O.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. The uncoupling proteins: a review.
Eur J Endocrinol, v.139, p.1–9, 1998

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetes. Unifying mechanism. **Diabetes**.
v.54, n.6, p.1615-25, jun 2005.

CICERALE, S.; LUCAS, L.; KEAST, R. Biological Activities of Phenolic
Compounds Present in Virgin Olive Oil. **Int. J. Mol. Sci.** v.11, n.2, p.458-479,
fev 2010.

COLDITZ G.A.; WILLET W.C.; ROTNITZKY, A. *et al.*; Weight gain as a risk
factor for clinical diabetes mellitus in women. **Ann Intern Med.** v.122, n.7, p.
481-486, abr 1995.

DE ASSIS, A.M.; RIEGER, D.K. LONGONI, A. High Fat and Highly
Thermolyzed Fat Diets Promote Insulin Resistance and Increase DNA Damage
in Rats. **Ex Biol Med.** v.234, n.11, p.1296:304, 2009.

DeFRONZO, R.A., JACOT, E. JEQUIER, E. *et al.* The effect of insulin on the
disposal of intravenous glucose. Results from in direct calorimetry and hepatic
and femoral venous catheterization. **Diabetes**. v.30, n.12, p.1000-07. dez 1981.

DEFRONZO, R.A. Banting Lecture. From triumvirate to the ominous octet: a
new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**. v.58, n.4,
p.773-95, abr 2009.

DESPRÉS J.P., LEMIEUX I. Abdominal obesity and metabolic syndrome.
Nature. v.444, n.7121, p.881-87, dez 2006.

DOLNIKOFF, M.; MARTÍN-HIDALGO, A.; MACHADO, U.F. *et al.* Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Int J Obes Rel Metab Dis.** v.25, n.3, p.:426-33, 2001.

DROGÉ, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** v.82,n.1, pp.47-95, jan 2002.

DU, X.L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETI, L. *et al.*; Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxido overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **PROC Natl Acad Sci.** v.97, n.22, p. 12222-6, out 2000.

DU, X.L., MATSUMURA, T.; EDELSTEIN D. *et al.* Inhibition of GAPDH activity by (ADP-ribose)polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. **J Clin Invest.** v.112, n.7, p.1049-57, out 2003.

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J. *et al.* Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev Nutr.** v.19, n.3, p.341-8, 2006.

ECKEL, RH; KRAUSS, RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. **Circulation.** Dallas, v.97, p. 2099-100, 1998.

FERRANTE, A.W. Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **J Intern Med.** v.262, n.4, p.408-14, out 2007.

FLEGAL, K.M.; CARROLL, M.D.; KUCZMARSKI J. *et al.* Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960 – 1994. **Int J. Ob.**v. 22, p.39-47, 1998.

FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M.F.; SURWIT, R.S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C.H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat Genet.** v.15, p.269 –72, 1997

FOLMES, C.D.; LOPASCHUK, G.D. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. **Cardiovasc Res.** v.73, n.2, p.278-87, out 2007.

GANNON, M. C.; NUTTALL, F. Q. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein and mRNA in rats. **Diabetologia.** v.40, n.7, p.758-63, jul 1997.

GETZ, G.S.; REARDON, C.A. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. **Curr Opin Lipidol.** v.15, n.3, p.261-7, 2004.

GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; SHYJAN, A.W.; GIMENO, C.J.; IRIS, F.; ELLIS, S.J.; WOOLF, E.A.; TARTAGLIA, L.A. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: A potential molecular mediator of human thermogenesis. **Diabetes.** v.46, n.5, p.900–06, 1997.

GINTER, E.; SIMKO, V. Diabetes type 2 pandemic in 21st century. **Bratisl Lek Listy.** v.111, n.3, p.134-7, 2010.

GRIFFIN, M.E.; MARCUCCI, M.J.; CLINE, G.W. *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes** v.48, n.6, p.1270-74, jun 1999.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals In Biology And Medicine. 4.ed. New York, 2007, 851p.

HEGARTY, BD; FURLER, S.M. YE, J. *et al.* The role of intramuscular lipid in insuline resistance. **Acta Physiol Scand.** v.178, n.4, p.373-83, ag 2003.

HIRABARA, S.M; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. **J Cel Physiol.** v.222, n.1, p.187-194, 2010

HU, FB; WILLETT, WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. **JAMA.** v.288, n.20, p.2569-78, nov 2002

HUNTER, J.E.; KRIS-ETHERTON, PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. **Am J Clin Nutr.** v.91 n.1, p.46-63, jan.2010 doi: 10.3945/ajcn.2009.27661.

IBGE, Instituto Brasileiro de geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares - 2002-2003: Análise da Disponibilidade Domiciliar de alimentos e do estado Nutricional no Brasil. 2004. Disponível em "<http://www.ibge.gov.br>" em: 12/08/2010.

ITANI, S.I.; RUDERMAN, N.B.; SCHMIEDER, F. *et al.* Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and I κ B- α . **Diabetes.** v.51, n.7, p. 2005-11, jul 2002

JIANG, G; ZHANG B.B.; Modulation of insulin signalling by insulin sensitizers. **Biochemical Society Transactions.** v.33, pt.2, p. 358-61, abr 2005.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology.** v.149, n.1, p.43-50, 2000.

KLINGENBERG, M.; HUANG, S.G. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. **Biochim Biophys Acta.** v.1415, n.2, p.271–96, 1999.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**. v.4, n.1, p.17-23, 1962.

LAFONTAN, M; LANGIN, D; Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Prog Lipid Res**. v.48, n.5, p.275-297, mai 2009.

LAMELOISE, N.; MUZZIN, P.; PRENTKI, M.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. Uncoupling Protein 2: A Possible Link Between Fatty Acid Excess and Impaired Glucose-Induced Insulin Secretion? **Diabetes**. v.50, n.4, p.803-9, abr 2001

LaROSA, J.C.; HUNNINGHAKE, D.; BUSH, D. et al. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. **Circulation**. v.81, n.5, p.1721-33, 1990.

LEE, J.; CHO, H.K.; KWON, Y.H. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. **Metabolism**. v.59, n.7, p.927-34, 2010.

LOFTUS TM, JAWORSKY DE, FREHYWOT GL, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. **Science**. v.288, n.5475, p.2379-81, jun 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v.193, p.265-75, 1951.

McGARRY, J.D. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.1, p.7-18, jan 2002.

McGARRY, J.D. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.1, p.7-18, jan 2002.

MACHOWETZ, A.; POULSEN, H.E.; GRUENDELS. *et al.* Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. **FASEB J.** v.21, n.1, p. 45-52, nov 2007.

MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. **Curr Opin Lipidol.** v. 11, p. 383-88, 2000.

MAO, W.; YU, X.X.; ZHONG, A.; LI, W.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. **FEBS Lett.** v.443, n.3, p.326–30, 1999.

MARSHALL, J.A., HAMMAN, R.F., BAXTER, J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. **Am J Epidemiol.** v.34, n.6, p.590–603, 1991.

MAYER, C.M; BELSHAM, D.D. Central Insulin Signaling Is Attenuated by Long-Term Insulin Exposure via Insulin Receptor Substrate-1 Serine Phosphorylation, Proteasomal Degradation, and Lysosomal Insulin Receptor Degradation. **Endocrinology.** v.151, n.1, p.75-84, jan 2010.

MORENTIN, P.B.M. de; VARELA, L.; FERNO, J. *et al.* Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1801, n.3, p.350-61, 2009.

MUST, A.; SPADANO, J. COAKLEY, E.H. *et al.* The disease burden associated with overweight and obesity. **JAMA.** Boston, v. 282, n.16, p.1523-9, out. 1999.

NARAYAN, K.M.V.; ZHANG, P.; KANAYA, A.M. *et al.* Diabetes: The Pandemic and Potential Solutions. **Disease Control Priorities in Developing Countries** p. 592 cap. 30.

NISWENDER, K.D.; BASKIN D.G.; SCHWARTZ M.W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol Metab.** v.15, n.8, p.362-69, out 2004.

NORDBERG, J. & ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med.** v.31, n.11, p. 1287-312, dez 2001.

OAKES, N.D; COONEY, G.J.; CAMILLERI, S., *et al.* Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes.** v.46, n.11, p.1768-74, 1997.

OBICI, S.; FENG, Z.; MORGAN, K. *et al.* Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. **Diabetes.** v.51, n.2, p. 271-275, fev 2002.

PANIGUA, J.A.; DE LA SACRISTANA, A.G.; ROMERO, I. *et al.* Monounsaturated Fat Rich Diet Prevents Central Body Fat Distribution and Decreases Postprandial Adiponectin Expression Induced by a Carbohydrate-Rich Diet in Insulin-Resistant Subjects. **Diabet Care.** v.30, n.7, p.1717-23, 2007.

PEREZ-GIMENEZ, F.; *et al.* International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **Eur J Clin Invest.** v.35, n.7, p. 421-24, jul 2005.

PERICHART-PERERA, O.; BALAS-NAKAS, M; RODRIGUEZ-CANO, A. *et al.* Correlates of Dietary Energy Sources with Cardiovascular Disease Risk Markers in Mexican School-Age Children. **J Am Diet Assoc.** n.110, n.2, p. 253-260, feb. 2010.

PINNICK, K.; NEVILLE, M.; CLARK, A.; FIELDING, B. Reversibility of Metabolic and Morphological Changes Associated With Chronic Exposure of Pancreatic Islet b-Cells to Fatty Acids. **J Cell Biochem.** v.109, n.4, p.683-92, 2010

PRIEUR, X; RÖSZER, T; RICOTE, M; Lipotoxicity in macrophages:evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. **Biochim Biophys Acta.** v.1801, n.3, p.327-337, set 2009.

RAVNSKOV, U. The Questionable Role of Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Cardiovascular Disease. **J Clin Epidemiol.** v.51, n.6, p.443-60, jun1998.

RICQUIER, D.; KADER, J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 73, n3, p.577-83, 1976.

ROSENBLAT, M. KARRY, R. AVIRAM, M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein- deficient serum: relevance to diabetes. **Atherosclerosis.** v.187, n.1, p. 74-81, 2006.

SACKS FM; KATAN M; Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **Am J Med,** v.113, n.9(suppl 9B): p.13S-24S, dec.2002

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; ZWEIER, J.L. *et al.* A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. **Science.** v.286, n.5438, p.304-06, out 1999.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D. JR, et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**.v.404, n.6778, p.661-71, 2000

SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M.; GREGOIRE, F.; EASLICK, J.; RAIMBAULT, S.; LEVI-MEYRUEIS, C.; MIROUX, B.; COLLINS, S.; SELDIN, M.; RICHARD, D.; WARDEN, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. **J Biol Chem**. v.273, n.51, p.34611–615, 1998.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling: New approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim Biophys Acta**. v.1363, n.2, p.100–24, 1998

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr**, v. 70(suppl3), p. 560s-69s, set.1999.

SIRI-TARINO P.W.; SUN Q., HU F.B.; KRAUSS R.M. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**. v. 91, n. 3, p. 535-546, mar. 2010.

SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M. Bioquímica Médica Básica de Marks; tradução Ângela de Mattos Dutra, *et al.* 2.ed. Porto Alegre:Artmed, 2007, 992p.

SMYTH S.; HERON A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nature Medicine**, v.12: n.1, p.75-80, 2006.

STAMLER, J.; STAMLER, R.; BROWN, W.V. et al. Serum cholesterol. Doing the right thing. **Circulation**. v.88, n.4(pt1), p.1954-60.

STEIN, CJ AND COLDITZ, G. A. The Epidemic of Obesity. **J Clin Endocrinol Metab.** v.89, n.6, p.2522-2525, 2004.

STEINBERG, H.O.; TARSHOBY, M.; MONESTEL, R.; HOOK, G.; CRONIN, J.; JOHNSON, A.; BAYAZEED, B.; BARON, D.A. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilatation. **J Clin Invest.** v.100, n.5, p.1230-39, 1997.

TERÉS, S.; BARCELÓ-COBLIJN, G. BENET, M. et al. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**v.105, n.37, p.13811-6, set 2008.

THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signalling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.279, n.6 p.1005-28, 2000.

THANOS, D. & MANIATIS, T. NF-KB: A Lesson in Family Values. **Cell.** v. 80, n.4, p.529-32, fev 1995.

TREMBLAY, A.J.; DESPRÉS, J.P.; PICHÉ, M.E. *et al.* Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation and components of the insulin resistance syndrome. **Metabolism.** v.53, n.3, p. 310-17, mar. 2004.

TROJANO, R.P.; FLEGAL, K.M. Overweight children and adolescents: description, epidemiology and demographics. **Pediatrics.** v.101, n.3(pt2), p.497-504, mar 1998.

UNGER, R.H. and ORCI, L. Diseases of liporegulations: new perspectives on obesity and related disorders. **FASEB J.** v.15, n.2, p.312-321, fev 2001.

WALKER, M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism.** v.44(Suppl 3),p.18-20. Set. 1995.

WANG, Q.; JIANG, L.; WANG, J. *et al.* Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. **Hepatology**. v.49, n.4, p.1166-1175, dez. 2008.

WATERMAN, E.; LOCKWOOD, B. Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. **Altern Med Rev**. v.12, n. 4, p.331-42, dez 2007

WHO - World Health Organization: Fats and oils in human nutrition, FAO/WHO Report of a joint expert consultation, n.19-26, 146 p. 1993

WHO - World Health Organization: Obesity - preventing and managing the global epidemic. Geneva: FAO/WHO Technical Report, 1998.

WHO - World Health Organization: Obesity – preventing and managing the global epidemic. Geneva: FAO/WHO Technical Report, n. 894, 1999.

WHO - World Health Organization: Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases, FAO/WHO Technical Report, n 916, 2003.

WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; PORTE, D.JR. *et al.* Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**. v.280, n.5368, p.1378-83, mai 1998

WOODS, S.C. SEELEY, R.J.; RUSHING, P.A. *et al.*; A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J Nutrition**. v.133, n.4, p.1081-87, abr 2003.

WOODS, S.C. D'ALESSIO, S.A.; TSO, P. *et al.*; Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. **Physiol Behav**. v.83, n.4, p.573-578, dez 2004.

