UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FLÁVIA GUARIENTE BARALDI

**Alterações no metabolismo corporal e mitocondrial
promovidas pela suplementação da dieta com ácido linoléico
conjugado (CLA) e ácido oléico em camundongos**

Ribeirão Preto – SP

2014

FLÁVIA GUARIENTE BARALDI

**Alterações no metabolismo corporal e mitocondrial
promovidas pela suplementação da dieta com ácido linoléico
conjugado (CLA) e ácido oléico em camundongos**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica Área de
concentração: Bioquímica

Orientadora: Luciane Carla Alberici

Ribeirão Preto – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Alterações no metabolismo corporal e mitocondrial promovidas pela
suplementação da dieta com ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido
oléico em camundongos**

BARALDI, Flavia Guariente

Alterações no metabolismo corporal e mitocondrial promovidas pela
suplementação da dieta com ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido oléico em
camundongos. Ribeirão Preto, 2014.

75 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Alberici, Luciane Carla

1.mitocôndria. 2.proteína desacopladora. 3.CLA. 4.ácido oléico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARALDI, Flavia Guariente

Título: Alterações no metabolismo corporal e mitocondrial promovidas pela suplementação da dieta com ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido oléico em camundongos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, José Carlos e Sandra, pelo incentivo e suporte durante todo o processo do desenvolvimento do mestrado.

Às agências financiadoras: CAPES, FAPESP e FAEPA.

À minha orientadora Luciane Carla Alberici, por seu acolhimento, apoio, dedicação e paciência durante a definição e desenvolvimento do meu mestrado;

Aos professores Sérgio Akira e Carlos Curti, pelo suporte experimental e intelectual;

Aos amigos e colegas de laboratório mais presentes durante este trabalho: Bruno, Felipe, Camila, Igor e Felipe, que sempre estiveram disponíveis a auxiliar em tudo que foi preciso, além do apoio psicológico e amizade.

À todos os outros colegas de laboratório que de alguma forma também tiveram uma grande importância durante essa caminhada.

À nossa técnica Ieda, pelo auxílio técnico e teórico indispensáveis durante todo o desenvolvimento desta pesquisa, apoio, paciência e amizade;

Também aos técnicos Alcides e Nadir, pelo apoio e pelo indispensável cafezinho de cada dia.

À Ivone, que sempre se mostrou disponível a ajudar no que foi preciso, especialmente no período final de conclusão do mestrado. Parabéns por ser uma excelente profissional.

A todos os meus grandes amigos conquistados durante toda a minha vida. Aqui limito-me a não citar nomes ou fazer agradecimentos específicos, mas todos vocês foram e são de imensurável importância na minha vida, em todos os aspectos. Sem amigos, a vida não vale à pena.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação do modelo quimiosmótico (NELSON, LEHNINGER e COX, 2008): elétrons do NADH e outros substratos oxidáveis passam pelos complexos da cadeia de transporte de elétrons localizados na membrana mitocondrial interna. O fluxo de elétrons é acompanhado pela passagem de prótons através da membrana, produzindo um gradiente eletroquímico. A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons, por isso os prótons apenas conseguem retornar à matriz por canais específicos para prótons, como a ATP-sintetase. O fluxo de prótons pela ATP-sintetase gera uma força chamada próton-motriz que fornece energia para a síntese de ATP. 21

Figura 2: Produção de calor pela proteína desacopladora (UCP) (Lehninger, 2008): o vazamento de prótons através das UCPs, não juntamente com a síntese de ATP provocaria desacoplamento da respiração e perda dessa energia em calor. 24

Figura 3: Mecanismo de desacoplamento de UCPs (Garlid *et al.*, 2000): No espaço intermembranas, o grupo carboxil dos ácidos graxos é rapidamente protonado, podendo assim permear facilmente a membrana, carregando um próton para a matriz mitocondrial (Walter e Gutknecht, 1984; Andreyev Ayu et al., 1989) pelo mecanismo de “flip flop”. A alcalinidade da matriz em relação ao espaço intermembranas, faz com que esse próton seja perdido no interior da mitocôndria e a forma aniônica do AG pode ser transportada de volta para o espaço intermembranas em resposta ao potencial positivo externo por meio das UCPs. Novamente no espaço intermembranas esse ácido graxo é protonado, resultando em um ciclo fútil que tem como saldo o transporte líquido de H⁺ para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons e promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa..... 26

Figura 4: Mecanismo básico de ação do PPAR (Kersten, Desvergne e Wahli, 2000): quando um ligante agonista se liga ao PPAR, este receptor forma um heterodímero com o *retinoic X receptor* (RXR) e este heterodímero se liga a regiões responsivas específicas do DNA (PPRE) e ativa a transcrição dos seus genes-alvo. 28

Figura 5: Estruturas dos isômeros A) CLA *trans*-10, *cis*-12; B) CLA *cis*-9, *trans*-11 e C) ácido linoléico *cis*-9, *cis*-12 (Groff Funck, Barrera-Arellano e Mara Block, 2006). 30

Figura 6: Mecanismos pelos quais CLA *trans*-10, *cis*-12 pode agir como antagonista do CLA (Kennedy *et al.*, 2010): 1) Reduzir a expressão do PPAR γ ; 2) aumentar a degradação do PPAR γ via fosforilação; 3) ativando NF κ B, que impede a ligação do PPAR γ no DNA e conseqüentemente, a indução dos genes relacionados a lipogênese. 32

Figura 7: de divisão dos animais em grupos experimentais: Controle, CLA, Oléico (OL) e CLA + Oléico (CLA + OL). 35

Figura 8: Conversão de Amplex Red® em resorufina. <i>Horseradish peroxidase</i> (HRP) utiliza <i>Amplex red</i> como doador de elétrons durante a redução de peróxido de hidrogênio em água. O produto resultante, resorufina, é um composto altamente fluorescente.....	39
Figura 9: reação do grupo carbonil das proteínas com 2,4-Dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para formar um complexo DNPH-Proteína carbonilada. Esse complexo pode ser lido em espectrofotômetro a 370 nm.	41
Figura 10: Medida do (A) volume de O ₂ inspirado (VO ₂), (B) volume de CO ₂ expirado (VCO ₂), (C) quociente respiratório (RQ) e (D) gasto energético (EE) em camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles por calorimetria indireta. ^a P<0,05 vs controle; Média ± dp. ^b P< 0,05 vs CLA; ^c P< 0,05 vs OL. N = 8-11.....	45
Figura 11: Medida do ganho de peso de camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. Média ± dp. N = 5-6.	45
Figura 12: (A) gráfico e (B) medida da área sob a curva do Teste de Tolerância à Glucose (TTG) aplicado em camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. Média ± dp. ^a P=0,055 vs controle. N = 3-4.....	47
Figura 13: Peso do (A) tecido adiposo branco e (B) peso do fígado de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA+OL) ou controles. Média ± dp. ^a P<0,05 vs controle; ^b P<0,05 vs CLA. N=6-9.....	48
Figura 14: (A) Conteúdo de PPARγ e (B) densitometria (intensidade relativa) das bandas de PPARγ1 e PPARγ2 em relação a β-actina de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. ^a P<0,05 vs controle. Média ± dp. ^b P<0,05 vs CLA. N = 3.	50
Figura 15: traçados representativos de taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas de fígados de camundongos suplementados com camundongos suplementados com (B) ácido linoléico conjugado (CLA), (C) ácido oléico (OL), (D) ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou (A) controles. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH ₂ PO ₄ 2 mM, EGTA 0,1 mM e MgCl ₂ 1 mM a 30°C, acrescidos de malato e glutamato (5 mM).....	51

Figura 16: Taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas de fígados de camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EGTA 0,1 mM e MgCl₂ 1 mM, a 30°C. (A) Estado III, (B) Estado IV, (C) CR (estado III/estado IV) e (D) razão ADP/O de mitocôndrias incubadas em meio padrão contendo malato e glutamato (5 mM) na ausência ou na presença de 2 µM de LA; (E) Δ CR (CR sem LA – CR com LA) e (F) Δ ADP/O (ADP/O sem LA – ADP/O com LA); (G) Δ CR e (H) Δ ADP/O de mitocôndrias incubadas em meio padrão contendo succinato (5 mM) na ausência ou na presença de 2 µM de LA. ^a P<0,05 vs controle. Média ± dp. ^b P<0,05 vs CLA; ^c P<0,05 vs OL. N = 4-6. 52

Figura 17: Quantificação de RNAm da UCP2 de fígados de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles, determinadas por real time PCR (RT-PCR) e normalizadas pela expressão do gene constitutivo RPL. Média ± dp. ^a P<0,05 vs controle; ^b P<0,05 vs CLA. N = 4-6.. 53

Figura 18: (A e B) traçados representativos e (C) Média ± dp. da geração de EROS em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles, monitorada por Amplex Red. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EGTA 0,1 mM e MgCl₂ 1 mM a 30°C, acrescidos de (A) malato+glutamato (5 mM) ou (B) succinato (5 mM). a P<0,05 vs controle; b P<0,05 vs CLA; c P<0,05 vs OL. N = 4-5. 55

Figura 19: quantificação de RNAm de PPARα de fígados de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles, determinadas por real time PCR (RT-PCR) e normalizadas pela expressão do gene constitutivo RPL. Média ± dp. ^a P<0,05 vs controle; ^b P<0,05 vs CLA. N = 5-6. 56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: esquema da suplementação semanal dos quatro diferentes grupos de camundongos com seus respectivos ácidos graxos. A suplementação foi feita durante um período de 60 dias..... 36

Tabela 2: Medida dos níveis de lipídios circulantes triacilgliceróis (TAG), colesterol total (Col), colesterol HDL (HDL-col) e colesterol não HDL (Não-HDL) em camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles..... 47

Tabela 3: Estado Redox dos fígados camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles..... 57

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIACÕES	12
INTRODUÇÃO.....	15
1- Obesidade.....	15
1.1- Metabolismo na obesidade	15
1.2- Estratégias de controle da obesidade.....	16
2- Bioenergética mitocondrial	20
2.1- Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.....	20
2.2- Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes	22
2.3 – Proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) e desacoplamento	23
2.4- Alterações mitocondriais induzidas por ácidos graxos livres (AGLs).....	25
3- Alterações metabólicas induzidas por ácidos graxos livres.....	27
3.1- Ácido linoléico conjugado (CLA).....	29
3.2- Ácido Oleico (OL)	33
OBJETIVO GERAL.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1- Animais e protocolo experimental	35
2- Metabolismo <i>in vivo</i> : Calorimetria indireta	36
3- Determinação das concentrações plasmáticas de lipídios.....	36
4- Teste de tolerância à glucose (TTG)	37
5- Extração de tecidos e isolamento de mitocôndrias de fígados.....	37
6- Quantificação de proteína mitocondrial.....	38
7- Ensaio com mitocôndrias isoladas	38
7.1- Meio de respiração padrão (MRP)	38
7.2- Consumo de oxigênio.....	38
7.3- Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	38
8- Determinação do estado REDOX do fígado	39
8.1- Determinação da relação glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) do fígado	39
8.2- Determinação de proteína carbonilada.....	40

9- Quantificação de RNAm de proteínas desacopladoras (UCP2) e PPAR α no fígado.....	42
9.1- Extração de RNA	42
9.2- Síntese de cDNA do fígado	42
9.3- Real time qPCR.....	42
10- Imunoblotting PPAR γ	42
11- Análise estatística	43
RESULTADOS	44
1- Alterações metabólicas corporais	44
2- Alterações mitocondriais	50
3- Parâmetros indicativos do estado redox do fígado	57
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	64

RESUMO

BARALDI, F. G., **Alterações no metabolismo corporal e mitocondrial promovidas pela suplementação da dieta com ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido oléico em camundongos**. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014

A obesidade é atualmente um dos problemas públicos de saúde mais visível e negligenciado podendo causar sérios problemas de saúde como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão arterial e diversos problemas fisiológicos. Dietas alimentares e/ou o uso de fármacos tem demonstrado pouca eficiência (e grandes efeitos colaterais) em reduzir a incidência de sobrepeso e obesidade no mundo. Dessa forma outras estratégias são requeridas para auxiliar no controle desta epidemia global. Nesse contexto, alguns ácidos graxos específicos podem desempenhar um importante papel na regulação da expressão de genes que possuem a habilidade de modular metabolismo. O ácido linoléico conjugado (CLA, 18:2) e o ácido oléico (18:1) tem sido descritos com propriedades anti-obesidade: a respeito de CLA, são bem conhecidos os seus efeitos adipotróficos; quanto ao oléico, são bem conhecidos os seus efeitos anti-diabetes; outros efeitos desses ácidos graxos sobre o metabolismo corporal são desconhecidos ou controversos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação da dieta de camundongos (C57bl6) com esses dois ácidos graxos, individualmente ou em conjunto, na modulação do metabolismo corporal e mitocondrial como uma possível estratégia de combate à obesidade. Foram analisados parâmetros bioquímicos, moleculares, fisiológicos, morfológicos e funcionais. Nossos resultados demonstram que o ácido graxo indutor de aumento do gasto energético corporal e mitocondrial hepático é o CLA e não o oléico; quando suplementados em conjunto, os efeitos metabólicos do CLA se sobrepõem aos do oléico, mantendo esses metabolismos elevados. O aumento de metabolismo mitocondrial está relacionado ao aumento de expressão/atividade de proteínas desacopladoras, as quais parecem ser controladas por espécies reativas de O_2 mitocondriais. Demonstramos também que no tecido adiposo branco o ácido oléico não exerce efeitos atrofícos como o CLA, os quais estão relacionados a inibição da expressão de $PPAR\gamma 1$. Por outro lado, verificamos que a suplementação conjunta com ácido oléico previne efeitos adversos da suplementação da dieta com CLA, como a hipertrofia hepática e resistência a insulina. Concluimos dessa

forma que a suplementação da dieta com CLA aumenta o metabolismo corporal e mitocondrial; a suplementação com ácido oléico em conjunto não potencializa os efeitos do CLA, porém previne seus efeitos adversos como a hipertrofia hepática e resistência a insulina. Em conjunto esses ácidos graxos constituem uma boa estratégia alimentar contra o ganho de peso corporal.

ABSTRACT

BARALDI, F. G., Changes in body and mitochondrial metabolism promoted by dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) and oleic acid in mice
75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014

Obesity is one of the major public health problems. This condition can lead to the development of other complications such as cardiovascular disease, diabetes and hypertension. Diet and/or drug treatments have shown low efficiency (and major side effects) in reducing the incidence of overweight and obesity worldwide. On the other hand, some specific fatty acids may play an important role regulating the expression of genes that modulate the metabolism. Conjugated linoleic acid (CLA, 18:2) and oleic acid (18:1) have been known for their anti-obesity properties: CLA is well described inducer of atrophy in adipose tissue, while oleic acid is known by its anti-diabetic effects; other effects of these fatty acids on body metabolism are unknown or controversial. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of a murine diet supplemented with CLA and oleic acid, individually or together, in the modulation of body and mitochondrial metabolism. Biochemical, molecular, physiological, morphological and functional parameters were analyzed in mice. Our results show that CLA, and not oleic acid, is the fatty acid inductor of increase in body metabolism and liver mitochondrial energy expenditure; when supplemented together, the metabolic effects of CLA overlap the oleic effects, maintaining the high metabolism. Increased mitochondrial metabolism is associated with an increased expression/activity of uncoupling proteins, which appear to be controlled by mitochondrial oxygen reactive species. It was also demonstrated that, in white adipose tissue, oleic acid exerts no atrophic effects as compared to CLA, which are related to inhibition of PPAR γ 1 expression. On the other hand, we demonstrated that the supplementation with oleic acid prevents adverse effects of dietary supplementation with CLA, such as liver hypertrophy and insulin resistance in mice. In conclusion, supplementing the murine diet with CLA increases body and mitochondrial metabolism and reduces the adiposity; in addition, supplementation with oleic acid does not potentialize the metabolic effects of CLA, but prevents its adverse effects. Together CLA and oleic in conjunction appears as a good dietary strategy against the excessive weight gain.

LISTA DE ABREVIACÕES

AG: ácido graxo

AGL: ácido graxo livre

AOX: acil-CoA oxidase

aP2: proteína de ligação a ácidos graxos nos adipócitos (*adipocyte Protein 2*)

BSA: soro albumina bovina

Cit c: citocromo c

CLA: ácido linoléico conjugado

CTE: cadeia de transporte de elétrons

CYP4A2: citocromo P450 4A2

DEPC: dietilpirorocarbonato

DNPH: 2,4-dinitrofenil hidrazina

d.p.: desvio padrão

EDTA: etilenodiamida tetra-ácido acético

EE: gasto energético (*energy expenditure*)

EGTA: ácido etilenoglicol bis (éter 2-amino-etil) N,N,N',N'tetracético

ERK: quinases reguladas por sinais extracelulares (*extracellular-signal-regulated kinases*)

EROs: espécies reativas de oxigênio

FABP: proteína de ligadora de ácidos graxos

FATP: proteína e de ácidos graxos

FDA: *food and drug administration*

FMN: flavina mononucleotídeo

GLUT4: transportador de glucose sensível a insulina

GPx: glutational peroxidase

GSH: glutational reduzida

GSSG: glutathiona oxidada

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HDL: lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein)

HEPES: N- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)

HRP: *horseradish peroxidase*

LA: ácido linoleico

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPL: lipoproteína lípase

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen activated protein kinase*)

MGC: massa de gordura corporal

MnSOD: Mn-superóxido dismutase

MRP: meio de respiração padrão

MUFA: ácido graxo monoinsaturado

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

NEM: N-etilmaleimida

NFκB: fator nuclear κB (*nuclear factor κB*)

O₂^{•-}: superóxido

OL: ácido oleico

OPT: o-ftaldeído

PMSF: Fenilmetil-sulfonil Fluorido

PPAR: receptor de ativação da proliferação de peroxissomos (*peroxisome proliferator activator receptor*)

PPRE: elemento responsivo à proliferador de paroxismos (*peroxissome proliferator responsive element*)

PUFA: ácido graxo poliinsaturado

PVDF: fluoreto de polivinilideno

RA: ácido retinóico

RPL: proteína L ribossômica (*ribossomal L protein*)

RXR: receptor retinóico X (*retinoic X receptor*)

RQ: coeficiente respiratório

SDS: dodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

TAB: tecido adiposo branco

TAG: triacilglicerol

TAM: tecido adiposo marrom

TBST: tampão salino de Tris com Tween 20

t-BuOOH: terc-butil

TCA: ácido tricloroacético

Tris: tris (hidroximetil) amino metano

TTG: teste de tolerância a glucose

UCP: proteína desacopladora mitocondrial

UQ: coenzima Q (reduzida)

UQH₂: Coenzima Q (oxidada)

VO₂: volume de oxigênio consumido

VCO₂: volume de gás carbônico produzido

INTRODUÇÃO

1- Obesidade

A obesidade é atualmente um dos problemas públicos de saúde mais visível e ao mesmo tempo negligenciado. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), um quadro de epidemia global de obesidade e sobrepeso vem sendo observado em várias partes do mundo, sendo que entre os anos de 1995 e 2000, o número de adultos obesos cresceu em mais de 100 milhões.

A obesidade é uma condição complexa que pode provocar sérios problemas de saúde como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão arterial e problemas fisiológicos entre outros; por consequência pode ocorrer uma diminuição na qualidade de vida até uma morte prematura (Flatt, 1987; Organization, 2000; Klein *et al.*, 2004; Erdmann *et al.*, 2008; Pereira-Lancha *et al.*, 2010). Dados publicados no relatório “Estatísticas Mundiais de Saúde 2012”, da Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmam que a obesidade é a causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano. Esses fatos evidenciam a necessidade de desenvolvimento de novas e efetivas estratégias de combate à obesidade.

1.1- Metabolismo na obesidade

A obesidade se desenvolve quando ocorre uma perturbação no balanço energético, no qual a ingestão de energia é maior do que seu gasto (Munsters e Saris, 2014). Fatores genéticos desempenham um papel importante na regulação do ganho de peso corporal, no entanto, os fatores que mais contribuem para o ganho de peso corporal e desenvolvimento da obesidade em países desenvolvidos ou em desenvolvimento são o aumento do consumo de gorduras na dieta junto com um estilo de vida sedentário (James, 2008). O balanço energético do metabolismo de proteínas e carboidratos parece ser rigorosamente controlado quando comparados aos de ácidos graxos (Flatt, 1987): oxidação de ácidos graxos demora muito mais tempo para se igualar à sua ingestão em uma dieta hiperlipídica, levando, portanto a um ganho de peso corporal. (Schrauwen *et al.*, 2000). Ainda, ácidos graxos são eficientemente armazenados no tecido adiposo como reserva energética (Pereira-Lancha *et al.*, 2010).

A obesidade leva a uma diminuição na ação da insulina (Munsters e Saris, 2014), sendo a insulina o principal hormônio envolvido na homeostase da glucose. A ingestão de carboidratos estimula a liberação de insulina no plasma, que por sua vez, estimula a captação de glucose no músculo, síntese de glicogênio no fígado, síntese proteica e deposição de gordura no tecido adiposo. Nessas condições a insulina aumenta a oxidação de glucose e diminui a oxidação de ácidos graxos (Saltiel e Kahn, 2001; Martyn, Kaneki e Yasuhara, 2008).

Em indivíduos obesos, o excesso de gordura armazenada no tecido adiposo leva a um quadro de hipertrofia e secreção de fatores pró-inflamatórios no tecido adiposo, tais como fator de necrose tumoral alfa $TNF\alpha$, interleucinas (IL) $IL-1\beta$ e $IL-6$, que por sua vez ativam serino-quinases. Essas serino-quinases promovem a fosforilação de resíduos de serina do substrato do receptor de insulina (IRS), diminuindo seus níveis proteicos, e por consequência inibindo a sinalização do receptor de insulina por impedir que ocorra a ligação do IRS com o receptor (Capurso e Capurso, 2012). Ainda, devido ao excesso de gordura armazenada no tecido adiposo, nos indivíduos obesos ocorre uma redistribuição dessa gordura para outros órgãos como músculo, fígado e pâncreas, fazendo assim com que ocorra a liberação de ácidos graxos livres (AGLs) para a circulação, os quais também promovem a ativação de serino-quinases, consequentemente piorando a sinalização por insulina (Roden, 2005). Nessas condições, para compensar a falta de resposta sistêmica à insulina, ocorre um aumento na atividade das células β do pâncreas e por consequência, um aumento na secreção de insulina (Stumvoll, Goldstein e Van Haeften, 2005). Assim, a glicemia é, em um primeiro momento, mantida, até que as células β pancreáticas não consigam mais compensar os níveis altos de resistência à insulina nos tecidos periféricos, levando a hiperglicemia e desenvolvendo um quadro de diabetes tipo 2 (Erdmann *et al.*, 2008).

Estudos indicam que os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade são: baixa taxa metabólica, baixa atividade física, baixa atividade do sistema nervoso simpático e baixa oxidação de ácidos graxos.

1.2- Estratégias de controle da obesidade

1.2.1- Alterações na dieta alimentar

Diferentes dietas têm sido propostas para o tratamento da obesidade, desde as de baixo conteúdo energético e equivalente nutricional, até as que propõem restrição de

nutrientes, alterando a proporção de proteínas, carboidratos e gorduras. (Klein *et al.*, 2004). Os Institutos Nacionais de Saúde/Institutos Nacionais do Coração, Pulmão e Sangue recomendam uma dieta com um déficit de 500 a 1000 kcal/dia para o tratamento de pessoas obesas, que resulta no início em uma perda de peso de 0,45 a 0,9 kg por semana. O problema dessa estratégia é a dificuldade de se estimar as necessidades diárias de energia de uma pessoa. No entanto, guias de consumo de calorias têm sido estabelecidos com base no peso inicial do paciente (Klein, Wadden e Sugerman, 2002). Outro tipo de dieta é a com baixo conteúdo de gorduras (National Institutes of Health, 1998). Dados sobre a aplicação dessa dieta mostram que mesmo com o consumo *ad libitum* de carboidratos e proteínas, o resultado final é uma redução do valor calórico total da dieta e perda de peso (Astrup *et al.*, 2000). Dietas de baixo índice glicêmico também são adotadas como estratégia para o tratamento da obesidade. Brand-Miller *et al.* (2009), revisando dados da literatura, concluem que dietas com baixo índice glicêmico são as mais eficazes na prevenção da obesidade e seus males relacionados, pois além de prevenir o ganho excessivo de peso, não são baseadas na restrição de nenhum outro grupo alimentar (Brand-Miller *et al.*, 2002). Apesar dos estudos demonstrarem efeitos positivos das diferentes dietas, o aumento dos níveis de obesidade no mundo indica que estratégias mais eficazes de combate à obesidade precisam ser desenvolvidas.

1.2.2- Uso de fármacos

Além da modulação da dieta, diversos fármacos têm sido utilizados para auxiliar na redução de peso corporal. De acordo com o guia produzido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), os fármacos podem ser utilizados como terapia para pacientes obesos desde que estes possuam um IMC ≥ 30 kg/m². (Kushner, 2014). No entanto, a eficácia no uso de fármacos no tratamento da obesidade requer que esse tratamento seja aplicado por um longo período de tempo, pois os pacientes usualmente voltam a ganhar peso quando a farmacoterapia é interrompida; nesse sentido, os efeitos colaterais ganham importância. (Klein *et al.*, 2004). Devido a esses efeitos, vários desses medicamentos foram retirados do mercado, como a fenfluramina e dexfenfluramina em 1997, rimonabant em 2009, e sibutramina em 2010 (Kushner, 2014).

Atualmente, existem duas principais categorias de fármacos destinados ao tratamento da obesidade: os supressores de apetite (ou anorexígenos) e os bloqueadores da absorção de gorduras gastrointestinais. O Orlistat, da classe dos bloqueadores de

absorção de gorduras, foi o primeiro inibidor de lípases aprovado pelo FDA, em 1999, sendo sua comercialização também permitida pela ANVISA no Brasil. Ele inibe a lipase intestinal e assim reduz a hidrólise de triacilgliceróis e dessa forma a absorção de gorduras da dieta (Hadváry, Lengsfeld e Wolfer, 1988). Como é minimamente absorvido no trato gastrointestinal (menos de 1%), Orlistat não apresenta efeitos colaterais sistêmicos (Zhi *et al.*, 1996). Da classe dos supressores de apetite, atualmente existem os derivados de anfetaminas aprovados pelo FDA em 2012: *lorcaserin* e *phentermine-topiramate extended release* (Kushner, 2014), que embora aprovados pelo FDA, sua comercialização desses derivados de anfetaminas não foi permitida pela ANVISA no Brasil.

Nos anos 1930s as anfetaminas eram muito utilizadas como supressores de apetite, no entanto essa droga se mostrou susceptível a induzir vício e euforia como efeitos colaterais. Muitos derivados de anfetaminas foram produzidos a partir de então, buscando reduzir esses efeitos colaterais, entre eles: *phentermina*, *benzphetamine*, *phendimetrazina*, *diethylpropion* e *mazindol*. No entanto esses derivados não foram completamente privados de efeitos colaterais, podendo causar cansaço, insônia, constipação, aumento de pressão arterial e ritmo cardíaco (Kushner, 2014).

Lorcaserin é um ativador de receptor 5-HT_{2C}, levando a um decréscimo no consumo de alimento, podendo apresentar alguns efeitos colaterais como dores de cabeça, tontura e náusea (Kushner, 2014).

Phentermine e *topiramate* (PHEN e TPM) é uma combinação de fármacos que contem liberador de catecolamina (*phentermine*) e anticonvulsante (*topiramate*). Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desse fármaco, mas especula-se que possa estar relacionado à modulação de receptores gamaaminobutíricos, inibição da anidrase carbônica e antagonizante de glutamato, reduzindo o consumo de alimentos. Essa droga também possui efeitos colaterais tais como entorpecimento, constipação e insônia (Kushner, 2014).

1.2.3- Outras estratégias na prevenção e tratamento da obesidade

Devido aos aspectos negativos muitas vezes ocasionados pelo tratamento farmacológico da obesidade, outra estratégia muito menos agressiva pode ser utilizada para auxiliar na redução de peso corporal induzida pela dieta. Tem sido demonstrado que alguns ácidos graxos podem desempenhar um importante papel na regulação da expressão de genes que possuem a habilidade de modular metabolismo (Jump, 2004).

Pesquisas comparando dietas com níveis baixos, moderados e altos de ácido graxo, tem demonstrado que o tipo de ácido graxo consumido é mais importante para modulação do metabolismo do que sua quantidade. Evidências de que AGLs seriam importantes em modulações metabólicas e mitocondriais surgiram quando a esses AGLs foi atribuída a capacidade de desacoplar sutilmente a respiração da fosforilação oxidativa mitocondrial.

2- Bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias são organelas presentes em quase todas as células eucarióticas, tanto vegetais, quanto animais, e são responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para energia química (na forma de ATP), que será utilizada em reações bioquímicas celulares que necessitam de energia para ocorrer. Esse processo de conversão de energia de óxido-redução em ATP envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintetase, localizados na membrana mitocondrial interna e é denominado fosforilação oxidativa.

2.1- Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

A cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória é a responsável pela geração do potencial eletroquímico de prótons, que fornece energia para o processo de fosforilação oxidativa.

A mitocôndria possui duas membranas: uma externa e uma interna. A membrana externa é permeável a quase todas as moléculas pequenas e íons, que podem se mover livremente por canais proteicos localizados nessa membrana. A membrana mitocondrial interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo prótons. Sendo assim, essas moléculas e íons só conseguem atravessar a membrana mitocondrial interna através de complexos proteicos que agem como transportadores específicos. Esses transportadores mais a enzima ATP sintetase compõe a chamada cadeia respiratória.

A fosforilação oxidativa se inicia com a entrada de elétrons na cadeia respiratória. A maioria desses elétrons surge da ação de desidrogenases que coletam elétrons de rotas catabólicas (oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos) através da redução das coenzimas NAD^+ em NADH. Então, os elétrons contidos nessas coenzimas reduzidas, são transferidos à NADH desidrogenase (complexo I, fixo na membrana interna mitocondrial), e o complexo I irá transferir esses elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida da coenzima Q (UQH_2). Elétrons originados a partir do succinato são doados à UQ através da succinato desidrogenase (complexo II), resultando também na redução da Coenzima Q. a UQH_2 , que pode se mover livremente pela membrana mitocondrial interna, e irá doar os elétrons para a ubiquinona:citocromo-C oxidoreductase (complexo III). O complexo III então irá doar elétrons ao citocromo C e este por sua vez doará os elétrons para a

citocromo oxidase (complexo IV). Este último complexo é responsável pela transferência de elétrons ao oxigênio, resultando na geração de água (NELSON, LEHNINGER e COX, 2008).

Segundo MITCHELL (1961) a passagem desses elétrons através dos complexos da cadeia respiratória, organizados em ordem crescente de potencial redox, permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, contra o gradiente de concentração. Essa teoria foi chamada teoria quimiosmótica. O potencial eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons é o responsável pelo acoplamento entre a oxidação de substratos energéticos e a utilização desta energia. A passagem dos prótons do espaço intermembranas de volta para a matriz, através da ATP sintetase (Fig. 1), desta vez a favor do gradiente de concentração é responsável pela fosforilação do ADP em ATP.

Figura 1; Representação do modelo quimiosmótico (NELSON, LEHNINGER e COX, 2008): elétrons do NADH e outros substratos oxidáveis passam pelos complexos da cadeia de transporte de elétrons localizados na membrana mitocondrial interna. O fluxo de elétrons é acompanhado pela passagem de prótons através da membrana, produzindo um gradiente eletroquímico. A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons, por isso os prótons apenas conseguem retornar à matriz por canais específicos para prótons, como a ATP-sintetase. O fluxo de prótons pela ATP-sintetase gera uma força chamada próton-motriz que fornece energia para a síntese de ATP.

2.2- Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes

Sabe-se que a cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial é uma das maiores fontes celulares produtoras de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Liu, Fiskum e Schubert, 2002). No processo de transferência de elétrons através da cadeia respiratória, 1 a 5% desses elétrons não são utilizados para reduzir O_2 a H_2O . Para se ligar a dois átomos de hidrogênio e formar uma molécula de água, o oxigênio precisa receber quatro elétrons. No entanto, nem sempre a redução completa do oxigênio ocorre: no processo de transferência de pela CTE, elétrons podem ser “perdidos” e provocar uma redução moe eletrônica do O_2 , gerando assim, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997). Os dois principais locais geradores de $O_2^{\cdot-}$ conhecidos na CTE são o sítio da ubiquinona, no complexo III e o grupo mononucleotídeo de flavina (FMN) do complexo I (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, Alexandre e Lehninger, 1985; Liu, Fiskum e Schubert, 2002). Ainda, segundo Liu *et al* (2002), a subunidade FMN do complexo I é o local mais relevante do ponto de vista fisiológico e patológico na produção de EROS.

2.2.1- Sistema antioxidante mitocondrial

Sabe-se que as EROS estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos em organismos, incluindo a sinalização, proliferação e diferenciação celular, apoptose, inflamações, doenças degenerativas e envelhecimento (Halliwell, 1994; Shigenaga, Hagen e Ames, 1994; Yu, 1994). Como a geração de $O_2^{\cdot-}$ é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria é provida de um eficiente sistema antioxidante, fazendo parte desse sistema a Mn-superóxido dismutase (MnSOD) (Doonan, Barra e Bossa, 1984), responsável pela rápida dismutação de $O_2^{\cdot-}$, o qual é extremamente reativo, em H_2O_2 . A glutathione peroxidase (GPx), uma peroxidase tiólica é capaz de converter H_2O_2 em H_2O utilizando glutathione como substrato (Hissin e Hilf, 1976; Sies e Moss, 1978). A forma oxidada da glutathione pode ser recuperada por NADH por meio da atividade da glutathione redutase. A mitocôndria também possui sistemas antioxidantes solúveis em lipídios, portanto, importantes inibidores da peroxidação lipídica, como o α -tocoferol (vitamina E) e UQH_2 (Ernster, Forsmark e Nordenbrand, 1992).

O complexo IV da cadeia respiratória (citocromo oxidase) também é importante em processos de defesa antioxidante pois previne a formação de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), por meio da conversão de $NO^{\cdot}$ a $NO_2^{\cdot-}$ e $NO_3^{\cdot-}$ (Giulivi, Poderoso e Boveris, 1998). Por fim, a catalase, encontrada também em mitocôndrias de coração (Radi *et al.*, 1991) e a

tioredoxina peroxidase (Kowaltowski, Netto e Vercesi, 1998) desempenham um importante papel antioxidante citosólico, removendo o H_2O_2 que consegue atravessar as membranas mitocondriais e difundir-se no meio extramitocondrial.

2.3 – Proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) e desacoplamento

Apesar de o potencial eletroquímico ser acoplado com a fosforilação do ADP, esse acoplamento não é total e pode ser parcialmente perdido. As proteínas desacopladoras (UCPs) são transportadores mitocondriais localizados na membrana interna e parecem controlar o grau de acoplamento da fosforilação oxidativa (Rousset *et al.*, 2004). Além de passagem de prótons para a matriz mitocondrial através da ATP sintetase, um vazamento de prótons por meio de canais alheios à ATP sintetase, tais como as UCPs, representa mais um mecanismo de “consumir” o gradiente de prótons mitocondrial (Rousset *et al.*, 2004). A teoria de Mitchell previu que qualquer vazamento de prótons provocaria desacoplamento da respiração e perda dessa energia em calor (termogênese) (Fig. 2). Dessa forma, a manutenção do gradiente de prótons mitocondrial para síntese de ATP leva a um aumento no consumo de substratos energéticos e na respiração mitocondrial.

Um exemplo bem conhecido de desacoplamento mitocondrial é a proteína desacopladora do tecido adiposo marrom, a UCP1 (Nicholls e Locke, 1984; Cannon e Nedergaard, 1985; Klingenberg e Echtay, 2001). A UCP1 foi a primeira proteína desacopladora a ser identificada. O tecido adiposo marrom (TAM) é um tecido adiposo com características peculiares presente em animais que hibernam, pequenos mamíferos, recém-nascidos e roedores expostos ao frio, sendo sua principal função a produção de calor para manutenção da temperatura corporal (Nicholls e Locke, 1984). Estudos realizados em mitocôndrias do TAM revelaram que estas possuem uma alta taxa respiratória e que essa respiração não está acoplada à síntese de ATP, indicando um processo termogênico. Aparentemente ácidos graxos gerados por uma estimulação da lipólise estavam ativando diretamente algum caminho para a passagem de prótons não acoplada com a fosforilação do ADP, e a proteína que explicou essa passagem alternativa de prótons de volta para a matriz mitocondrial foi chamada UCP1 (Nicholls e Locke, 1984; Cannon e Nedergaard, 1985; Klingenberg e Echtay, 2001).

Depois da descoberta da UCP1, foram descobertas outras homólogas desta proteína chamadas UCP2 e UCP3. Enquanto a UCP1 é encontrada apenas no tecido

adiposo marrom, a UCP2 pode ser encontrada em diversos órgãos e a UCP3 é predominantemente encontrada no músculo esquelético. A distribuição dessas proteínas por uma diversidade de órgãos sugere que elas desempenhem outro papel, além da produção de calor (Rousset *et al.*, 2004). Além disso, a UCP2 também é conhecida por controlar a secreção de insulina em células β pancreáticas (Fleury *et al.*, 1997; Saleh, Wheeler e Chan, 2002), sendo negativamente correlacionada com a secreção de insulina e desempenhar um importante papel em processos arterioscleróticos, prevenindo a formação de placas e inflamação das artérias (Blanc *et al.*, 2003; Rousset *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura, as UCPs são conhecidas por promover um decréscimo na produção de EROS, atuando como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997; Skulachev, 1998; Diehl e Hoek, 1999; Vidal-Puig *et al.*, 2000), além de participar, em diversos tipos de célula, do metabolismo intermediário e metabolismo de lipídios (Rousset *et al.*, 2004).

Figura 2: Produção de calor pela proteína desacopladora (UCP) (Lehninger, 2008): o vazamento de prótons através das UCPs, não juntamente com a síntese de ATP provocaria desacoplamento da respiração e perda dessa energia em calor.

2.4- Alterações mitocondriais induzidas por ácidos graxos livres (AGLs).

Como mencionado anteriormente, evidências de que AGLs seriam importantes em modulações metabólicas e mitocondriais surgiram quando à esses AGLs foi atribuída a capacidade de desacoplar a respiração da fosforilação oxidativa mitocondrial. Sabe-se que as UCPs catalisam o fluxo de prótons através da membrana mitocondrial, em direção à matriz, e que esse processo é obrigatoriamente dependente da presença de ácidos graxos (Bienengraeber, Echtay e Klingenberg, 1998; Jabůrek *et al.*, 1999; Garlid *et al.*, 2000).

Um mecanismo pelo qual as UCPs dissipam o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna utilizando os AGLs foi proposto por (Garlid *et al.*, 1996). Nesse modelo, UCPs catalisam um movimento de flip-flop (Fig. 3) da cabeça aniônica do AG (grupo carboxil desprotonado) da membrana interna para a membrana externa mitocondrial. No espaço intermembranas, o grupo carboxil dos ácidos graxos é rapidamente protonado, podendo assim permear facilmente a membrana, carregando um próton para a matriz mitocondrial (Walter e Gutknecht, 1984; Andreyev Ayu *et al.*, 1989) pelo mecanismo de “flip flop”. Como a matriz mitocondrial é altamente alcalina em relação ao espaço intermembranas, esse próton é perdido no interior da mitocôndria e a forma aniônica do AG pode ser transportado de volta para o espaço intermembranas em resposta ao potencial positivo externo novamente por meio das UCPs. Novamente no espaço intermembranas esse ânion ácido graxo é protonado, resultando em um ciclo fútil que tem como saldo o transporte líquido de H^+ para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons e promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa.

Figura 3: Mecanismo de desacoplamento de UCPs (Garlid *et al.*, 2000): No espaço intermembranas, o grupo carboxil dos ácidos graxos é rapidamente protonado, podendo assim permear facilmente a membrana, carregando um próton para a matriz mitocondrial (Walter e Gutknecht, 1984; Andreyev Ayu *et al.*, 1989) pelo mecanismo de “flip flop”. A alcalinidade da matriz em relação ao espaço intermembranas, faz com que esse próton seja perdido no interior da mitocôndria e a forma aniônica do AG pode ser transportada de volta para o espaço intermembranas em resposta ao potencial positivo externo por meio das UCPs. Novamente no espaço intermembranas esse ácido graxo é protonado, resultando em um ciclo fútil que tem como saldo o transporte líquido de H⁺ para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons e promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa.

Além desse modelo, existem outros modelos propondo outros mecanismos de desacoplamento das UCPS utilizando ácidos graxos como substratos: Winkler e Klingenberg propuseram que ácidos graxos se ligam a regiões no interior do canal de prótons das UCPs, agindo como doadores/aceptores de prótons locais facilitando o transporte de H⁺. Esse modelo é denominado “modelo de tamponamento”. Outro mecanismo proposto é o de Skulachev, no qual as UCPs transportam ácidos graxos diretamente, fazendo com que os prótons sejam transportados por meio de difusão não iônica do ácido graxo protonado. Esse modelo é chamado modelo protonoforético.

3- Alterações metabólicas induzidas por ácidos graxos livres

As alterações mitocondriais e metabólicas induzidas por ácidos graxos livres mostraram-se mais importantes do que a habilidade dessas moléculas em ativar as UCPs. Tem sido demonstrado que alguns ácidos graxos podem desempenhar um importante papel na regulação da expressão de genes que possuem a habilidade de modular aspectos celulares como a estrutura celular e componentes regulatórios do metabolismo (Jump, 2004).

Ácidos-graxos e seus metabólitos possuem a habilidade de ligar-se a determinados receptores nucleares denominados “receptores ativadores da proliferação de peroxissomos” (PPARs), ativando-os e levando ao controle uma série de genes relacionados ao metabolismo (Desvergne e Wahli, 1999). Os PPARs são compostos por seis domínios funcionais. A região de ligação ao DNA é essencial para o direcionamento do receptor para se ligar os elementos reguladores específicos de promotores de genes e as regiões de ativação da função (AF1 e AF2) interagem com outras proteínas do promotor, tais como os co-reguladores e fatores que interagem com a RNA polimerase II (Jump, 2004). Ainda, segundo (Jump, 2004), o domínio de ligação, aonde se liga o ácido graxo regulador, é crítico para a atividade do receptor: quando o ligante (AG) se liga a essa região, ocorre uma alteração conformacional que promove uma mudança nos fatores regulatórios que interagem com o receptor, levando a uma dissociação de co-repressores e ligação de ativadores como Src1 e PGC-1.

Existem três subtipos de PPARs: PPAR α , PPAR β , PPAR γ . O PPAR α , principalmente expresso no tecido adiposo marrom, fígado, músculo e rins, desempenha um papel importante na oxidação de ácidos graxos e inflamação (Desvergne e Wahli, 1999; Kidani e Bensinger, 2012; Monsalve *et al.*, 2013); o PPAR γ , presente principalmente no tecido adiposo, está envolvido na diferenciação de células, armazenamento de glucose e lipídios, bem como inflamação (Rosen e Spiegelman, 2001) e o PPAR β , expresso por todo o organismo tem demonstrado um importante papel no desenvolvimento embrionário, formação óssea e metabolismo de lipídios (Guan e Breyer, 2001; Peters e Gonzalez, 2009).

Os ácidos graxos que possuem a capacidade de se ligar reversivelmente a todas as isoformas dos PPARs são os com cadeia formada por 16 a 20 átomos de carbono (Xu *et al.*, 1999), sendo que um ligante específico pode se ligar a mais de uma isoforma, embora com diferente grau de afinidade (Desvergne e Wahli, 1999). Ainda, comparados

aos ácidos graxos poliinsaturados, os ácidos graxos saturados possuem, em geral, uma afinidade bem mais baixa por esses receptores (Forman, Chen e Evans, 1997; Kliewer *et al.*, 1997).

Os PPARs se ligam a regiões do promotoras de diversos genes no DNA, chamados de elementos responsivos de resposta ao PPAR (PPRE), formando um heterodímero com o receptor retinóico X (RXR) (Fig. 4) (Desvergne e Wahli, 1999). Depois de ocorrida a ligação na região promotora, ocorre a estimulação e recrutamento de co-reguladores para este local, bem como a modificação na transcrição de genes (Hermanson, Glass e Rosenfeld, 2002).

Figura 4: Mecanismo básico de ação do PPAR (Kersten, Desvergne e Wahli, 2000): quando um ligante agonista se liga ao PPAR, este receptor forma um heterodímero com o *retinoic X receptor* (RXR) e este heterodímero se liga a regiões responsivas específicas do DNA (PPRE) e ativa a transcrição dos seus genes-alvo.

3.1- Ácido linoléico conjugado (CLA)

O ácido linoléico conjugado (CLA) integra uma família de diversos isômeros de 18 átomos de carbono do ácido linoléico (18:2), o qual possui duas duplas ligações *cis* nos carbonos nove e doze (*cis*-9, *cis*-12 ácido octadecanóico) (Silveira *et al.*, 2007). O CLA é produzido por bactérias presentes no trato gastrointestinal de ruminantes, as quais convertem o ácido linoléico em diferentes isômeros de CLA por um processo de biohidrogenização (Kennedy *et al.*, 2010). Esse processo resulta em uma modificação posicional das ligações insaturadas, resultando em uma ligação simples separando as duplas ligações, promovendo uma alteração na conformação da molécula. Existem várias formas isoméricas do CLA: (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *trans*-9, *trans*-11; *cis*-9, *cis*-11; *trans*-10, *trans*-11 e *cis*-10, *cis*-12), sendo que *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 parecem ser os isômeros de maior atividade biológica (Wallace *et al.*, 2007) (Fig. 5).

A descoberta do CLA se deu em 1987, pelas suas propriedades anti-carcinogênicas (Ha, Grimm e Pariza, 1987). Logo depois seus efeitos anti-arterioscleróticos (Mitchell e Mcleod, 2008) e anti-obesidade foram descritos e rapidamente ganharam evidência (Whigham, Watras e Schoeller, 2007).

Pesquisas realizadas com a mistura dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 ou apenas *trans*-10, *cis*-12, mostraram como resultado uma redução na massa de gordura corporal (MGC) em modelos animais (Wang e Jones, 2004; Purushotham *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007). Esses resultados são explicados pela inibição da adipogênese e da lipogênese no tecido adiposo branco (Evans *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2008) e aumento do gasto energético corporal por meio da elevação da taxa metabólica basal (West *et al.*, 2000; Miner *et al.*, 2001; Nagao *et al.*, 2003), apesar deste último ainda ser um efeito bastante controverso na literatura. O CLA parece exercer um efeito modulador do metabolismo hepático e do tecido adiposo por meio da modulação da atividade dos PPARs nesses tecidos (Moya-Camarena *et al.*, 1999).

Figura 5: Estruturas dos isômeros A) CLA *trans*-10, *cis*-12; B) CLA *cis*-9, *trans*-11 e C) ácido linoléico *cis*-9, *cis*-12 (Groff Funck, Barrera-Arellano e Mara Block, 2006).

Pesquisas realizadas com o isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 demonstram que a suplementação com CLA reduz a expressão de PPAR γ e seus genes alvo, envolvidos na síntese e armazenamento de lipídios (Kennedy *et al.*, 2010). No entanto, o mecanismo pelo qual o CLA exerce sua atividade inibitória na expressão e atividade do PPAR γ ainda não é bem compreendido. A diminuição na expressão dos genes-alvo regulados por PPAR γ pode ser consequência da redução na expressão desse receptor ou da inibição da sua atividade pós-translacional (Kennedy *et al.*, 2010), tendo em vista que o PPAR γ induz sua própria expressão. Pesquisas realizadas por Kennedy *et al.* (2010), demonstraram que o CLA primeiro inibe a atividade do receptor, e como consequência, ocorre a diminuição de sua expressão.

Alguns mecanismos tem sido propostos para elucidar a maneira pela qual o CLA reduz a atividade pós translacional do PPAR γ . Ensaios realizados para verificar o grau de afinidade/ativação desse receptor pelo CLA demonstraram que o CLA possui uma baixa capacidade de ativar o receptor, mesmo em altas concentrações. No entanto, também foi demonstrado que o CLA consegue inibir a ação de fortes agonistas de

PPAR γ tais como rosiglitazona e darglitazona (Granlund *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008), indicando que ele poderia atuar como um agonista parcial de baixa afinidade.

Outra forma pela qual o CLA poderia inibir a atividade do PPAR γ é por meio da fosforilação do receptor. A atividade do PPAR γ também pode ser regulada por fosforilação, mediada pela via da *mitogen activated protein kinase* (MAPK) (Hu *et al.*, 1996; Camp, Tafuri e Leff, 1999). O isômero *trans*-10, *cis*-12 do CLA aumenta a fosforilação do receptor, diminuindo sua atividade por vias de degradação proteossômica e de ubiquitinação (Floyd e Stephens, 2002; Brown *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2008).

Por fim, o CLA ainda pode interferir na atividade do PPAR γ em virtude de seus efeitos pró- inflamatórios no tecido adiposo, induzindo a ativação de NF κ B (Chung *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2009), que é conhecidamente um antagonista direto do PPAR γ (Kennedy *et al.*, 2010). Embora o mecanismo pelo qual NF κ B inibe a atividade do PPAR γ não seja bem elucidado, existindo apenas algumas especulações (Evans *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005; Takada, Suzawa e Kato, 2005; Ye, 2008) apud (Kennedy *et al.*, 2010). Um mecanismo proposto por Kennedy *et al.*, (2010) é de que o NF κ B impossibilita que o heterodímero PPAR γ /RXR ligue-se ao DNA, impedindo a transcrição dos seus genes-alvo.

Figura 6: Mecanismos pelos quais CLA *trans*-10, *cis*-12 pode agir como antagonista do CLA (Kennedy *et al.*, 2010): 1) Reduzir a expressão do PPAR γ ; 2) aumentar a degradação do PPAR γ via fosforilação; 3) ativando NF κ B, que impede a ligação do PPAR γ no DNA e consequentemente, a indução dos genes relacionados a lipogênese.

3.1.1- Efeitos do CLA no fígado

O fígado é o órgão que desempenha o papel mais importante na coordenação do metabolismo de lipídios, participando ativamente da metabolização de ácidos graxos e exportação de triacilgliceróis por meio da síntese de lipoproteínas (Rakhshandehroo *et al.*, 2009). Muitos dos estudos envolvendo PPAR α tem focado na função que este receptor desempenha no fígado, já que o PPAR α é a isoforma mais abundante neste órgão (Rakhshandehroo *et al.*, 2009; Jump, 2011; Jump, Tripathy e Depner, 2013).

No fígado, o CLA é um ligante e potente ativador do PPAR α (Forman, Chen e Evans, 1997; Kliewer *et al.*, 1997; Moya-Camarena *et al.*, 1999), o qual controla a expressão de uma série de genes envolvidos na elongação, dessaturação, oxidação e transporte de ácido-graxos (Jump, 2011) bem como a expressão de UCP2 (Choi *et al.*, 2007; Rakhshandehroo *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012). Nosso grupo de pesquisa recentemente demonstrou que a suplementação da dieta de camundongos com uma mistura dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do CLA promoveu um grande aumento na expressão e atividade de UCP2 (Pereira *et al.*, 2012) no fígado. Apesar

disso, na literatura os efeitos do CLA modulando a atividade de várias isoformas de UCPs são diversos e controversos; no entanto, há uma forte tendência que sugere que a principal isoforma modulada por CLA em todos os tecidos é a UCP2 (Pereira *et al.*, 2012).

3.2- Ácido Oleico (OL)

O ácido oléico (18:1), um ácido graxo comumente utilizado na dieta, tem demonstrado exercer efeitos benéficos para a saúde, melhorando quadros clínicos relacionados à obesidade. A dieta mediterrânea, caracterizada por um alto consumo de ácido oléico está relacionada a uma diminuição de riscos de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e síndrome metabólica (Sales-Campos *et al.*, 2013). Os efeitos citoprotetores do ácido oléico foram demonstrados recentemente, dentre eles a capacidade de prevenção de geração de $O_2^{\bullet-}$ induzida por t-BuOOH em células 3T3-L1 pré-tratadas com ácido oléico (Haeiwa *et al.*, 2014), sendo a produção de EROS em excesso um dos fatores-chave associado à síndromes metabólicas e suas manifestações (Kopelman, 2000; Odegaard e Chawla, 2011). Alguns estudos tem demonstrado que ácidos-graxos monoinsaturados (MUFAS), principalmente ácido oléico podem afetar favoravelmente a adiposidade e resistência a insulina em indivíduos obesos (Due *et al.*, 2008) (Paniagua *et al.*, 2007). No entanto, esses trabalhos são ainda muito escassos e não descrevem os mecanismos pelos quais o ácido oléico exerce esses efeitos.

OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste estudo foram verificar se a suplementação da dieta com CLA e ácido oléico, isoladamente ou em conjunto, aumentam o metabolismo corporal e mitocondrial, relacionando parâmetros bioquímicos, moleculares, fisiológicos, morfológicos e funcionais. Nossa hipótese é de que o ácido oléico, o qual também possui características anti-diabéticas e anti-obesidade, possa potencializar os efeitos anti-obesidade do CLA. Ainda, verificamos se a suplementação conjunta com ácido oléico previne efeitos adversos da suplementação da dieta com CLA, como a hipertrofia hepática e resistência a insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais e protocolo experimental

Camundongos C57bl6 machos com quatro semanas de vida foram adquiridos de uma colônia de reprodução do biotério central na Universidade de São Paulo e mantidos em caixas padrão (33 x 23 x 12 cm) em condições de luz (12 horas) e temperatura (22 °C) controladas, acesso *ad libitum* à água filtrada e ração industrial contendo 22 % proteína, 40 % carboidratos e 4 % de gordura. Após um período de adaptação de seis dias, os camundongos (n = 20) foram divididos em quatro grupos, cada um contendo cinco animais (Fig. 7): o grupo Controle, foi suplementado com 0,1 mL de ácido linoléico cinco vezes por semana; o grupo CLA foi suplementado com 0,1 mL ácido linoléico conjugado (*cis*-9, *trans*-10 e *trans*-10, *cis*-12, 45 % de cada isômero) três vezes por semana, e 0,1 mL ácido linoléico duas vezes por semana; o grupo Oléico foi suplementado com 0,1 mL ácido oléico três vezes por semana e 0,1 mL ácido linoléico duas vezes por semana; e o grupo CLA + Oléico foi suplementado com 0,1 mL ácido linoléico conjugado (*cis*-9, *trans*-10 e *trans*-10, *cis*-12, 45 % de cada isômero) três vezes por semana e 0,1 mL ácido oléico duas vezes por semana. A suplementação (Tab. 1) foi feita via oral durante um período de 60 dias e os pesos corporais foram monitorados uma vez por semana. Os grupos de suplementação foram repetidos três vezes, totalizando um número de 15 animais por grupo até a conclusão do trabalho. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº 12.1.1538.53.9.

Figura 7: de divisão dos animais em grupos experimentais: Controle, CLA, Oléico (OL) e CLA + Oléico (CLA + OL).

Tabela 1: esquema da suplementação semanal dos quatro diferentes grupos de camundongos com seus respectivos ácidos graxos. A suplementação foi feita durante um período de 60 dias.

GRUPOS:	Controle	CLA	OL	CLA + OL
segunda	ácido linoléico	CLA	ácido linoléico	CLA
terça	ácido linoléico	ácido linoléico	ácido oléico	ácido oléico
quarta	ácido linoléico	CLA	ácido linoléico	CLA
quinta	ácido linoléico	ácido linoléico	ácido oléico	ácido oléico
Sexta	ácido linoléico	CLA	ácido linoléico	CLA

2- Metabolismo *in vivo*: Calorimetria indireta

Após 15 dias de suplementação foi iniciada a medida do metabolismo corporal dos camundongos por calorimetria indireta utilizando-se calorímetro Sistema Oxylet, Panlab®, Espanha. O experimento foi conduzido utilizando-se quatro gaiolas metabólicas por dia, cada uma contendo um animal de cada grupo, individualmente. Cada um desses animais permaneceu na gaiola durante um período de 48 horas, enquanto tinham seu metabolismo mensurado por meio das seguintes variáveis: volume de oxigênio consumido (VO_2); volume de gás carbônico produzido (VCO_2); coeficiente respiratório (RQ), que é uma relação entre VCO_2/VO_2 , e gasto energético total (EE), sendo $EE = (3,85 + (1,232 \times RQ)) \times VO_2 \times 1,44$. O experimento teve uma duração total de 12 dias, até que todos os animais tivessem o metabolismo determinado.

3- Determinação das concentrações plasmáticas de lipídios

Amostras de sangue de camundongos em jejum por um período de 12 horas foram coletadas das pontas de suas caudas, utilizando-se capilares heparinizados. Métodos enzimáticos colorimétricos (Labtest®, Brasil) foram utilizados para determinar as concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total e colesterol HDL, de acordo com instruções do manual do fabricante.

4- Teste de tolerância à glucose (TTG)

Após 50 dias de suplementação, camundongos em jejum por um período de 12 horas foram submetidos a um teste de tolerância a glucose (TTG) e para tal procedimento foi utilizado um glicosímetro de fita (Onetouch[®] Ultra[®], Johnson & Johnson Company, EUA). Inicialmente, por meio de um corte feito na extremidade da cauda do animal, uma gota de sangue foi utilizada para se determinar a glicemia em jejum (tempo zero) e logo em seguida, os animais foram gavados com solução de glucose (0,4 g/mL). O volume da solução administrada foi calculado para que os animais ingerissem o equivalente a 1,5 gramas de glucose por quilograma corporal. Em seguida, a glicemia foi novamente determinada 15, 30, 60 e 90 minutos após o tempo zero.

5- Extração de tecidos e isolamento de mitocôndrias de fígados

Após 60 dias de suplementação, os animais foram anestesiados em câmara de CO₂ e sacrificados por deslocamento cervical. Seu peso corporal foi, logo em seguida, determinado. Os tecidos adiposos brancos (perigonadal e perirenal), e fígados foram rapidamente retirados e pesados. Os tecidos adiposos e os lóbulos direitos do fígado foram armazenados em freezer -80°C, e o restante dos fígados foram utilizados no isolamento de mitocôndrias. Para isso, o tecido hepático foi picotado em meio contendo sacarose 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2) e EGTA 1 mM a 4 °C acrescido de BSA 0,1 % e homogeneizado em 3 ciclos em homogeneizador rotativo (140 rpm) no gelo. O homogenato resultante foi centrifugado a 4 °C (rotor Hitachi RT15A5) como descrito anteriormente por (Alberici *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2012): após 10 minutos de centrifugação a 700 g, o pellet foi descartado e o sobrenadante foi, então, novamente centrifugado durante 10 minutos 10000 g. A camada lipídica flutuante foi retirada com pipeta de Pasteur e em seguida o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuspensionado delicadamente em 10 mL de meio contendo sacarose 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2) e EGTA 0,1 mM a 4 °C utilizando-se um pincel e novamente foi centrifugado durante 10 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet, contendo mitocôndrias isoladas, foi ressuspensionado em 200 µL de meio contendo sacarose 250 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2). As mitocôndrias foram

utilizadas em procedimentos experimentais dentro de um período máximo de 3 horas após o seu isolamento.

6- Quantificação de proteína mitocondrial

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto. O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio sendo que este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA 1% foi utilizada como padrão.

7- Ensaaios com mitocôndrias isoladas

7.1- Meio de respiração padrão (MRP)

As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de respiração padrão (MRP) contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KCl 65 mM, KH_2PO_4 2 mM, EGTA 0,1 mM e MgCl_2 1 mM a 30°C, na presença de 5 mM de substratos energéticos glutamato e malato (2,5 mM cada), ou succinato (5 mM).

7.2- Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi monitorado utilizando-se um eletrodo do tipo oxygraph-2k (Oroboros Instruments – high resolution respirometry) em câmara de 2 mL de volume, com temperatura controlada (30 °C) e equipada com agitador magnético. A respiração de fosforilação (estado III) foi iniciada adicionando-se 200 nmol ADP/mg de proteína e a respiração de repouso (estado IV) foi alcançado após o ADP adicionado ter sido totalmente consumido. A eficiência de fosforilação (ADP/O) foi calculada através da quantidade de ADP adicionada por quantidade de oxigenio consumido durante o estado III.

7.3- Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

A produção de EROs (H_2O_2) em mitocôndrias isoladas foi monitorada espectrofluorimetricamente (Hitachi F-4500) pela conversão de *Amplex Red*, (N-acetil-3,7-dihidroxiphenoxazina, 10 μM , Molecular Probes), na presença de *Horseradish*

peroxidase (HRP) 0,025 μ M, em resorufina (Fig. 8), um composto altamente fluorescente (Zhou *et al.*, 1997) que absorve e emite de fluorescência em 563 nm e 587 nm respectivamente.

Figura 8: Conversão de Amplex Red® em resorufina. *Horseradish peroxidase* (HRP) utiliza *Amplex red* como doador de elétrons durante a redução de peróxido de hidrogênio em água. O produto resultante, resorufina, é um composto altamente fluorescente.

8- Determinação do estado REDOX do fígado

O estresse oxidativo é definido como um balanço que favorece a produção de EROs sobre as defesas antioxidantes (Ott *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o estado redox do fígado foi determinado pela relação entre glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), as quais representam, junto com suas enzimas relacionadas, uma das formas mais importantes de proteção contra o estresse oxidativo (Ott *et al.*, 2007), e detecção de proteínas carboniladas, um marcador de danos oxidativos em proteínas.

8.1- Determinação da relação glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) do fígado

A quantificação da razão GSH/GSSG foi conduzida de acordo com (Hissin e Hilf, 1976), com modificações.

Para tanto, aproximadamente 30 mg da fração dos fígados armazenados a -80 °C foi utilizada para determinar a relação GSH/GSSG. O fígado foi homogeneizado em 1mL de tampão Tris (0,1 M) e logo em seguida foram adicionados 200 µL de TCA (30 %) seguido de mais uma homogeneização da mistura. O homogenato foi centrifugado a 2000 g por 6 min. Do sobrenadante resultante foram retirados 100 µL para dosagem de GSH e 100µL para GSSG.

8.1.1- Determinação de GSH

Junto aos 100 µL de sobrenadante foram adicionado 2,04 mL de tampão fosfato 100 mM acrescido de EGTA 6 mM e 100 µL de o-ftaldeído (OPT) (1 mg/mL). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e logo em seguida foi realizada a leitura da fluorescência em espectrofluorímetro Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader - Biotek nas condições de 350 nm de excitação e 420 nm de emissão em fenda 5/5.

8.1.2- Determinação de GSSG

Junto aos 100 µL de sobrenadante foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 100 mM acrescido de EGTA 6 mM mais 40 µL de N-etilmaleimido (NEM) 2mM. As amostras foram incubadas à temperatura durante 30 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaOH 1M e 100 µL de OPT (1 mg/mL). Novamente as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e então foi feita a leitura da fluorescência utilizando-se espectrofluorímetro Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader - Biotek nas condições de 350 nm de excitação e 420 nm de emissão em fenda 5/5.

8.2- Determinação de proteína carbonilada

A quantificação de proteínas carboniladas foi realizada utilizando-se método colorimétrico através da reação de 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) com grupo carbonil das proteínas para formar hidrazona (Fig. 9), um composto que pode ser detectado espectrofotometricamente a 370 nm. (Reznick e Packer, 1994).

Para tanto, aproximadamente 50 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris (0,1 M) e depois centrifugado a 1500 g a 4° C durante 10 minutos. Do sobrenadante resultante foram retirados 300 µL para quantificação de proteína carbonilada em triplicata. A esse sobrenadante acrescentou-se 700 µL de água e 2 mL de TCA 10%. A mistura foi agitada em mixer e centrifugada a 500 g a 4° C durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet acrescentou-se 1 mL de DNPH (10 mM) em 2 dos tubos e 1 mL de HCl 2,5M em 1 dos tubos para determinação do branco. Os tubos foram incubados a 37° C na ausência de luz. Em seguida, adicionou-se 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% aos tubos, que permaneceram em banho de gelo durante 10 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 500g a 4 °C durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet resultante foi lavado 2 vezes com 2 mL de etanol:acetato de etila na proporção 1:1. Logo em seguida os tubos foram mais

uma vez centrifugados a 500g a 4 °C durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet resultante foi ressuspendido em 2 mL de guanidina (6 M) e incubado à temperatura ambiente durante 40 minutos, com agitação. A leitura colorimétrica das amostras e de seus respectivos brancos foi realizada em comprimento de onda de 370 nm.

Para a determinação da concentração de proteína carbonilada nas amostras, a quantificação de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (BioRad®) e em seguida, a absorbância foi dividida pela concentração de proteína, e o resultado foi multiplicado pelo seu coeficiente de extinção molar ($18,11 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Figura 9: reação do grupo carbonil das proteínas com 2,4-Dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para formar um complexo DNPH-Proteína carbonilada. Esse complexo pode ser lido em espectrofotômetro a 370 nm.

9- Quantificação de RNAm de proteínas desacopladoras (UCP2) e PPAR α no fígado.

9.1- Extração de RNA

RNA total foi extraído de amostras congeladas de fígado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os pellets de RNA resultantes da extração foram ressuspensos em água DEPC e sua quantificação foi realizada utilizando-se NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®).

9.2- Síntese de cDNA do fígado

1,5 μ g do RNA extraído foram utilizadas para a síntese de cDNA, utilizando-se um mix contendo Oligo dT primers (500 μ g/mL), Buffer RT, MgCl₂ (25 mM), dNTP, RNase (40 u/ μ L) out RT íntron (160 u/ μ L) (Promega- Madison, WI, USA). As amostras contendo RNA e o mix foram incubadas durante 5 minutos a 25 °C, depois por 60 minutos a 42 °C e finalmente por 15 minutos a 70 °C. O cDNA resultante foi diluído (1 μ L cDNA : 3 μ L H₂O) para sua quantificação em real time PCR.

9.3- Real time qPCR

A quantificação de mRNA de UCP2 e PPAR α transcritos foi determinada utilizando-se Eppendorf Realplex4 Mastercycler instrument (Eppendorf), utilizando o reagente SsoFast EvaGreen (BioRad®), conforme as especificações do fabricante.

Primers da Sigma® (UCP2 10 μ M, PPAR α 10 μ M e RPL 10 μ M) foram utilizados na reação. A quantificação relativa da expressão de mRNA de UCP2 e PPAR α foi determinada por normalização com *Ribosomal protein L* (RPL) utilizando-se método $\Delta\Delta$ Ct (De Oliveira *et al.*, 2012). A sequência dos primers utilizados foi: UCP2 – CGGTACACTTTCC CTCTGGATAC[FAM]G e GCGCACTAGCCCTT GACTCTC; RPL – CAA AAT CGC CCT ATT CCT CA e CCC AGC TTC TTG CTC CT e PPAR α – CAT TTC CCT TTG TGT GGC TG e ATC TGG ATG TTG GCT CTG C.

10- Immunoblotting PPAR γ

Um imunoblotting para PPAR γ foi realizado a partir dos tecidos adiposos brancos armazenados a -80°C. Para tanto os tecidos adiposos foram pesados, homogeneizados em tampão RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Triton

X-100 1 %, Deoxicolato 1 %, SDS 0,1 %, acrescidos dos inibidores de proteases: Aprotinina 5 μ M, PMSF 1 mM e Leupeptina 1 μ M e inibidores de fosfatases: Ortovanadato de sódio 10,28 mM, Pirofosfato de sódio 10,09 mM e Fluoreto de sódio 100 mM) e centrifugados durante 20 min 14000 g. A quantidade total de proteína do sobrenadante foi quantificada pelo método de Bradford (BioRad®). Alíquotas do sobrenadante do tecido adiposo (60 μ g de proteína) foram separadas por gel SDS-PAGE (10%) e transferidas para membrana de PVDF utilizando-se equipamento Transblot (BioRad®) com tampão de transferência (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20 %, SDS 0,04 %).

Depois de bloqueadas com leite (10%) as membranas foram incubadas overnight a 4°C com anticorpos primários (1:1000) para PPAR γ e β -actina (Cell Signaling, Technology) e lavadas com tampão TBST (NaCl 0,16 M e Tris 0,02 M). Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit durante 60 minutos à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando-se ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE®), de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, os blots foram digitalizados por fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (BioRad®) e a densitometria das bandas foi determinada pelo software ImageJ®.

11- Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se análise de *variância One-way Anova* seguido do pós-teste de *Newman-Keuls*, aplicados pelo programa estatístico *GraphPad Prism®*, USA. Valores de $P < 0.05$ são considerados significativos.

RESULTADOS

1- Alterações metabólicas corporais

Primeiramente, para verificar se a suplementação da dieta dos camundongos com CLA e ácido oléico, isoladamente ou em conjunto, acarretariam em alterações no metabolismo e no ganho de peso dos camundongos, realizamos um monitoramento do metabolismo corporal por meio de calorimetria indireta, a qual estima o metabolismo por meio das medidas dos volumes de oxigênio consumido (VO_2) e gás carbônico produzido (VCO_2). Esses valores também permitem o cálculo do coeficiente respiratório ($RQ = VCO_2/VO_2$) e do gasto energético total (EE). Na Figura 10, são demonstrados os valores de VO_2 , VCO_2 , RQ e EE de camundongos submetidos à dieta suplementada com ácido linoléico (controles), CLA (CLA), ácido oléico (OL) ou CLA e ácido oléico administrado em conjunto (CLA+OL). Nesses animais, podemos observar elevados valores de VO_2 , VCO_2 e EE tanto em camundongos submetidos à dieta suplementada com CLA (CLA) somente quanto os suplementados com CLA e ácido oléico em conjunto (CLA + OL), quando comparados aos camundongos controle. Nesses animais podemos observar também um ligeiro aumento (porém não significativo, $p < 0.05$) do RQ, indicando uma oxidação de carboidratos levemente mais acentuada, baseando-se nos valores padrões de RQ para cada tipo de substrato, sendo mais próximos a 0,7 para oxidação de gorduras e 1,0 para oxidação de carboidratos (Mcclave *et al.*, 2003). Já a suplementação da dieta dos camundongos apenas com ácido oléico (OL) não alterou nenhum dos parâmetros de metabolismo corporal. Por outro lado, o monitoramento dos pesos dos camundongos durante 50 dias demonstrou que a dieta suplementada com CLA ou oléico, isolados ou em conjunto, não alteram o ganho de peso corporal (Fig. 11). Esses resultados demonstram que a suplementação da dieta com CLA, na presença ou não de ácido oléico, aumenta o metabolismo corporal, assim como mostrado previamente por outros autores (West *et al.*, 1998; Ohnuki *et al.*, 2001), no entanto não reduz o ganho de peso corporal durante 50 dias, como também demonstrado por (Pereira *et al.*, 2012).

Figura 10: Medida do (A) volume de O₂ inspirado (VO₂), (B) volume de CO₂ expirado (VCO₂), (C) quociente respiratório (RQ) e (D) gasto energético (EE) em camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles por calorimetria indireta. ^a P<0,05 vs controle; Média ± dp. ^b P< 0,05 vs CLA; ^c P< 0,05 vs OL. N = 8-11.

Figura 11: Medida do ganho de peso de camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. Média ± dp. N = 5-6.

A suplementação da dieta com o ácido oléico é conhecida por melhorar o perfil lipídico sanguíneo (Kurushima *et al.*, 1995; Sanders, 2001; Gilmore *et al.*, 2011) e a captação de glucose no tecido adiposo (Kalupahana, Moustaid-Moussa e Claycombe, 2012). Com relação a esses parâmetros, a literatura apresenta efeitos controversos da suplementação com CLA, sendo que alguns trabalhos até relatam o CLA como promotor da resistência a insulina (Risérus *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 2010). Dessa forma, verificamos se a suplementação da dieta dos camundongos com CLA e ácido oléico, isoladamente ou em conjunto, alterariam o metabolismo de glucose e lipídeos sanguíneos. As análises do gráfico (Fig. 12A) e a da área sob a curva do gráfico (Fig. 12B) do teste de tolerância a glucose (TTG) demonstraram uma captação de glucose levemente mais rápida ($p = 0.055$) nos camundongos submetidos à dieta suplementada com ácido oléico, tanto os suplementados com oléico somente (OL) quanto os suplementados com oléico em conjunto com CLA (CLA + OL). Nesses mesmos animais, observamos reduções nas concentrações totais de colesterol circulantes quando comparados aos camundongos suplementados com CLA e ainda, verificamos um aumento significativo nas frações de colesterol na HDL (HDL-col) e por consequência uma diminuição nas frações de colesterol contidas em outras lipoproteínas (não-HDL) (Tab. 2). Não foram observadas alterações nas concentrações de triacilgliceróis (TAG) circulantes em nenhum dos grupos suplementados. Esses resultados demonstram que a suplementação da dieta com ácido oléico, associado ou não ao CLA, melhora a sensibilidade a insulina e o perfil lipoproteico do colesterol plasmático.

Figura 12: (A) gráfico e (B) medida da área sob a curva do Teste de Tolerância à Glucose (TTG) aplicado em camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. Média $\pm$ dp. ^a P=0,055 vs controle. N = 3-4.

Tabela 2: Medida dos níveis de lipídios circulantes triacilgliceróis (TAG), colesterol total (Col), colesterol HDL (HDL-col) e colesterol não HDL (Não-HDL) em camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles.

	TAG	Col	HDL-col	Não-HDL
Controle	100.9 $\pm$ 25.5	118.7 $\pm$ 16.3	45.3 $\pm$ 2.9	73.44 $\pm$ 16.12
CLA	103.5 $\pm$ 35.0	125.1 $\pm$ 38.2	45.3 $\pm$ 2.7	85.31 $\pm$ 37.53
OL	119.0 $\pm$ 51.1	101.7 $\pm$ 16.0 ^b	56.9 $\pm$ 12.2 ^{a,b}	45.67 $\pm$ 9.16 ^{a,b}
CLA + OL	97.24 $\pm$ 33.6	94.6 $\pm$ 7.6 ^b	57.7 $\pm$ 11.5 ^{a,b}	38.45 $\pm$ 12.18 ^{a,b}

Valores em mg/dL. Média $\pm$ dp. ^a P<0,05 vs controle; ^b P<0,05 vs CLA. N = 4-9.

Após o período de ganho de peso, os animais foram sacrificados e os pesos dos tecidos adiposos brancos viscerais (TAB) e fígados foram mensurados e relacionados ao peso corporal. Apesar de não observarmos alterações significativas no ganho de peso corporal (Fig. 11), os camundongos suplementados com CLA somente (CLA) e com CLA em conjunto com ácido oleico (CLA + OL) apresentaram redução dos TABs (Fig. 13A) quando comparados aos camundongos controles, sendo o TAB maior nos camundongos CLA + OL quando comparado ao CLA. Somente os camundongos suplementados com CLA sozinho (CLA) apresentaram um aumento significativo no peso do fígado quando comparado aos camundongos controles (Fig. 13B). A hipertrofia hepática e a lipoatrofia induzidas por CLA, descritas por nós (Pereira *et al.*, 2012) e outros autores (De Deckere *et al.*, 1999; Benjamin e Spener, 2009; Kennedy *et al.*, 2010), não tem sido relacionadas ao desvio do acúmulo de lipídeos do tecido adiposo para o hepático na percentagem de CLA usadas neste trabalho. Mais importante, nossos resultados demonstram que a suplementação da dieta com ácido oléico promove uma pequena reversão dos efeitos hipertrófico e atrófico induzidos pela suplementação da dieta com CLA nos tecidos hepático e adiposo, respectivamente, como pode ser observado no grupo CLA+OL.

Figura 13: Peso do (A) tecido adiposo branco e (B) peso do fígado de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA+OL) ou controles. Média $\pm$ dp. ^a $P < 0,05$ vs controle; ^b $P < 0,05$ vs CLA. N=6-9.

Com o intuito de verificar os mecanismos pelos quais o CLA e o Oléico estão modulando o peso do TAB, quantificamos a presença dos *peroxissome proliferator activator receptors* γ (PPAR γ) como forma de avaliar indiretamente sua ativação nesse órgão. O PPAR γ , presente nas isoformas PPAR γ 1 e PPAR γ 2, é um receptor nuclear responsável pela diferenciação de adipócitos e expressão de genes relacionados à síntese de lipídios e captação de glucose no tecido adiposo (Evans, Barish e Wang, 2004; Ahmadian *et al.*, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que o CLA *trans*-10, *cis*-12 diminui drasticamente os níveis de RNAm de PPAR γ 1 e 2 no tecido adiposo (Brown *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2010). De acordo com a detecção por *immunoblotting* (Fig. 14), podemos observar que os camundongos do grupo CLA apresentaram uma quantidade bastante diminuída de PPAR γ 1, a qual aparece totalmente reestabelecida quando o CLA é administrado em conjunto com ácido oléico (CLA + OL). Já os camundongos suplementados apenas com ácido oléico (OL) não apresentaram diferenças no conteúdo de PPAR γ 1, porém demonstraram uma quantidade muito maior de PPAR γ 2 quando comparados aos demais grupos. Visto que a suplementação com oléico reverteu apenas ligeiramente a atrofia no tecido adiposo induzida por CLA (Fig. 13A), e por outro lado, reverteu totalmente o conteúdo de PPAR γ 1, esses resultados sugerem que a adipoatrofia induzida pela suplementação da dieta com CLA não é controlada apenas pela inibição dos PPAR γ 1 nesse tecido.

Figura 14: (A) Conteúdo de PPAR γ e (B) densitometria (intensidade relativa) das bandas de PPAR γ 1 e PPAR γ 2 em relação a β -actina de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. ^a $P < 0,05$ vs controle. Média $\pm$ dp. ^b $P < 0,05$ vs CLA. N = 3.

2- Alterações mitocondriais

Para verificar se o aumento do consumo de O_2 corporal está relacionado a um aumento do metabolismo mitocondrial, realizamos o monitoramento do consumo de O_2 (Fig. 15 - traçados representativos e Fig. 16 - média $\pm$ dp.) por mitocôndrias isoladas de fígados dos animais suplementados com CLA e ácido oléico, isoladamente ou em conjunto. Em mitocôndrias livres de ácidos graxos (isoladas na presença de BSA 0.1%)

e energizadas com glutamato e malato (substratos ligados ao NADH para o complexo I), encontramos semelhantes velocidades de respiração nos estados de fosforilação (estado III) (Fig. 16A) e de repouso (estado IV) (Fig. 16B), e ainda similares razões do controle respiratório (CR = Estado III/Estado IV) (Fig. 16C) e eficiências de fosforilação (ADP/O) (Fig. 16D) entre os grupos. Na presença de 0.2 μ M de ácido linoleico (LA), um ácido-graxo substrato para UCPs, em geral ocorre uma diminuição da velocidade de consumo de O_2 no Estado III (Fig.. 16A) e um aumento na respiração no Estado IV (Fig.. 16B), resultando em decréscimo do CR e da ADP/O. No entanto, a variação do coeficiente respiratório (Δ CR) (Fig.. 16E) e da ADP/O (Δ ADP/O) (Fig.. 16F) entre a ausência e presença de LA foi significativamente maior nos grupos CLA e CLA + OL, ou seja, nos camundongos que receberam CLA na dieta, sugerindo uma maior atividade de UCP nesses grupos. Ainda nesses grupos, quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato, observamos que as variações de CR (Fig. 16G) e da ADP/O (Fig. 16H) não foram alteradas, demonstrando que a atividade dessas proteínas independe do substrato respiratório.

Figura 15: traçados representativos de taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas de fígados de camundongos suplementados com camundongos suplementados com (B) ácido linoléico conjugado (CLA), (C) ácido oléico (OL), (D) ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou (A) controles. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH_2PO_4 2 mM, EGTA 0,1 mM e $MgCl_2$ 1 mM a 30°C, acrescidos de malato e glutamato (5 mM).

Figura 16: Taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas de fígados de camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH_2PO_4 2 mM, EGTA 0,1 mM e MgCl_2 1 mM, a 30°C. (A) Estado III, (B) Estado IV, (C) CR (estado III/estado IV) e (D) razão ADP/O de mitocôndrias incubadas em meio padrão contendo malato e glutamato (5 mM) na ausência ou na presença de 2 μM de LA; (E) Δ CR (CR sem LA – CR com LA) e (F) Δ ADP/O (ADP/O sem LA – ADP/O com LA); (G) Δ CR e (H) Δ ADP/O de mitocôndrias incubadas em meio padrão contendo succinato (5 mM) na ausência ou na presença de 2 μM de LA. ^a $P < 0,05$ vs controle. Média $\pm$ dp. ^b $P < 0,05$ vs CLA; ^c $P < 0,05$ vs OL. N = 4-6.

Para confirmar se os resultados no aumento da razão ADP/O obtidos na respiração mitocondrial são resultado de uma maior expressão/atividade de UCPs, mensuramos os níveis de RNAm da UCP2, a isoforma mais abundante encontrada no fígado. De fato, a Figura 17 mostra uma maior expressão de UCP2 nos fígados dos grupos CLA e CLA+OL, apresentando valores 4,5 vezes maiores do que o grupo controle, sendo a expressão de UCP2 no grupo CLA ainda maior quando comparado ao grupo CLA+OL. Já os camundongos do grupo OL, suplementados apenas com ácido oléico, não apresentaram diferenças na expressão da UCP2. Esses resultados confirmam os resultados publicados anteriormente pelo nosso grupo (Pereira *et al.*, 2012) e indicam ainda que a suplementação da dieta com oléico reverte em parte o aumento da expressão de UCP2 induzida por CLA.

Figura 17: Quantificação de RNAm da UCP2 de fígados de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles, determinadas por real time PCR (RT-PCR) e normalizadas pela expressão do gene constitutivo RPL. Média $\pm$ dp. ^a $P < 0,05$ vs controle; ^b $P < 0,05$ vs CLA. N = 4-6.

Tem sido demonstrado que as UCP são ativadas pelos ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) produzidos na matriz mitocondrial (Echtay *et al.*, 2002). No trabalho anterior do nosso laboratório (Pereira *et al.*, 2012), verificamos que a suplementação da dieta com CLA aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), em reações envolvendo a redução de NAD^+ a NADH no ciclo de Krebs mitocondrial, sugerindo que este seja o

mecanismo pelo qual as UCPs são ativadas nesse tecido. Agora, para verificar os efeitos da suplementação com ácido oléico medimos a produção de H_2O_2 , o produto da dismutação dos $O_2^{\bullet-}$ pela enzima superóxido dismutase, em mitocôndrias isoladas de fígado dos animais suplementados com ácido oléico, isoladamente ou em conjunto com CLA (Fig. 18A e B - traçados representativos e Fig. 18C - média $\pm$ dp.). Nas mitocôndrias dos animais dos grupos CLA e CLA+OL, onde encontramos maior atividade de UCP observamos um aumento na produção de H_2O_2 em relação ao grupo controle (Fig. 18A). Porém, quando energizadas com succinato não observamos mais diferenças significativas na produção de H_2O_2 entre as mitocôndrias desses grupos de animais (Fig. 18B). Já os camundongos que foram suplementados apenas com ácido oléico (OL) apresentaram uma redução muito significativa na produção de H_2O_2 em relação aos outros grupos de animais independente do substrato energético. A redução na produção de EROS nos grupos de animais suplementados com ácido oléico corrobora com as já descritas propriedades anti-oxidantes deste ácido graxo (Kopelman, 2000; Odegaard e Chawla, 2011). Esses resultados indicam mais uma vez que a suplementação da dieta com CLA induz uma maior expressão de UCPs e geração de EROS em reações envolvendo $NAD^+/NADH$. Em adição, verificamos que a suplementação da dieta com o ácido oléico isoladamente, além de não alterar a expressão e atividade de UCPs, reduz a produção de EROS pelas mitocôndrias isoladas de fígado. Apesar disso, quando suplementados em conjunto, o ácido oléico reverte apenas em pequena parte os efeitos induzidos pelo CLA.

Figura 18: (A e B) traçados representativos e (C) Média $\pm$ dp. da geração de EROS em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles, monitorada por Amplex Red. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, KCl 65 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EGTA 0,1 mM e MgCl₂ 1 mM a 30°C, acrescidos de (A) malato+glutamato (5 mM) ou (B) succinato (5 mM). a $P < 0,05$ vs controle; b $P < 0,05$ vs CLA; c $P < 0,05$ vs OL. N = 4-5.

Os efeitos do CLA sobre a expressão de UCP envolvem sua ligação ao PPAR α , visto que esse ácido graxo é um ligante de alta afinidade e ativador desses receptores no fígado (Mandard, Müller e Kersten, 2004). Os PPAR α controlam a expressão do gene responsável pela transcrição da UCP2 no fígado (Rakhshandehroo *et al.*, 2009). Para entendermos a modulação promovida pelo oléico, os níveis de RNAm do próprio PPAR α foram mensurados nos fígados de camundongos suplementados como forma de avaliar indiretamente sua ativação (Fig. 19). Nossos resultados demonstram que não houve diferença significativa na expressão desses receptores entre os grupos. No entanto este experimento não avalia o nível de ativação de PPAR α pelos diferentes tratamentos e nem exclui a possibilidade de cada tratamento induzir diferentemente a expressão de genes-alvo.

Figura 19: quantificação de RNAm de PPAR α de fígados de camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles, determinadas por real time PCR (RT-PCR) e normalizadas pela expressão do gene constitutivo RPL. Média $\pm$ dp. ^a P<0,05 vs controle; ^b P<0,05 vs CLA. N = 5-6.

3- Parâmetros indicativos do estado redox do fígado

Nos últimos anos tem se evidenciado que as EROS atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares (Finkel, 1998; Hensley *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 2005), porém em alguns casos a produção excessiva dessas espécies seguida de uma baixa taxa de sua remoção pode ocasionar danos oxidativos (Freeman e Crapo, 1982; Lee *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 2007). Para verificar se os aumentos nas produções de H_2O_2 , detectadas em mitocôndrias isoladas de fígados de animais suplementados com CLA (grupos CLA e CLA+OL), promovem danos oxidativos ao fígado, foram quantificados parâmetros indicativos do estado redox nesse órgão desses animais, como a razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) e a concentração de proteínas carboniladas. A Tabela 3 mostra que nenhum desses marcadores foi alterado nos grupos CLA, OL e CLA+OL quando comparados aos camundongos do grupo controle.

Tabela 3: Estado Redox dos fígados camundongos suplementados com camundongos suplementados com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido oléico (OL), ácido linoléico conjugado + ácido oléico (CLA + OL) ou controles.

	GSH/GSSG	Proteína Carbonilada (nmol/mg proteína)
Controle	4.7 ± 0.4	1.0 ± 0.2
CLA	5.3 ± 0.6	0.8 ± 0.2
OL	4.2 ± 1.2	1.1 ± 0.5
CLA+OL	5.8 ± 0.4 ^c	1.4 ± 0.2

Média ± dp. ^c P<0,05 vs OL. N = 4-5.

DISCUSSÃO

Recentemente foi demonstrado por pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório que a suplementação da dieta dos camundongos com 1% CLA (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12, 45 % de cada isômero) em dias alternados, reduz a adiposidade, aumenta o fluxo de lipídeos ao fígado sem causar esteatose hepática, e aumenta a expressão e atividade de UCPs (Kennedy *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2012). Aqui, além de confirmarmos esses resultados, demonstramos que essa mesma suplementação aumenta o metabolismo corporal, o qual ainda é um efeito controverso debatido na literatura (West *et al.*, 1998; West *et al.*, 2000; Miner *et al.*, 2001; Terpstra *et al.*, 2002), e ainda os efeitos benéficos da suplementação de ácido oléico em conjunto ao CLA. O ácido oléico por si não altera o metabolismo e a adiposidade corporais, e nem o metabolismo energético mitocondrial.

Nossos resultados comprovam que o ácido graxo indutor de aumento do gasto energético corporal é o CLA e não o oléico. Quando suplementados em conjunto, os efeitos metabólicos do CLA se sobrepõem aos do oléico, mantendo o elevado metabolismo. Apesar dessa modulação do gasto energético, a suplementação da dieta com esses ácidos graxos, juntos ou isoladamente, não reduz o ganho de peso corporal, no entanto outros fatores podem estar influenciando este efeito, como alterações nos padrões de alimentação e movimentação.

O CLA é classicamente conhecido por prevenir o ganho de massa adiposa (Brown e McIntosh, 2003; Wahle, Heys e Rotondo, 2004; Yanagita e Nagao, 2008), principalmente por promover um aumento do gasto energético por meio da indução da expressão de UCPs e inibir a expressão de genes relacionados a lipogênese e adipogênese por meio da inibição da atividade/expressão do PPAR γ (Kennedy *et al.*, 2010). Tem sido demonstrado que o isômero de CLA *trans*-10, *cis*-12 CLA - mas não o *trans*-9, *cis*-11 - diminui drasticamente aos níveis de RNAm de PPAR γ 1 e 2 no tecido adiposo (Brown *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2010). No entanto, em nossos experimentos observamos que CLA reduz principalmente o conteúdo da isoforma PPAR γ 1, enquanto que o ácido oléico, ao contrário, é um ótimo indutor do aumento da isoforma PPAR γ 2 no tecido adiposo. Neste tecido, os PPAR γ quando ativados coordenam a expressão dos genes envolvidos na síntese de lipídios, entre eles o da lipoproteína lípase (LPL), da proteína de ligação de ácidos graxos nos adipócitos (A-

FABP ou aP2), da acil-CoA sintetase, da proteína transportadora de ácidos graxos (FATP) (Kersten, Desvergne e Wahli, 2000), incluindo sua própria expressão (Brown *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2010). As duas principais isoformas expressas, PPAR γ 1 e γ 2, são diferentes entre si em sua região N-terminal, em padrões de expressão e em efeitos biológicos (Li *et al.*, 2013). Enquanto o PPAR γ 1 é expresso de forma ubíqua no organismo, o PPAR γ 2 é expresso predominantemente no tecido adiposo (Brun *et al.*, 1996; Celi, 2002; Celi e Shuldiner, 2002), onde tem sido demonstrado ser o principal coordenador da adipogênese: 4 tipos de mutações no gene codificante do PPAR γ alteram sua função, levando ao desenvolvimento de diabetes, resistência a insulina e obesidade. Três destas mutações são muito raras e comuns as duas isoformas (PPAR γ 1 e 2); a mutação mais comumente encontrada é específica para a isoforma PPAR γ 2 (Celi e Shuldiner, 2002). Ainda, Vidal-Puig *et al* (1996) demonstraram que o o RNAm de PPAR γ 2 está aumentado no tecido adiposo branco de indivíduos obesos, bem como a razão PPAR γ 2/PPAR γ 1, corroborando com resultados obtidos por Zhang *et al* (2004) nos quais camundongos knockout específicos para PPAR γ 2 tiveram o desenvolvimento do tecido adiposo e a sensibilidade à insulina prejudicados. No entanto, recentemente foi demonstrado que camundongos *knockout* para Ppar γ 1^{sv}, uma nova variação de *splicing* descoberta, a qual dá origem ao PPAR γ 1, tem adipogênese gerada por PPAR γ 2 inibida, indicando que o PPAR γ 1 desempenha também um papel crucial na diferenciação de adipócitos (Takenaka *et al.*, 2013). Nesse contexto, as duas isoformas demonstram ser importantes para o desenvolvimento do tecido adiposo, atuando de forma coordenada. Nossos resultados apontam na mesma direção, visto que no tecido adiposo dos camundongos suplementados com oléico, os elevados conteúdos de PPAR γ 2 não implicaram em um ganho maior de massa adiposa, uma vez que o conteúdo de PPAR γ 1 não se alteraram. Já no tecido adiposo dos camundongos suplementados com CLA os baixos conteúdos de PPAR γ 1 são totalmente restabelecidos pela suplementação em conjunto com oléico; no entanto, essa reversão implicou em um ganho mínimo de massa adiposa, sugerindo que outros genes também estejam controlando o processo de atrofia do tecido adiposo por CLA, os quais provavelmente não devem ser genes-alvo da ativação de PPAR γ por oléico.

Como dito anteriormente, a expressão gênica de PPAR γ é controlada pela própria ativação do receptor PPAR γ . O CLA é um ligante de baixa afinidade do PPAR γ no tecido adiposo (Clément *et al.*, 2002; Yu, Correll e Vanden Heuvel, 2002). Nesse

contexto, como mencionado anteriormente, ele parece inibir a atividade/expressão desse receptor por 3 mecanismos propostos: por meio da competição com ligantes de alta afinidade e ativadores desses receptores nucleares (Granlund *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008); por meio da indução da fosforilação desse receptor (via P-ERK), direcionando-o para vias de degradação (Floyd e Stephens, 2002; Brown *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2008); ou por meio da indução de NF κ B (Chung *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2009) impedindo a ligação do heterodímero seu elemento responsivo (PPRE) promotor de diversos genes relacionados á lipogênese e adipogênese (ver Figura 6). Já o ácido oléico, ao contrário do CLA, é um ligante agonista do PPAR γ e indutor da expressão desse receptor em adipócitos (Luo *et al.*, 2013) e em células β pancreáticas de rato (Vassiliou *et al.*, 2009). Portanto, a reversão da expressão de PPAR γ 1 pelo oléico em camundongos suplementados com CLA parece indicar uma competição entre oléico e CLA pela modulação da atividade deste receptor.

Apesar da suplementação da dieta com CLA não ter induzido alterações significativas no metabolismo de glucose e lipídeos sanguíneos, o acréscimo de oléico à suplementação com CLA melhorou a captação de glucose e o perfil lipoproteico do colesterol plasmático. O ácido oléico é um forte agonista de PPAR γ (Vassiliou *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2013), induzindo a expressão de genes relacionados à captação de glucose, como o transportador de glucose sensível a insulina (GLUT4) (Kennedy *et al.*, 2010). Portanto, assim como outros ácidos graxos agonistas de PPAR γ , o ácido oléico promove uma melhora na sensibilidade a insulina no tecido adiposo branco (Kalupahana, Moustaid-Moussa e Claycombe, 2012).

No metabolismo de colesterol, o ácido oléico é conhecido por reduzir o colesterol total e aumentar a relação colesterol HDL/colesterol não-HDL no plasma sanguíneo por aumentar o conteúdo de receptores de LDL no fígado (Kurushima *et al.*, 1995; Sanders, 2001; Gilmore *et al.*, 2011). Além disso, o oléico reduziu o engrandecimento do fígado induzido por CLA, o qual tem sido caracterizado por hipertrofia induzida pela ativação do PPAR α ou excessivo acúmulo de glicogênio (Belury e Kempa-Steczko, 1997; Delany e West, 2000; Halade, Rahman e Fernandes, 2009). Agonistas de PPAR α em excesso podem levar a tumor gênese no fígado agindo como estimuladores de proliferação e diferenciação celular (Beloura *et al.* 1997). No fígado, apesar de nosso experimento indireto para verificar a ativação dos PPAR α (a indução da própria expressão de PPAR α) ter falhado em demonstrar a ativação desses receptores pelas diferentes suplementações, o CLA é conhecido por ser um ligante de

alta finidade e ativador do PPAR α (Forman, Chen e Evans, 1997; Kliewer *et al.*, 1997; Moya-Camarena *et al.*, 1999). Portanto, a reversão do engrandecimento hepático promovido pelo ácido oléico mostra um efeito protetor desse ácido graxo em desenvolvimentos tumorais que podem estar associados à ativação de PPAR α por CLA.

A literatura tem demonstrado o envolvimento de UCP, principalmente da isoforma 2, no aumento do metabolismo corporal promovido pela suplementação da dieta com CLA (Wang e Jones, 2004). No presente trabalho, assim como resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (Pereira *et al.*, 2012) foi demonstrado que o nosso padrão de suplementação da dieta com CLA aumenta a expressão de UCP2 em fígados de camundongos. No fígado, o gene responsável pela transcrição da UCP2 é modulado por PPAR α (Rakhshandehroo *et al.*, 2009), assim como uma série de genes do metabolismo de ácidos graxos (Mandard, Müller e Kersten, 2004). O CLA ativa o PPAR α e modular positivamente o metabolismo hepático *in vivo* e em linhagens de células hepáticas (Moya-Camarena *et al.*, 1999; Benjamin *et al.*, 2005), porém a correlação CLA-PPAR α -UCP2 ainda não foi comprovada. Já sobre o oléico, que é um ligante de PPAR α , porém de baixa afinidade, pouco se sabe sobre seu papel na regulação da expressão de UCP2 (Benjamin *et al.*, 2005). Embora demonstrada a capacidade de se ligar ao PPAR α em células do parênquima hepático de ratos (Xu *et al.*, 1999), o ácido oléico parece não ativar esse receptor (Pawar e Jump, 2003) e nem regular a expressão de seus genes-alvo, como o do citocromo P450 4A2 (CYP4A2) e da acil-CoA oxidase (AOX) (Ren *et al.*, 1997), enzimas importantes para oxidação de ácidos graxos. Em adição, nossos resultados mostram que o oléico não aumenta a expressão de UCP2 e ainda reduz parcialmente a expressão de UCP2 estimulada por CLA, o que parece refletir uma competição entre CLA e oléico pela ligação ao PPAR α , sendo a ligação do oléico um processo não ativador da expressão de UCP.

Outro possível modulador da expressão de UCP são as EROS. Estudos em hepatócitos tratados com lipídios têm demonstrado que a expressão e atividade das UCP dependem de um aumento prévio na produção de EROS (Cortez-Pinto *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Inclusive tem sido proposto uma via de regulação da expressão de UCP2 independente de PPAR α , visto que hepatócitos de ratos *knockout* para PPAR α tiveram a expressão de UCP2 aumentada em condições de estresse oxidativo (Grav *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007); a incubação de células mesencefálicas com sequestrador de EROS (*glutathione ethyl ester*) diminui a expressão de UCP2 induzida por agonista de PPAR α (Zhang *et al.*, 2007). Nossos resultados sugerem que esta seja uma via ativa na

modulação da expressão e atividade de UCP2 nos fígados dos camundongos suplementados com CLA, e ainda, que essas EROS sejam de origem mitocondrial. Nossos resultados demonstram que em fígados com elevada expressão de UCP2 ocorre elevada produção de EROS pelas mitocôndrias, como verificado em camundongos suplementados com CLA, e não nos suplementados com oléico, os quais apresentam baixíssimas produções de EROS. Quando o oléico é adicionado à suplementação com CLA, a elevada produção de EROS é ligeiramente diminuída, assim como expressão de UCP2, demonstrando uma relação direta. Como mostrado anteriormente, essas EROS são geradas em reações envolvendo NAD^+/NADH no ciclo de Krebs (Pereira *et al.*, 2012).

O trabalho de referencia deste estudo (Pereira *et al.*, 2012) demonstrou também uma atividade elevada de UCP em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos suplementados com CLA, a qual é acompanhada da geração de ânions superóxido em reações de oxido-redução ligadas ao NAD^+/NADH no ciclo de Krebs. Sugerimos então que essas EROS estariam ativando as UCPs diretamente na membrana mitocondrial interna, assim como sugerido por (Echtay *et al.*, 2002). Aqui, além de repetirmos esses resultados, mostramos também que a energização dessas mitocôndrias com succinato, uma condição onde a produção de EROS se iguala aos níveis das mitocôndrias de animais controles, a atividade dessas proteínas permanece alta. Esse resultado indica que a regulação da atividade de UCPs por EROS nas mitocôndrias de animais suplementados com CLA esteja mais ligada a um estado redox adquirido durante a suplementação do que a um ataque direto dessas espécies a essas proteínas. Ainda, mostramos que o acréscimo de oléico à suplementação da dieta com CLA, apesar de reduzir parcialmente a expressão de UCP2, não reduz a produção de EROS e nem atividade dessas proteínas em mitocôndrias de fígado, o que mantém o metabolismo mitocondrial alto, assim como o metabolismo corporal.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o ácido graxo responsável por induzir o aumento do gasto energético corporal e mitocondrial hepático é o CLA e não o oléico e quando suplementados em conjunto, os efeitos metabólicos do CLA se sobrepõem aos do oléico, mantendo esses metabolismos elevados. Nesse contexto, observamos que o aumento de metabolismo mitocondrial está relacionado ao aumento de expressão/atividade de proteínas desacopladoras, as quais parecem ser controladas por espécies reativas de O₂ mitocondriais. Ainda, no tecido adiposo branco, o ácido oléico não exerce efeitos atróficos como o CLA, os quais estão relacionados a inibição da expressão de PPAR γ 1, no entanto, verificamos que a suplementação conjunta com ácido oléico previne efeitos adversos da suplementação da dieta com CLA, como a hipertrofia hepática e resistência a insulina. Dessa forma, a suplementação com ácido oléico em conjunto com CLA não potencializa os efeitos deste último ácido graxo, porém não atrapalha a sua ação e ainda previne seus efeitos adversos como a hipertrofia hepática e resistência a insulina, constituindo uma boa estratégia alimentar contra o ganho de peso corporal.

REFERÊNCIAS

AHMADIAN, M. et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 557-66, May 2013. ISSN 1546-170X.

ALBERICI, L. C. et al. Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1228-34, Oct 2006. ISSN 0016-5085.

ANDREYEV AYU et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. **Eur J Biochem**, v. 182, n. 3, p. 585-92, Jul 1989. ISSN 0014-2956.

ASTRUP, A. et al. The role of low-fat diets in body weight control: a meta-analysis of ad libitum dietary intervention studies. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, n. 12, p. 1545-52, Dec 2000.

BELURY, M. A.; KEMPA-STECHKO, A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. **Lipids**, v. 32, n. 2, p. 199-204, Feb 1997. ISSN 0024-4201.

BENJAMIN, S. et al. An improved molecular test system for the screening of human PPAR transactivation by conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 10: 706-715 p. 2005.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutr Metab (Lond)**, v. 6, p. 36, 2009. ISSN 1743-7075.

BIENENGRAEBER, M.; ECHTAY, K. S.; KLINGENBERG, M. H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. **Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 3-8, Jan 1998. ISSN 0006-2960.

BLANC, J. et al. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 388-90, Jan 2003. ISSN 1524-4539.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p. 707-16, Jul 1973. ISSN 0264-6021.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAND-MILLER, J. C. et al. Glycemic index and obesity. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 1, p. 281S-5S, Jul 2002. ISSN 0002-9165.

BROWN, J. M. et al. Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. **J Biol Chem**, v. 279, n. 25, p. 26735-47, Jun 2004. ISSN 0021-9258.

BROWN, J. M.; Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. **J Lipid Res**, v. 44, n. 7, p. 1287-300, Jul 2003. ISSN 0022-2275.

BROWN, J. M.; MCINTOSH, M. K. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. **J Nutr**, v. 133, n. 10, p. 3041-6, Oct 2003. ISSN 0022-3166.

BRUN, R. P. et al. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. **Genes Dev**, v. 10, n. 8, p. 974-84, Apr 1996. ISSN 0890-9369.

CAMP, H. S.; TAFURI, S. R.; LEFF, T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 392-7, Jan 1999. ISSN 0013-7227.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. **Essays Biochem**, v. 20, p. 110-64, 1985. ISSN 0071-1365.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. **Vascular pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 91-97, 2012.

CELI, F. S. The Role of Peroxisome Proliferatoractivated Receptor gamma in Diabetes and Obesity **Current Diabetes Reports**. 2: 179–185 p. 2002.

CELI, F. S.; SHULDINER, A. R. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and obesity. **Curr Diab Rep**, v. 2, n. 2, p. 179-85, Apr 2002. ISSN 1534-4827.

CHOI, J. S. et al. Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. **Br J Nutr**, v. 98, n. 2, p. 264-75, Aug 2007. ISSN 0007-1145.

CHUNG, S. et al. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NFkappaB-dependent cytokine production. **J Biol Chem**, v. 280, n. 46, p. 38445-56, Nov 2005. ISSN 0021-9258.

Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. **Obes Res**, v. 6 Suppl 2, p. 51S-209S, Sep 1998. ISSN 1071-7323.

CLÉMENT, L. et al. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. **J Lipid Res**, v. 43, n. 9, p. 1400-9, Sep 2002. ISSN 0022-2275.

CORTEZ-PINTO, H. et al. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 116, n. 5, p. 1184-93, May 1999. ISSN 0016-5085.

DE DECKERE, E. A. et al. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. **Br J Nutr**, v. 82, n. 4, p. 309-17, Oct 1999. ISSN 0007-1145.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term

melatonin treatment. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2178-88, May 2012. ISSN 1945-7170.

DELANY, J. P.; WEST, D. B. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. **J Am Coll Nutr**, v. 19, n. 4, p. 487S-493S, Aug 2000. ISSN 0731-5724.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr Rev**, v. 20, n. 5, p. 649-88, Oct 1999. ISSN 0163-769X.

DIEHL, A. M.; HOEK, J. B. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "the benefits of losing control". **J Bioenerg Biomembr**, v. 31, n. 5, p. 493-506, Oct 1999. ISSN 0145-479X.

DOONAN, S.; BARRA, D.; BOSSA, F. Structural and genetic relationships between cytosolic and mitochondrial isoenzymes. **Int J Biochem**, v. 16, n. 12, p. 1193-9, 1984. ISSN 0020-711X.

DUE, A. et al. Comparison of 3 ad libitum diets for weight-loss maintenance, risk of cardiovascular disease, and diabetes: a 6-mo randomized, controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 5, p. 1232-41, Nov 2008. ISSN 1938-3207.

ECHTAY, K. S. et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 96-9, Jan 2002. ISSN 0028-0836.

ERDMANN, J. et al. Development of hyperinsulinemia and insulin resistance during the early stage of weight gain. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 3, p. E568-75, Mar 2008. ISSN 0193-1849.

ERNSTER, L.; FORSMARK, P.; NORDENBRAND, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. **Biofactors**, v. 3, n. 4, p. 241-8, Apr 1992. ISSN 0951-6433.

EVANS, M. et al. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, v. 35, n. 8, p. 899-910, Aug 2000. ISSN 0024-4201.

EVANS, M.. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. **J Nutr**, v. 132, n. 3, p. 450-5, Mar 2002. ISSN 0022-3166.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med**, v. 10, n. 4, p. 355-61, Apr 2004. ISSN 1078-8956.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 248-53, Apr 1998. ISSN 0955-0674.

FLATT, J. P. The difference in the storage capacities for carbohydrate and for fat, and its implications in the regulation of body weight. **Ann N Y Acad Sci**, v. 499, p. 104-23, 1987. ISSN 0077-8923.

FLEURY, C. et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat Genet**, v. 15, n. 3, p. 269-72, Mar 1997. ISSN 1061-4036.

FLOYD, Z. E.; STEPHENS, J. M. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 6, p. 4062-8, Feb 2002. ISSN 0021-9258.

FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4312-7, Apr 1997. ISSN 0027-8424.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest**, v. 47, n. 5, p. 412-26, Nov 1982. ISSN 0023-6837.

GAO, Z. et al. Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter. **J Biol Chem**, v. 280, n. 22, p. 21091-8, Jun 2005. ISSN 0021-9258.

GARLID, K. D. et al. How do uncoupling proteins uncouple? **Biochim Biophys Acta**, v. 1459, n. 2-3, p. 383-9, Aug 2000. ISSN 0006-3002.

GARLID, K. D. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J Biol Chem**, v. 271, n. 5, p. 2615-20, Feb 1996. ISSN 0021-9258.

GILMORE, L. A. et al. Consumption of high-oleic acid ground beef increases HDL-cholesterol concentration but both high- and low-oleic acid ground beef decrease HDL particle diameter in normocholesterolemic men. **J Nutr**, v. 141, n. 6, p. 1188-94, Jun 2011. ISSN 1541-6100.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J Biol Chem**, v. 273, n. 18, p. 11038-43, May 1998. ISSN 0021-9258.

GRANLUND, L. et al. Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator. **J Lipid Res**, v. 44, n. 8, p. 1441-52, Aug 2003. ISSN 0022-2275.

GRAV, H. J. et al. Changed energy state and increased mitochondrial beta-oxidation rate in liver of rats associated with lowered proton electrochemical potential and stimulated uncoupling protein 2 (UCP-2) expression: evidence for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha independent induction of UCP-2 expression. **J Biol Chem**, v. 278, n. 33, p. 30525-33, Aug 2003. ISSN 0021-9258.

GROFF FUNCK, L. C.; BARRERA-ARELLANO, D.; MARA BLOCK, J. Ácido Linoléico Conjugado (Cla) e Sua Relação Com a Doença Cardiovascular e os Fatores De Risco Associados. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. scielo_ve, p. 123-134, 2006.

GUAN, Y.; BREYER, M. D. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. **Kidney Int**, v. 60, n. 1, p. 14-30, Jul 2001. ISSN 0085-2538.

HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v. 8, n. 12, p. 1881-7, Dec 1987. ISSN 0143-3334.

HADVÁRY, P.; LENGSELD, H.; WOLFER, H. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. **Biochem J**, v. 256, n. 2, p. 357-61, Dec 1988. ISSN 0264-6021.

HAEIWA, H. et al. Oleic acid promotes adaptability against oxidative stress in 3T3-L1 cells through lipohormesis. **Mol Cell Biochem**, v. 386, n. 1-2, p. 73-83, Jan 2014. ISSN 1573-4919.

HALADE, G. V.; RAHMAN, M. M.; FERNANDES, G. Effect of CLA isomers and their mixture on aging C57Bl/6J mice. **Eur J Nutr**, v. 48, n. 7, p. 409-18, Oct 2009. ISSN 1436-6215.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev**, v. 52, n. 8 Pt 1, p. 253-65, Aug 1994. ISSN 0029-6643.

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 10, p. 1456-62, May 2000. ISSN 0891-5849.

HERMANSON, O.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 2, p. 55-60, Mar 2002. ISSN 1043-2760.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, Jul 1976. ISSN 0003-2697.

HU, E. et al. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2100-3, Dec 1996. ISSN 0036-8075.

JABŮREK, M. et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26003-7, Sep 1999. ISSN 0021-9258.

JAMES, W. P. The epidemiology of obesity: the size of the problem. **J Intern Med**, v. 263, n. 4, p. 336-52, Apr 2008. ISSN 1365-2796.

JUMP, D. B. Fatty acid regulation of gene transcription. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 41, n. 1, p. 41-78, 2004. ISSN 1040-8363.

JUMP, D. B.. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14, n. 2, p. 115-20, Mar 2011. ISSN 1473-6519.

JUMP, D. B.; TRIPATHY, S.; DEPNER, C. M. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. **Annu Rev Nutr**, v. 33, p. 249-69, 2013. ISSN 1545-4312.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Mol Aspects Med**, v. 33, n. 1, p. 26-34, Feb 2012. ISSN 1872-9452.

KENNEDY, A. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPARgamma activity in primary cultures of human adipocytes. **J Nutr**, v. 138, n. 3, p. 455-61, Mar 2008. ISSN 1541-6100.

KENNEDY, A et al. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 3, p. 171-9, Mar 2010. ISSN 1873-4847.

KENNEDY, A. et al. Conjugated linoleic acid-mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes are attenuated by resveratrol. **J Lipid Res**, v. 50, n. 2, p. 225-32, Feb 2009. ISSN 0022-2275.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 421-4, May 2000. ISSN 0028-0836.

KIDANI, Y.; BENSINGER, S. J. Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. **Immunol Rev**, v. 249, n. 1, p. 72-83, Sep 2012. ISSN 1600-065X.

KLEIN, S. et al. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. **Circulation**, v. 110, n. 18, p. 2952-67, Nov 2004. ISSN 1524-4539.

KLEIN, S.; WADDEN, T.; SUGERMAN, H. J. AGA technical review on obesity. **Gastroenterology**, v. 123, n. 3, p. 882-932, Sep 2002. ISSN 0016-5085.

KLIEWER, S. A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4318-23, Apr 1997. ISSN 0027-8424.

KLINGENBERG, M.; ECHTAY, K. S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. **Biochim Biophys Acta**, v. 1504, n. 1, p. 128-43, Mar 2001. ISSN 0006-3002.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, Apr 2000. ISSN 0028-0836.

KOWALTOWSKI, A. J.; NETTO, L. E.; VERCESI, A. E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem**, v. 273, n. 21, p. 12766-9, May 1998. ISSN 0021-9258.

KURUSHIMA, H. et al. Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. **Biochim Biophys Acta**, v. 1258, n. 3, p. 251-6, Oct 1995. ISSN 0006-3002.

KUSHNER, R. F. Weight loss strategies for treatment of obesity. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 56, n. 4, p. 465-72, 2014 Jan-Feb 2014. ISSN 1873-1740.

LEE, F. Y. et al. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 677-87, Mar 1999. ISSN 0270-9139.

LEHNINGER, Albert. *Lehninger Principles Of Biochemistry* & EBook Author: Albert Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, Publisher: W. H. 2008.

LI, L. et al. Expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 versus gamma 2, and their association with intramuscular fat in goat tissues. **Gene**, v. 528, n. 2, p. 195-200, Oct 2013. ISSN 1879-0038.

LIU, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Biosci Rep**, v. 17, n. 3, p. 259-72, Jun 1997. ISSN 0144-8463.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J Neurochem**, v. 80, n. 5, p. 780-7, Mar 2002. ISSN 0022-3042.

LUO, W. et al. [Effects of oleic acid on expression of adiponectin and its PPARgamma mechanism in 3T3-L1 adipocytes]. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 42, n. 2, p. 245-9, Mar 2013. ISSN 1000-8020.

MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 4, p. 393-416, Feb 2004. ISSN 1420-682X.

MARTYN, J. A.; KANEKI, M.; YASUHARA, S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. **Anesthesiology**, v. 109, n. 1, p. 137-48, Jul 2008. ISSN 1528-1175.

MCCLAVE, S. A. et al. Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 27, n. 1, p. 21-6, 2003 Jan-Feb 2003. ISSN 0148-6071.

MILLER, J. R. et al. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. **J Lipid Res**, v. 49, n. 3, p. 550-62, Mar 2008. ISSN 0022-2275.

MINER, J. L. et al. Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. **Obes Res**, v. 9, n. 2, p. 129-34, Feb 2001. ISSN 1071-7323.

MITCHELL, Peter. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144-148, 1961.

MITCHELL, P. L.; MCLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. **Biochem Cell Biol**, v. 86, n. 4, p. 293-301, Aug 2008. ISSN 0829-8211.

MONSALVE, F. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 549627, 2013. ISSN 1466-1861.

MOYA-CAMARENA, S. Y. et al. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. **J Lipid Res**, v. 40, n. 8, p. 1426-33, Aug 1999. ISSN 0022-2275.

MUNSTERS, M. J.; SARIS, W. H. Body weight regulation and obesity: dietary strategies to improve the metabolic profile. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 5, p. 39-51, 2014. ISSN 1941-1413.

NAGAO, K. et al. The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. **Nutrition**, v. 19, n. 7-8, p. 652-6, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0899-9007.

NICHOLLS, D. G.; LOCKE, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiol Rev**, v. 64, n. 1, p. 1-64, Jan 1984. ISSN 0031-9333.

NÈGRE-SALVAYRE, A. et al. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. **FASEB J**, v. 11, n. 10, p. 809-15, Aug 1997. ISSN 0892-6638.

ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 275-97, 2011. ISSN 1553-4014.

OHNUKI, K. et al. Increased energy metabolism and suppressed body fat accumulation in mice by a low concentration of conjugated linoleic acid. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, n. 10, p. 2200-4, Oct 2001. ISSN 0916-8451.

OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-22, May 2007. ISSN 1360-8185.

PANIAGUA, J. A. 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**, v. 30, n. 7, p. 1717-23, Jul 2007. ISSN 1935-5548.

PAWAR, A.; JUMP, D. B. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 38, p. 35931-9, Sep 2003. ISSN 0021-9258.

PEREIRA, A. F. et al. Administration of a murine diet supplemented with conjugated linoleic acid increases the expression and activity of hepatic uncoupling proteins. **J Bioenerg Biomembr**, v. 44, n. 5, p. 587-96, Oct 2012. ISSN 1573-6881.

PEREIRA-LANCHI, L. O. et al. Body fat regulation: is it a result of a simple energy balance or a high fat intake? **J Am Coll Nutr**, v. 29, n. 4, p. 343-51, Aug 2010. ISSN 1541-1087.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. Sorting out the functional role(s) of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in cell proliferation and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, n. 2, p. 230-41, Dec 2009. ISSN 0006-3002.

PURUSHOTHAM, A. et al. Maintenance of adiponectin attenuates insulin resistance induced by dietary conjugated linoleic acid in mice. **J Lipid Res**, v. 48, n. 2, p. 444-52, Feb 2007. ISSN 0022-2275.

RADI, R. et al. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **J Biol Chem**, v. 266, n. 32, p. 22028-34, Nov 1991. ISSN 0021-9258.

RAKHSHANDEHROO, M. et al. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6796, 2009. ISSN 1932-6203.

REN, B. et al. Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **J Biol Chem**, v. 272, n. 43, p. 26827-32, Oct 1997. ISSN 0021-9258.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879.

RHEE, S. G. et al. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 2, p. 183-9, Apr 2005. ISSN 0955-0674.

RISÉRUS, U. et al. Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 25, n. 9, p. 1516-21, Sep 2002. ISSN 0149-5992.

RODEN, M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. **Int J Obes (Lond)**, v. 29 Suppl 2, p. S111-5, Sep 2005. ISSN 0307-0565.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. **J Biol Chem**, v. 276, n. 41, p. 37731-4, Oct 2001. ISSN 0021-9258.

ROUSSET, S. et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S130-5, Feb 2004. ISSN 0012-1797.

SALEH, M. C.; WHEELER, M. B.; CHAN, C. B. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. **Diabetologia**, v. 45, n. 2, p. 174-87, Feb 2002. ISSN 0012-186X.

SALES-CAMPOS, H. et al. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini Rev Med Chem**, v. 13, n. 2, p. 201-10, Feb 2013. ISSN 1875-5607.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 2001. ISSN 0028-0836.

SANDERS, T. A. Olive oil and the Mediterranean diet. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 71, n. 3, p. 179-84, May 2001. ISSN 0300-9831.

SCHRAUWEN, P. et al. Increase in fat oxidation on a high-fat diet is accompanied by an increase in triglyceride-derived fatty acid oxidation. **Diabetes**, v. 49, n. 4, p. 640-6, Apr 2000. ISSN 0012-1797.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 23, p. 10771-8, Nov 1994. ISSN 0027-8424.

SIES, H.; MOSS, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur J Biochem**, v. 84, n. 2, p. 377-83, Mar 1978. ISSN 0014-2956.

SILVEIRA, M. B. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity. **Public Health Nutr**, v. 10, n. 10A, p. 1181-6, Oct 2007. ISSN 1368-9800.

SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS letters**, v. 294, n. 3, p. 158-162, 1991.

SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1363, n. 2, p. 100-24, Feb 1998. ISSN 0006-3002.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, n. 9467, p. 1333-46, 2005 Apr 9-15 2005. ISSN 1474-547X.

TAKADA, I.; SUZAWA, M.; KATO, S. Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Pharmacol Sci**, v. 97, n. 2, p. 184-9, Feb 2005. ISSN 1347-8613.

TAKENAKA, Y. et al. A Novel Splicing Variant of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (Ppar γ 1sv) Cooperatively Regulates Adipocyte Differentiation with Ppar γ 2. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65583, 2013. ISSN 1932-6203.

TERPSTRA, A. H. et al. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. **J Nutr**, v. 132, n. 5, p. 940-5, May 2002. ISSN 0022-3166.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 237, n. 2, p. 408-14, Mar 1985. ISSN 0003-9861.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**, v. 191, n. 2, p. 421-7, Nov 1980. ISSN 0264-6021.

VASSILIOU, E. K. et al. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. **Lipids Health Dis**, v. 8, p. 25, 2009. ISSN 1476-511X.

VIDAL-PUIG, A. J. et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. **J Biol Chem**, v. 275, n. 21, p. 16258-66, May 2000. ISSN 0021-9258.

WAHLE, K. W.; HEYS, S. D.; ROTONDO, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? **Prog Lipid Res**, v. 43, n. 6, p. 553-87, Nov 2004. ISSN 0163-7827.

WALLACE, R. J. et al. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. **J Lipid Res**, v. 48, n. 10, p. 2247-54, Oct 2007. ISSN 0022-2275.

WALTER, A.; GUTKNECHT, J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. **J Membr Biol**, v. 77, n. 3, p. 255-64, 1984. ISSN 0022-2631.

WANG, Y. W.; JONES, P. J. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, n. 8, p. 941-55, Aug 2004.

WEST, D. B. et al. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. **J Nutr**, v. 130, n. 10, p. 2471-7, Oct 2000. ISSN 0022-3166.

WEST, D. B.. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. **Am J Physiol**, v. 275, n. 3 Pt 2, p. R667-72, Sep 1998. ISSN 0002-9513.

WHIGHAM, L. D.; WATRAS, A. C.; SCHOELLER, D. A. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 5, p. 1203-11, May 2007. ISSN 0002-9165.

W. H. O. **Obesity: preventing and managing the global epidemic** Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894): 252 p. 2000.

WINKLER, Edith; KLINGENBERG, Martin. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2508-2515, 1994.

XU, H. E. et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell**, v. 3, n. 3, p. 397-403, Mar 1999. ISSN 1097-2765.

YANAGITA, T.; NAGAO, K. Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17 Suppl 1, p. 189-91, 2008. ISSN 0964-7058.

YE, J. Regulation of PPARgamma function by TNF-alpha. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 374, n. 3, p. 405-8, Sep 2008. ISSN 1090-2104.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, v. 74, n. 1, p. 139-62, Jan 1994. ISSN 0031-9333.

YU, Y.; CORRELL, P. H.; VANDEN HEUVEL, J. P. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1581, n. 3, p. 89-99, Apr 2002. ISSN 0006-3002.

ZHANG, X. et al. Uncoupling protein-2 up-regulation and enhanced cyanide toxicity are mediated by PPARalpha activation and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 223, n. 1, p. 10-9, Aug 2007. ISSN 0041-008X.

ZHI, J. et al. Metabolic profiles of minimally absorbed orlistat in obese/overweight volunteers. **J Clin Pharmacol**, v. 36, n. 11, p. 1006-11, Nov 1996. ISSN 0091-2700.

ZHOU, Mingjie et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.