



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Michelle Teixeira Teixeira

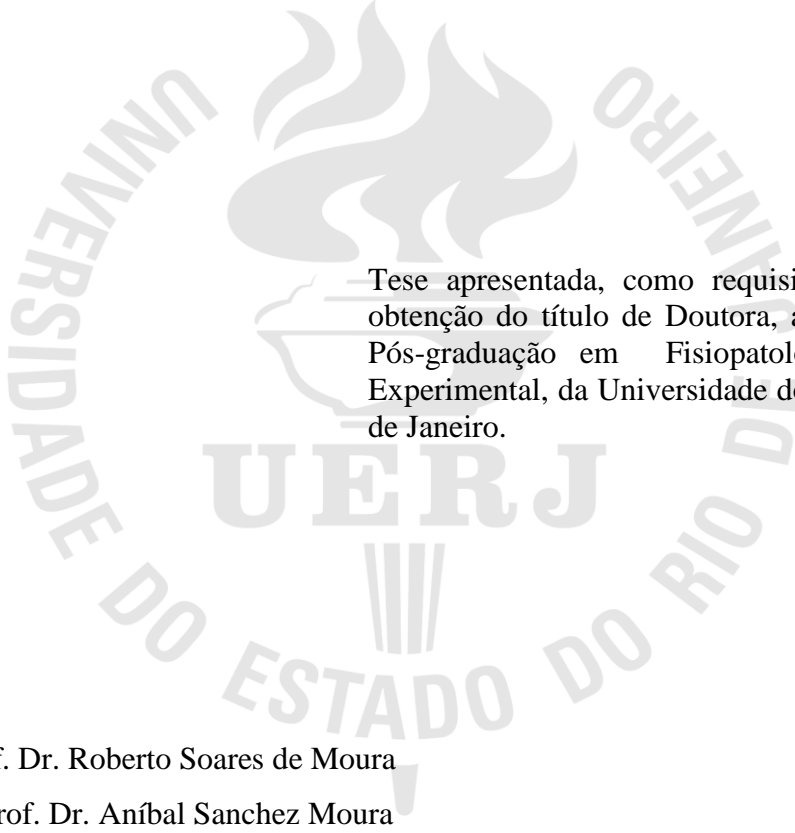
**Efeito do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* mart (açai) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em prole adulta de mães submetidas à dieta rica em ácido graxo trans durante a lactação**

Rio de Janeiro

2012

Michelle Teixeira Teixeira

**Efeito do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* mart (açai) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em prole adulta de mães submetidas à dieta rica em ácido graxo trans durante a lactação**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

T266 Teixeira, Michelle Teixeira.  
Efeito do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* mart (açai) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em prole adulta de mães submetidas à dieta rica em ácido graxo trans durante a lactação / Michelle Teixeira Teixeira.  
109 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Moura.  
Coorientador: Aníbal Sanchez Moura.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Doenças cardiovasculares – Teses. 2. Açai – Uso terapêutico. 3. Lactação – Teses. I. Moura, Roberto Soares de. II. Moura, Aníbal Sanchez. III Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 615.711

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Michelle Teixeira Teixeira

**Efeito do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* mart (açai) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em prole adulta de mães submetidas à dieta rica em ácido graxo trans durante a lactação**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de março de 2012.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Dayane Ognibene  
Universidade Estadual da Zona Oeste

---

Prof. Dra. Tatiana Brunini  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes -UERJ

Rio de Janeiro

2012

## DEDICATÓRIA

À minha mãe (in memoriam), que mesmo nos seus últimos dias de vida apoiou a minha ausência para que esse doutorado fosse finalizado, em busca do meu sucesso.

Ao meu marido que nesta longa trajetória poucas vezes me viu “desconcentrada”, e estava ali sempre a espera do momento do relaxamento, meu porto seguro.

Ao meu pai, que preencheu o vazio que deixei em minha mãe e no meu marido, com amizade, companheirismo e amor.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar tanta força, por me fazer acreditar que meu dia tem mais do que 24 horas e que eu sou capaz. E principalmente por confortar meu coração nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e minha irmã por me darem todo o apoio necessário nesta jornada, acreditarem no meu sucesso, torcerem por mim e vibrarem a cada vitória.

Ao meu marido Claudio Daniel, por dividir comigo e acreditar nos meus sonhos, mais do que eu mesma, por conhecer o mundo da ciência e crer nele, por me acalmar todas as vezes que entrei em desespero e pelo amor inigualável que me dá todos os dias.

A minha afilhada Giulia Teixeira, que sempre na minha ausência questionava: “*Dinda, já vai trabalhar de novo? Por quê?*”, mas na minha presença me enchia de alegria e paz.

Ao Prof. Dr. Roberto Soares de Moura pelo exemplo de vida e profissionalismo, pelo ensinamento e principalmente pela amizade em todos os momentos. Você é tudo que idealizo na carreira de docência, muito obrigada pela oportunidade. A você toda minha admiração.

Ao Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura por prontamente confiar em mim e apoiar a realização do meu doutorado com grandes contribuições científicas. Obrigada.

À Prof. Ângela Resende pelo excelente comando do grupo, e pela atenção e revisão do trabalho.

À Grazielle Freitas de Bem, minha um dia estagiária e agora doutoranda, por ser minhas terceira e quarta mãos na realização deste trabalho, pela dedicação, pelo colo amigo. Sem você com certeza este trabalho não seria o mesmo.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia, especialmente à Dayane Ognibene, Lenize Carvalho, Cristiane Aguiar, Giselle França, Viviane Cordeiro, Taline Amaral, Paola Oliveira, Andréa Emiliano, Ana Paula Rocha, Lúcia Alves, Amanda Vieira, Ana Elisa e Marcelo Vieira por todo o apoio e as mais divertidas confraternizações.

Ao Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento pela colaboração, especialmente a Anátalia Vieira, Vivian Mello e Érica Patrícia Garcia.

À Sandra Barbosa, do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular - UERJ, pela amizade desde a faculdade e colaboração nos experimentos de morfologia.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Transporte de Membranas: Marcela Anjos Martins, Natália Rodrigues Pereira, Cristiane Matssura, Monique Moss, Ive Sab, Wanda

Mury, Marcia Ferraze Daniel Medeiros e aos Professores Tatiana Brunini e Antonio Cláudio Mendes Ribeiro, pela amizade e colaboração durante o doutorado.

À Mariana, responsável pelo biotério da Farmacologia, por cuidar dos animais com tanta presteza.

Aos professores do curso de pós graduação e também aos colegas de turma do doutorado pelo aprendizado e amizade.

À Maria Amélia Souza, secretária do FisCLINEX, pela paciência em me atender as inúmeras vezes que a procurei, pelo carinho e abraço apertado nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao Prof. Dr. Alex Manhães e Prof. Patrícia Lisboa pela preocupação e dedicação ao curso de Pós-graduação FisCLINEX.

À equipe de Nutrição do Hospital da Lagoa, que seguiu muitos plantões para que meus experimentos fossem realizados.

À equipe de professores e minha coordenadora Célia Lopes, da Universidade Gama Filho, que me apoiaram na realização deste trabalho. Em especial à amiga Juliana Latini, que sabe como é duro chegar até aqui e me apoiou em todos os momentos.

Aos meus amigos que me incentivaram sempre e compreenderam minhas ausências, especialmente aos meus amigos do colégio e da faculdade, vocês que viram toda minha trajetória, vamos embora que tem mais.

As agências de fomento FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), CNPQ (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho, meu muito obrigada.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se  
arrepende.

*Leonardo da Vinci*



## RESUMO

TEIXEIRA, Michelle Teixeira. *Efeito do extrato hidroalcoólico de euterpe oleracea mart (açai) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em prole adulta de mães submetidas à dieta rica em ácido graxo trans durante a lactação*. 2012. 109 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O consumo elevado de Ácidos Graxos Trans (AGT) tem sido relacionado com dislipidemia, resistência à insulina, obesidade e doença cardiovascular. Quando consumido pela mãe durante a lactação pode ser passado pelo leite e causar alterações permanentes no desenvolvimento. Estudos sobre a *Euterpe oleracea Mart* (Açaí), planta típica do Brasil, rica em polifenóis, mostram seu efeito antioxidante, anti-hipertensivo e vasodilatador. Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito do Extrato de Caroço de Açaí (ASE – 200mg/kg/dia) sobre as alterações cardiovasculares e metabólicas em prole adulta de mães que receberam AGT na lactação. Foram formados 4 grupos: Controle; Controle+ASE (dieta padrão+ASE); Trans, mães alimentadas com trans e prole adulta com dieta padrão; e Trans+ASE, cujas mães receberam dieta rica em trans na lactação e ASE. Foram avaliados a massa corporal, pressão arterial, reatividade vascular, estresse oxidativo, lipidograma, glicemia e sensibilidade à insulina (índice de HOMA). Não houve diferença na massa corporal tanto aos 21 quanto aos 90 dias de idade e na quantidade de gordura corporal. O consumo de AGT não levou a disfunção endotelial, avaliada pela resposta à acetilcolina. Entretanto, houve elevação na pressão diastólica de animais Trans. Nos grupos tratados com ASE encontramos valores menores de pressão sistólica para o grupo controle e da pressão diastólica para o grupo Trans. Os animais do grupo Trans apresentaram níveis plasmáticos aumentados na carbonilação de proteínas indicando dano oxidativo. Quanto as enzimas antioxidantes, apenas a atividade da catalase está diminuída em plasma e rim no grupo Trans, porém o tratamento com ASE aumentou estes níveis. O ASE também modulou positivamente os níveis glutatona peroxidase. O grupo Trans apresentou resistência à insulina aos 90 dias de vida, entretanto o grupo tratado com ASE apresentou melhor resposta à insulina, avaliada pelo teste de tolerância à glicose. Como não foi encontrada diferença na expressão das proteínas da cascata de sinalização de insulina com o uso de ASE em tecido cardíaco e adiposo, é possível que a diminuição do dano oxidativo esteja contribuindo para a melhora da sensibilidade à insulina. O grupo Trans apresentou hipertrigliceridemia, que foi reduzida pelo tratamento com ASE. O colesterol total, esteve maior no grupo Trans porém não foi modificado pelo tratamento com o uso do ASE. O estudo demonstrou que o consumo de AGT na lactação induziu a prole adulta a desenvolver resistência a insulina, hipercolesterolemia, pressão arterial elevada e dano oxidativo plasmático. Entretanto o uso concomitante de ASE durante a lactação preveniu a resistência a insulina e o aumento de triglicédeos demonstrando efeito protetor de fatores de risco para doença cardiovascular

Palavras-chave: Programação metabólica. Ácido graxo trans. Extrato de caroço de açaí. Resistência à insulina. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The high consumption of Trans Fatty Acids (TFA) has been associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity and cardiovascular disease. During lactation, the AGT consumed are passed to offspring via breast milk and cause permanent changes in development. Studies on the *Euterpe oleracea* Mart (Acai), a typical plant of Brazil, rich in polyphenols, show its antioxidant effect, anti-hypertensive and vasodilator. Therefore, we evaluated the effect of Açai Stone Extract (ASE - 200mg/kg/day) on cardiovascular and metabolic alterations on the adult offspring of mothers who received AGT lactation. Pregnancy females were divided into 4 groups: Control, Control + ASE (ASE + standard diet), trans, trans and mothers fed a standard diet adult offspring, and Trans + ASE, whose mothers were fed a diet rich in trans during lactation and ASE. We assessed body mass, blood pressure, vascular reactivity, oxidative stress, lipid profile, blood glucose and insulin sensitivity (HOMA). There was no difference in body mass both at 21 and at 90 days of age and the amount of body fat. The consumption of TFA did not lead to endothelial dysfunction, as assessed by response to acetylcholine. However, there was an increase in diastolic blood pressure of animals Trans. In the groups treated with ASE we find lower values of systolic pressure in the control group and diastolic blood pressure for the group Trans. Trans group animals showed increased plasma levels in protein carbonylation indicating oxidative damage. As the antioxidant enzymes, only the catalase activity is decreased in Trans group in the kidney and plasma, but ASE treatment increased these levels. The ASE also positively modulated glutathione peroxidase levels. Trans group presented insulin resistance at 90 days of life, however, the ASE-treated group showed a better response to insulin, since the glucose tolerance test. Since ASE treatment not show difference in adipose and cardiac protein expression of insulin signaling cascade, it is possible that the reduction of oxidative damage is contributing to the improvement in insulin sensitivity. Trans group showed hypertriglyceridemia, which was reduced by ASE treatment. The total cholesterol, was higher in trans group, but there was no difference with ASE treatment. The study showed that TFA consumption during lactation induced in adult offspring insulin resistance, hypercholesterolemia, high blood pressure and plasma oxidative damage. In addition, the concomitant use of ASE, prevented insulin resistance and increased triglyceridemia showing a protective effect of risk factors for cardiovascular disease.

**Keywords:** Metabolic programming. Trans fatty acid. Açai Stone extract. Insulin resistance. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação das configurações <i>cis</i> e <i>trans</i> dos ácidos graxos .....	22
Figura 2 –	Resumo da função biológica da insulina. ....	31
Figura 3 –	Cascata de sinalização da insulina em células musculares.....	34
Figura 4 -	Possível interação entre estresse oxidativo, disfunção endotelial e a pressão arterial.....	41
Figura 5 -	Representação esquemática das espécies reativas e a ação das enzimas antioxidantes.....	43
Figura 6 -	Fruto da <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).....	44
Figura 7-	Foto do Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	51
Figura 8-	Consumo materno de ração (A) e de líquido (B) durante o período da lactação – 21 dias.....	60
Figura 9-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o peso corporal aos 21 dias (A) e aos 90 dias de vida (B) dos machos da prole de ratas submetidas à dieta trans durante a lactação, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE.....	61
Figura 10-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a Pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) (mmHg) com machos com 3 meses.....	62
Figura 11-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico, da prole de machos com 3 meses.....	63
Figura 12-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico, da prole de machos com 3 meses.....	64
Figura 13-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis de TBARS em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses.....	66
Figura 14-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a carbonilação de proteínas em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses.....	68
Figura 15-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a atividade da enzima SOD em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses.....	70

Figura 16-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a atividade da enzima catalase em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses.....	72
Figura 17-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a atividade da enzima GPx em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) em da prole de machos com 3 meses.....	74
Figura 18-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o conteúdo total de nitrito em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses.....	76
Figura 19-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis de triglicérides (A) e colesterol total (B) da prole de machos com 3 meses.....	77
Figura 20-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o peso do tecido adiposo da prole de machos com 3 meses.....	78
Figura 21-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis glicêmicos (A), insulinêmicos (B), o índice de HOMA (C) e o índice de HOMA BcC (D) da prole de machos com 3 meses.....	80
Figura 22-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis glicêmicos no teste de tolerância à glicose (A), na área sobre a curva do TTG (B), no teste de tolerância à insulina (C) e na área sobre a curva do ITT (D) da prole de machos com 3 meses.....	82
Figura 23-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre as expressões de IR (A), Akt (B), relação Akt/P-Akt (C) e GLUT-4 (D) de tecido cardíaco da prole de machos com 3 meses.....	84
Figura 24-	Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre as expressões de IR (A), Akt (B), relação Akt/P-Akt (C) e GLUT-4 (D) de tecido adiposo da prole de machos com 3 meses.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos).....	36
Tabela 2 – Composição de macronutrientes da ração industrializada específica para ratos Nuvilab <sup>®</sup> .....	49
Tabela 3 – Composição das rações experimentais específicas para ratos balanceadas pela Rhoster <sup>®</sup> .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20-HETE -	Ácido 20-hidroxieicosatetranóico
ACC -	Acetil-CoA carboxilase
ACh -	Acetilcolina
AGL -	Ácido Graxo de Cadeia Longa
AGT -	Ácido Graxo Trans
Akt -	Tirosina quinase A
Ang II -	Angiotensina II
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE -	Extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí
AVC -	Acidente Vascular Cerebral
Ca <sup>2+</sup> -	Cálcio
COX-1 -	Ciclooxigenase 1
COX-2 -	Ciclooxigenase 2
CPT-1 -	Carnitina-palmitoil acil transferase-1
CYP450 -	Citocromo P450
DAC -	Doença Arterial Coronariana
DM2 -	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA -	Ácido Desoxiribonucleico
ecSOD -	Superóxido dismutase extracelular
EDRF -	Fator relaxante derivado do endotélio
EGF -	Fator de crescimento epidermal
eNOS -	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs -	Espécies Reativas ao Oxigênio
FAS -	Ácido graxo sintetase
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
GLUT4 -	Transportador de glicose - 4
GMPc -	3', 5' guanosina monofosfato cíclico
GPx -	Glutathione Peroxidase
GR -	Glutathione reduzida
GSH -	Glutathione
GTP -	Guanosina trifosfato
GTT -	<i>Glucose Test Tolerance</i>
H <sub>2</sub> O -	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	Peróxido de Hidrogênio
HAS -	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL -	Lipoproteína de Alta Densidade
ICAM -	Molécula de adesão intercelular
IGF-1 -	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL-1 -	Interleucina 1
IL-6 -	Interleucina 6
iNOS -	Óxido Nítrico Sintase induzível
INPI -	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IR -	Receptor de insulina
IRS -	Substrato de Receptor de Insulina
ITT -	<i>Insulin Test Tolerance</i>
JAK2 -	Janus quinase A do tipo 2
LC- PUFA -	Ácido Graxo Poliinsaturado de Cadeia Longa
LDL -	Lipoproteína de baixa densidade

LPL –	Lipoproteína Lipase
Mn-SOD -	Superóxido Dismutase – Manganês
MDA –	Malodialdeído
n-3 –	Ômega 3
n-6 –	Ômega 6
NO –	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> -	Ânion superóxido
OH –	Radical Hidroxil
OMS –	Organização Mundial de Saúde
ONOO <sup>-</sup> -	Espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito
PA –	Pressão Arterial
PAD –	Pressão Arterial Diastólica
PAS –	Pressão Arterial Sistólica
PAI-1 –	Inibidor de ativador de Plasminogênio 1
PCT -	Patent Cooperative Treaty
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK-1 -	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3-K -	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP <sub>3</sub> -	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PPAR -	Receptor ativador da proliferação peroxissomal
RI –	Resistência à Insulina
SOD –	Superóxido Dismutase
SREBP-1c -	Proteína de ligação ao elemento regulador do esterol-1c
TBARS –	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG –	Triglicerídeos
TNF- $\alpha$ –	Fator de necrose tumoral - alfa
VCAM –	Molécula de adesão celular-vascular
VLDL –	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
1.1	<b>Impressão e programação metabólica</b> .....	19
1.2	<b>Ácido Graxo Trans (AGT)</b> .....	21
1.2.1	<u>Fontes dietéticas e ingestão de ácidos graxos trans</u> .....	23
1.2.2	<u>Efeitos metabólicos dos ácidos graxos trans</u> .....	26
1.2.3	<u>Ácido graxo Trans X Programação metabólica</u> .....	29
1.3	<b>Insulina e Resistência à Insulina (RI)</b> .....	31
1.4	<b>Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)</b> .....	35
1.5	<b>Endotélio e Disfunção Vascular</b> .....	37
1.6	<b>Estresse Oxidativo</b> .....	39
1.7	<b>Sistema de Defesa Antioxidante</b> .....	42
1.8	<b>Extrato Hidroalcoólico do Caroço do Açaí (ASE)</b> .....	44
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	46
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	46
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
3.1	<b>Obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço do Açaí (ASE)</b> .....	47
3.2	<b>Modelo animal e dieta experimental</b> .....	47
3.3	<b>Consumo alimentar</b> .....	50
3.4	<b>Medida da pressão arterial</b> .....	50
3.5	<b>Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de rato</b> .....	50
3.6	<b>Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas</b> .....	51
3.7	<b>Análise bioquímica do sangue</b> .....	52
3.7.1	<u>Análise da glicose plasmática</u> .....	52
3.7.2	<u>Análise da insulina plasmática</u> .....	52
3.7.3	<u>Índice de HOMA</u> .....	53
3.7.4	<u>Perfil lipídico</u> .....	53
3.8	<b>Teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina</b> .....	53
3.9	<b>Peso da gordura epididimal e retroperitoneal</b> .....	54
3.10	<b>Atividade das enzimas antioxidantes</b> .....	54
3.10.1	<u>Medida da Superóxido Dismutase</u> .....	54



3.10.2	<u>Medida da Catalase</u> .....	55
3.10.3	<u>Medida da Glutathiona Peroxidase</u> .....	55
3.11	<b>Ensaio pró oxidantes</b> .....	56
3.11.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u> .....	56
3.11.2	<u>Carbonilação de proteínas</u> .....	56
3.12	<b>Medida de nitrito</b> .....	57
3.13	<b>Dosagem de proteínas</b> .....	57
3.14	<b>Biologia Molecular (Western Blotting) do IR, Akt, p-Akt e GLUT-4 do tecido cardíaco e adiposo</b> .....	58
3.15	<b>Análise estatística</b> .....	59
4	<b>RESULTADOS</b> .....	60
4.1	<b>Parâmetros maternos durante a gestação</b> .....	60
4.2	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre o peso corporal da prole (machos)</b> .....	61
4.3	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre a Pressão Arterial Sistólica e Diastólica</b> .....	62
4.4	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da Acetilcolina em LAM</b> .....	63
4.5	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da Nitroglicerina em LAM</b> .....	64
4.6	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre os Ensaio pró-oxidantes</b> .....	65
4.6.1	<u>Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)</u> .....	65
4.6.2	<u>Carbonilação de proteínas</u> .....	67
4.7	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre a Atividade das Enzimas Antioxidantes</b> .....	69
4.7.1	<u>Superóxido Dismutase (SOD)</u> .....	69
4.7.2	<u>Catalase</u> .....	71
4.7.3	<u>Glutathiona Peroxidase (GPx)</u> .....	73
4.8	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre os Níveis de Nitrito</b> .....	75
4.9	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre o Perfil Lipídico</b> .....	77
4.10	<b>Efeito do tratamento crônico com ASE sobre o Tecido Adiposo</b> .....	78

4.11	<b>Efeito do tratamento crônico com ASE sobre a Glicemia e Resistência à Insulina.....</b>	79
4.12	<b>Efeito do tratamento crônico com ASE sobre o Teste de Tolerância à Glicose e à Insulina.....</b>	81
4.13	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas da Cascata de Sinalização da Insulina no Tecido Cardíaco.....</b>	83
4.14	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas da Cascata de Sinalização da Insulina no Tecido Adiposo.....</b>	85
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	87
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	93
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	94

## INTRODUÇÃO

A associação entre nutrição no início da vida e surgimento de doenças crônicas na vida adulta proporcionou a conceituação de impressão (imprinting) e programação (programming) metabólica. Neste contexto, estudos experimentais e epidemiológicos apontam a fase pré-natal (gestacional) e pós-natal (imediatamente após o nascimento) como sendo o período crítico para a ocorrência da impressão metabólica (Godfrey & Robinson, 1998; Aalinkeel *et al.*, 2001). Estudos desenvolvidos por diversos grupos têm mostrado que, alterações hormonais, nutricionais e ambientais no início da vida repercutem no desenvolvimento e no surgimento de doenças na vida adulta (Moura *et al.*, 2008).

A nutrição materno infantil pode ter um papel crucial no desenvolvimento do feto durante a gestação e também para a criança após o nascimento (Enke *et al.*, 2011). Diversos estudos vêm sugerindo que os ácidos graxos trans (AGT) consumidos pela mãe durante a gestação passam para o feto através da placenta e são incorporados nos tecidos fetais, mostrando clara exposição fetal à nutrição materna (Larqué *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 1997; Moore & Dhopeswarkar, 1980).

Os AGT são ácidos graxos insaturados com ao menos uma dupla ligação na configuração *trans*, ou seja, os dois átomos de hidrogênio dos carbonos adjacentes apontam para direções opostas. Os AGT presentes na dieta, em sua maioria, são oriundos de gordura parcialmente hidrogenada, podendo ser encontrados em alimentos como margarinas duras e algumas cremosas, formulações de base para sopas e cremes, creme vegetal, gordura vegetal hidrogenada, biscoitos, sorvetes, pães, batatas fritas, *fast - food*, produtos de pastelaria, bolos, massas, biscoitos, entre outros (Tinoco *et al.*, 2007; Larqué *et al.*, 2001). A ingestão deste tem sido fortemente relacionada com dislipidemia, disfunção endotelial, inflamação sistêmica, adiposidade e resistência à insulina (Mozaffarian *et al.*, 2006; Micha & Mozaffarian, 2008).

Crescentes evidências, inclusive em estudos epidemiológicos, sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra a doença cardiovascular (Stoclet *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005). Este efeito benéfico dos polifenóis pode ser devido a diferentes ações como antioxidante (Frankel *et al.*, 1993) que aumenta a biodisponibilidade do NO, vasodilatação (Fitzpatrick *et al.*, 2000) e/ou propriedades anti-hipertensivas (Soares de Moura *et al.*, 2002; 2004 a,b). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é estudar do consumo do extrato de caroço de Açaí (ASE), rico em antioxidantes, sobre alterações cardiovasculares e metabólicas da prole adulta de mães submetidas a dieta normocalórica rica em ácidos graxos trans, oferecidas exclusivamente durante a lactação.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Impressão e Programação Metabólica

Encontra-se bem estabelecido na literatura por diferentes estudos, tanto em animais quanto em humanos, que existe uma forte associação entre alterações, principalmente nutricionais, no início da vida com o surgimento de doenças crônicas na vida adulta (Barker,1990; Langley, 1994; Waterland, 1999; Kavanagh *et al.*, 2010; Alfaradhi & Ozanne, 2011).

A associação entre nutrição no início da vida e surgimento de doenças crônicas na vida adulta proporcionou a conceituação de impressão (imprinting) e programação (programming) metabólica. O termo impressão é utilizado para definir o resultado de um fenômeno no qual uma condição adversa, durante momentos específicos da vida denominados "janela ontogênica crítica" (critical ontogenic window), pode gerar alterações morfológicas, celulares e moleculares, de caráter permanente no indivíduo, o que a longo prazo o predisporia à doença crônica (Desai & Hales,1997).

Neste contexto, estudos experimentais e epidemiológicos apontam a fase pré-natal (gestacional) e pós-natal (imediatamente após o nascimento) como sendo o período crítico para a ocorrência da impressão metabólica (Godfrey & Robinson, 1998; Aalinkeel *et al.*, 2001). Como resultado desta impressão, ocorre uma programação metabólica irreversível, que predispõe ao surgimento de doenças crônico-degenerativas na vida adulta.

O processo de programação é caracterizado por uma limitada susceptibilidade a períodos ontogênicos do desenvolvimento, efeitos persistentes até a vida adulta e que podem ser medidos ou especificados variando de indivíduo para indivíduo e a relação dose resposta ou limiar entre uma exposição específica e efeitos futuros (Lucas, 2000; Langley-Evans & MacMullen, 2010).

Estudos desenvolvidos por diversos grupos têm mostrado que, alterações hormonais, nutricionais e ambientais no início da vida repercutem no desenvolvimento e no surgimento de doenças na vida adulta (Emiliano *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2008), uma vez que o crescimento alterado, excessivo ou prejudicado, durante períodos de plasticidade, no ambiente perinatal e mesmo após o nascimento, pode levar a programação permanente dos sistemas fisiológicos (Cotrell & Ozanne, 2008).

Waterland *et al.* (2003) mostraram que o fenótipo dos mamíferos pode ser persistentemente alterado por influências nutricionais através de um mecanismo conhecido por regulação epigenética. A epigenética é o estudo de modificações hereditárias na expressão gênica que não são mediadas por alterações na sequência de DNA, mas sim por metilações do DNA e modificações na estrutura da cromatina. Evidências em ratos apontam que estas modificações, ao contrário do que se pensava, podem ser transmitidas hereditariamente (Rakyan *et al.*, 2001).

Um dos primeiros estudos que efetivamente comprovou a relação entre nutrição no início da vida e surgimento de doenças crônicas na fase adulta, foi realizado em indivíduos do sexo masculino, cujas mães sofreram restrição alimentar nos dois primeiros trimestres de gravidez, durante a segunda guerra mundial, no período da fome holandesa (1944 a 1945). Foi observado que aos 19 anos de idade esses indivíduos apresentavam 80 % mais obesidade do que àqueles cujas mães não sofreram restrição alimentar no mesmo período (Ravelli *et al.*, 1976).

O processo de impressão e programação metabólica é uma seleção natural sofrida pelos indivíduos que possibilita modificações fenotípicas importantes para garantia de sua sobrevivência frente a deficiências nutricionais e condições de estresse. Entretanto, diante de uma situação de abundância de nutrientes, esses organismos programados para sobreviver em condições de escassez, passam a estar em risco para desenvolvimento de doenças como obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão (Moura *et al.*, 2008). Diversos outros autores demonstraram que animais desnutridos no período gestacional tornam-se obesos, hipertensos e apresentam alteração da sensibilidade à insulina (Langley & Jackson, 1994; Waterland, 1999; De Souza Caldeira Filho & Moura, 2000).

Posteriormente, diversos estudos observaram que também a nutrição materna durante a lactação está associada à obesidade dos lactentes quando adultos (Barker, 1995; Sichieri *et al.*, 2002), evidenciando a importância das influências ambientais, especialmente as nutricionais, também no período pós natal.

Em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, a baixa estatura (importante indicador de desnutrição pregressa) foi associada positivamente com a incidência de hipertensão arterial na vida adulta e tal relação mostrou-se ainda mais evidente em homens do que em mulheres (Sichieri *et al.*, 2000a). Estes mesmos autores, em outro estudo, ao relacionarem desnutrição no início da vida com obesidade na fase adulta, observaram maior incidência em mulheres (Sichieri *et al.*, 2000b), evidenciando o caráter gênero-dependente dos resultados obtidos.

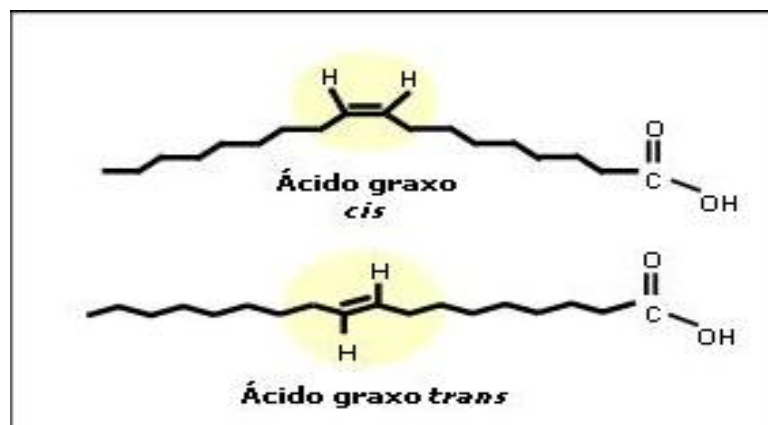
Pode-se observar, portanto, que muitas são as evidências tanto em estudos epidemiológicos quanto em experimentais, que a nutrição em um período crítico da vida pode influenciar no surgimento de processos patológicos na fase adulta.

## 1.2 Ácidos Graxos Trans (AGT)

Os lipídeos podem ser submetidos a numerosas manipulações tecnológicas com o propósito de melhorar suas características físico – químicas, sua aparência, suas propriedades organolépticas e sua estabilidade (Gagliardi *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2007). Um dos procedimentos tecnológicos mais utilizados é a hidrogenação catalítica, que permite obter formas mais sólidas e semi-sólidas dos óleos vegetais, facilitando seu manejo e principalmente sua estabilidade à oxidação. Por este motivo, a hidrogenação é amplamente utilizada na obtenção de margarinas, gordura para fritura e gordura técnica (*shortenings*) para consumo doméstico e industrial, por conferir aos produtos, especialmente aos de panificação, maior maciez (Hansen, 1994).

No decorrer do processo de hidrogenação, algumas das duplas ligações dos ácidos graxos são eliminadas, enquanto uma proporção significativa de duplas ligações *cis* são isomerizadas através de conversão *cis-trans* e de mudança posicional ao longo da cadeia (Valenzuela, 1995). Um óleo totalmente hidrogenado é obtido quando todas as duplas ligações são saturadas no processo. Do contrário, tem-se a hidrogenação parcial, usualmente empregada (Valenzuela, 1995).

Os AGT são ácidos graxos insaturados com ao menos uma dupla ligação na configuração *trans*, ou seja, os dois átomos de hidrogênio dos carbonos adjacentes apontam para direções opostas. Na natureza, os ácidos graxos geralmente são encontrados na configuração *cis* onde os hidrogênios ligados aos carbonos da dupla ligação se encontram do mesmo lado (Tinoco *et al.*, 2007). O ângulo da dupla ligação dos AGT é menor do que na configuração *cis*, além de a cadeia acil ser mais linear, o que origina uma molécula mais rígida, com maior ponto de fusão e estabilidade termodinâmica (Larqué *et al.*, 2001) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação das configurações *cis* e *trans* dos ácidos graxos. Na estrutura *cis* os hidrogênios encontram-se no mesmo lado da molécula, enquanto na *trans* estão em lados opostos. Fonte: Disponível em [www.nutritotal.com.br](http://www.nutritotal.com.br)

O processo de hidrogenação parcial dos ácidos graxos poli-insaturados é utilizado de forma abrangente na indústria alimentar e é o responsável pela geração de maior parte das gorduras trans consumidas atualmente. O uso de gorduras parcialmente hidrogenadas acelerou-se a partir da década de 1960, em resposta às recomendações contra o consumo de gordura animal rica em gordura saturada e colesterol, devido aos efeitos deletérios sobre o perfil lipídico e aterosclerótico. Os ácidos graxos hidrogenados seriam uma boa alternativa para indústria de alimentos devido a sua instabilidade, baixo custo, disponibilidade e funcionalidade (Gagliardi et al., 2009). Porém, em 1990, Mensink & Katan fizeram um importante trabalho mostrando os efeitos deletérios do AGT sobre o perfil lipídico.

Atualmente, os AGT têm sido motivo de preocupação no meio científico devido à elevação, nas últimas décadas, do consumo de margarinas em substituição à manteiga e do crescente aumento da utilização da gordura vegetal hidrogenada na indústria alimentícia. Além disso, as gorduras hidrogenadas e margarinas nacionais apresentam um conteúdo de AGT superior àquele encontrado em similares estrangeiros (Chiara et al., 2003).

Os últimos dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, referentes aos anos de 2002 e 2003, revelam consumo cada vez maior, principalmente entre os mais jovens, de alimentos ricos em AGT, como margarinas, sorvetes, biscoitos e batatas fritas, produzidos em nosso País (Scherr & Ribeiro, 2007).

A concentração de AGT varia com a extensão e processamento do óleo utilizado. Geralmente, observa-se menor conteúdo de AGT em margarinas quando comparadas às gorduras técnicas (*shortennings*), sendo a escolha dos ingredientes um dos fatores que

interfere nesta variabilidade (Ribeiro *et al.*, 2007). Sabe-se que no Brasil, os principais óleos utilizados para hidrogenação são o de soja, palma e algodão, sendo a variação do conteúdo de AGT totais na margarina de 12,3 a 38,1 %, nos cremes vegetais de 15,9 a 25,1 % e nas gorduras técnicas de 25 a 40 % (Barrera-Arellano & Block, 1996). Em amostras de sorvetes cremosos encontrou-se de 12,7 a 45,1 % (Kawashima & Soares, 1993), e em biscoitos recheados de 21,4 a 48,3 % (Aued-Pimentel *et al.*, 2003).

Além dos óleos vegetais, os óleos de peixe, também conhecidos como óleos marinhos, podem ser utilizados para hidrogenação. Esta prática é comum em alguns países da América do Sul e Europa e possibilita a obtenção de margarinas e gorduras técnicas mais baratas (Morgado *et al.*, 1999).

### 1.2.1 Fontes dietéticas e ingestão de ácidos graxos trans

Os AGT presentes na dieta, em sua maioria, são oriundos de gordura parcialmente hidrogenada, podendo ser encontrados em alimentos como margarinas duras e algumas cremosas, formulações de base para sopas e cremes, creme vegetal, gordura vegetal hidrogenada, biscoitos, sorvetes, pães, batatas fritas, *fast - food*, produtos de pastelaria, bolos, massas, biscoitos, entre outros (Tinoco *et al.*, 2007; Larqué *et al.*, 2001).

Entretanto, os AGT sempre estiveram presentes na alimentação humana através do consumo de alimentos provenientes de animais ruminantes. Os AGT produzidos pelos ruminantes são originados da bio-hidrogenação do rúmen pelas bactérias intestinais desses animais, sendo o ácido trans vacênico ou ácido rumênico (C18:1 11t) o predominante (Aro *et al.*, 1997). A bio-hidrogenação representa pequena contribuição adicional ao consumo e ocorre por digestão de gorduras ingeridas por animais ruminantes poligástricos, sendo consequência da ação de enzimas do rúmen (Ribeiro *et al.*, 2007; Chiara *et al.*, 2002).

Embora o consumo desses isômeros possa ocorrer pela ingestão de produtos lácteos ou que contenham gordura e carne de origem bovina e/ou caprina, estima-se que esta contribua apenas com 1 - 8 % do total de gorduras ou menos de 0,5 % do VET diário (Scherr & Ribeiro, 2007) da ingestão de AGT, enquanto que a gordura hidrogenada contribui com 80 - 90 % (Larqué *et al.*, 2001). Os óleos refinados apresentam níveis razoavelmente pequenos (1,0 - 1,5 %) de AGT, mas sua reutilização, principalmente no preparo de alimentos fritos, pode tornar significativa a sua contribuição na ingestão diária de AGT (Martin *et al.*, 2004)



Os níveis de ingestão dietética de AGT dependem do estilo de vida, de hábitos alimentares e do nível sócio econômico da população (Fernandéz-San Juan, 2009). De acordo com as IV Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, não há consenso sobre a quantidade máxima permitida de gordura trans na dieta. No entanto, é recomendável que a ingestão de gordura presente deve ser inferior a 1 % do total de calorias (Sposito *et al.*, 2007). A recomendação da ANVISA (2003) é que o consumo de AGT não deve exceder 2 g / dia para adultos. A OMS (Organização Mundial de Saúde) propõe o consumo de menos de 1 % do VET (Valor Energético Total) diário.

A estimativa do consumo médio de AGT, baseado em questionário alimentar é de 13 g / dia, ou 2,6 % da dieta nos Estados Unidos e Canadá (Fernandéz-San Juan, 2009; Castro *et al.*, 2009). Segundo o estudo TRANFAIR conduzido na Europa por Hulshof e colaboradores em 1999, foi encontrado um menor consumo de AGT em países da área mediterrânea, como Itália e Portugal, e maior em países como Islândia, Noruega e Holanda (1,5 a 2,0 %) (Fernandéz-San Juan, 2009).

Estudos realizados no Brasil sobre a ingestão de AGT na dieta demonstram consumo acima do proposto pela OMS. Entre uma população de descendentes de japoneses residentes em Bauru, SP, foi encontrado consumo de 3,3 % do VET diário entre os homens e 3,4 % entre as mulheres (Bertolino *et al.*, 2006). Mais recentemente, Castro *et al.* (2009) encontrou consumo de 5 g / dia na cidade de São Paulo, ou o correspondente a 2,4 % do VET diário, indicando estar havendo uma redução no consumo de AGT. Nesta população, a margarina foi o alimento responsável por mais de 35 % do consumo de AGT (Castro *et al.*, 2009).

Chiara *et al.* (2003), em estudo realizado com alimentos habitualmente consumidos pela população brasileira, observaram que a descrição da composição de alguns produtos no rótulo, não coincidia com os teores encontrados nas análises, destacando-se em muitas amostras teores elevados de AGT, especialmente o ácido elaídico. Os resultados do estudo evidenciam que os produtos com gordura hidrogenada devem sofrer inspeção mais cautelosa quanto aos teores de AGT.

Além disso, foi demonstrado por diversos autores que batatas fritas e gordura hidrogenada brasileiras apresentam conteúdo do AGT superior à similares estrangeiros (Chiara *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 1999; Lake *et al.*, 1996). Esta diferença pode ser justificada pela defasagem em cerca de vinte anos entre o início da produção de gordura hidrogenada no Brasil e nos Estados Unidos.

Sabe-se que o conhecimento dos danos à saúde gerados pelos AGT, conforme será discutido adiante, tem ocasionado modificações progressivas na legislação, visando a inclusão

de maiores informações para os consumidores. A ingestão moderada deste tipo de gordura, com fins de promoção da saúde e redução do risco de doenças coronarianas, tem sido recomendada pela Organização Mundial de Saúde desde 1995. Em 1999, a “Food and Drug Administration (FDA)” sugeriu que a quantidade de AGT fosse incluída em rótulos de produtos, recomendando, quando computada em gorduras saturadas, a demarcação por símbolo informativo da quantidade específica de AGT. No Brasil, portaria da ANVISA, datada de 17/10/1997, estabelecia que a quantidade de AGT deveria estar computada como ácidos graxos saturados, contudo permanecendo desconhecidos os teores específicos de AGT (Lei nº 8078, 1990).

Entretanto, o Código de Defesa do Consumidor Brasileiro no artigo 31, determina que os produtos ofertados à população devam apresentar declarações corretas e objetivas a respeito de suas características quanto à qualidade, quantidade e composição, entre outras, além dos riscos que oferecem à saúde dos consumidores. A Resolução RDC nº 360, de 23/12/2003, harmonizada no Mercosul, obriga a declaração dos AGT na rotulagem nutricional dos alimentos. As empresas tiveram prazo até 31/7/2006 para adequação, devendo o teor de gorduras trans ser declarado em relação à porção harmonizada para um determinado alimento, em conjunto com as declarações para gorduras totais e saturadas. São considerados como zero trans os alimentos que apresentarem teor de gorduras trans menor ou igual a 0,2 g / porção. Infelizmente, sugere-se que a indústria ao reduzir o conteúdo de AGT nos produtos eleva o conteúdo de gordura saturada, que também pode afetar perfil lipídico e risco de doença cardiovascular (Gagliardi *et al.*, 2009).

Mais recentemente, alguns autores demonstraram que os AGT não derivam apenas da dieta, mas podem ser sintetizados endogenamente a partir de ácidos graxos *cis*. Esta formação endógena está relacionada ao estresse oxidativo tanto em condições fisiológicas (Ferrerri *et al.*, 2005) quanto em patológicas, particularmente na inflamação (Balazy *et al.*, 2000). Zambonin *et al.* (2006) demonstraram que animais que consumiram dieta isenta de AGT, ao serem submetidos a estresse oxidativo por irradiação gama, apresentaram altas concentrações de AGT em plasma, fígado, coração e rins. Os mesmos autores observaram que a formação de AGT foi reduzida com a adição de carotenóides e retinol na dieta, devido aos seus efeitos antioxidantes.

O mesmo grupo observou ainda, em trabalho mais recente, que a idade dos animais influencia a síntese endógena de AGT. Neste trabalho os autores compararam animais de 4 meses de idade com animais de 30 meses de idade, alimentados com dieta isenta de AGT e submetidos a estresse oxidativo *in vivo*. Os resultados demonstraram que os animais de 30

meses apresentaram conteúdo de AGT em coração e rim significativamente superior comparados aos animais de 4 meses. Os autores acreditam que isto se dê possivelmente pela disfunção dos sistemas antioxidantes presente nos idosos (Zambonin *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Efeitos metabólicos dos ácidos graxos trans

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80 a 90 % das pessoas morrem de doença coronariana têm um ou mais fatores de risco diretamente associados a estilo de vida, hábitos alimentares, atividade física e outros passíveis de modificação (WHO, 2001). Dentre os hábitos alimentares, a ingestão de AGT tem sido fortemente relacionada, uma vez que está envolvida com dislipidemia, disfunção endotelial, inflamação sistêmica, adiposidade e resistência à insulina (Mozaffarian *et al.*, 2006; Micha & Mozaffarian, 2008).

A absorção e transporte dos AGT são similares a outros ácidos graxos dietéticos, sendo incorporados aos ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídios. O produto final de seu catabolismo é também, assim como nos ácidos graxos *cis*, dióxido de carbono e água (Vidgren *et al.*, 1998).

Os AGT não são excluídos da atividade metabólica dos tecidos corporais (Carlson *et al.*, 1997), sendo incorporados no cérebro, fígado, tecido adiposo, baço e também placenta, plasma e leite. As quantidades incorporadas nos tecidos geralmente refletem o conteúdo destes ácidos graxos na dieta (Larqué *et al.*, 2001; Tinoco, 2007) e os teores encontrados em tecido adiposo refletem o consumo por longo período de tempo, apresentando normalmente correlação com histórico de ingestão por mais de um ano (Ribeiro *et al.*, 2007).

É possível que o cérebro e placenta, quando comparados ao coração, fígado e tecido adiposo, apresentem uma capacidade de proteção no que diz respeito à incorporação de AGT (Carlson *et al.*, 1997). Isto pode ser evidenciado por estudos que encontraram concentrações superiores de AGT em plasma comparados ao sangue umbilical e cérebro de ratas gestantes (Larqué *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos desempenham papel central no desenvolvimento, através de suas funções nos lipídeos de membrana, como ligantes para receptores, fatores de transcrição que regulam expressão de genes, como precursores de eicosanóicos, e através de interações com proteínas (Innis, 2007). A incorporação dos AGT aos fosfolipídeos das membranas celulares produz alterações prejudiciais ao funcionamento celular. As membranas são de fundamental

importância para manutenção da estrutura e função celular. A membrana plasmática, que envolve as células, e outras membranas, formam uma superfície intracelular contínua (retículo endoplasmático) sendo a base estrutural de organelas intracelulares, como as mitocôndrias. As membranas possuem lipídios organizados na forma de bicamada, que por sua vez, apresenta dois papéis importantes para as membranas: 1) Proporcionar uma barreira seletiva entre os compartimentos interno e externo e 2) ser uma matriz em que proteínas possam estar embebidas (Wiseman, 1996).

Modelos experimentais demonstraram que os ácidos graxos da dieta induzem a ocorrência de modificações na composição de ácidos graxos das membranas celulares (Choy *et al.*, 1997). Os efeitos são mais evidentes quando há deficiência de ácidos graxos essenciais na dieta e sobretudo em períodos de intenso desenvolvimento tecidual, como períodos fetal e neonatal (McGee, 1996). Os ácidos graxos poliinsaturados n-3 conseguem aumentar a fluidez da membrana celular, ao passo que a substituição deles pelos AGT, promove enrijecimento da membrana (Wiseman, 1996; Wenzel & Kloepell, 1980), inibindo a maioria dos movimentos transmembrana (Wiseman, 1996). Estas alterações nas membranas produzem prejuízo da atividade das proteínas, especialmente enzimas e proteínas transportadoras dentro e fora da célula (Koletzko, 1992).

Vários são os trabalhos que apontam a relação dos AGT com a resistência à insulina (Simopoulos, 1994; Bray *et al.*, 2002; Lovejoy *et al.*, 2002; Ludwig *et al.*, 2003; Risérus, 2006; Machado *et al.*, 2010). O mecanismo envolvido seria não somente por diminuir a fluidez de membrana e, conseqüentemente, alterar a atividade do receptor de insulina, mas também por inibir a formação dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA), que estão positivamente correlacionados com a sensibilidade à insulina (Simopoulos, 1994). Esta inibição ocorre devido aos AGT competirem com os ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) na ligação com as  $\Delta$ -dessaturases e elongases, enzimas responsáveis pela dessaturação e alongação dos ácidos graxos essenciais e conseqüente formação dos LC-PUFA (Risérus, 2006; Tinoco *et al.*, 2007).

Ibrahim *et al.* (2005) ao comparar os efeitos dos ácidos graxos saturados com os AGT na sensibilidade à insulina e fluidez de membrana celular, observaram que somente os AGT foram capazes de reduzir a fluidez de membrana e que é maior a resistência à insulina por eles provocada. Além disso, foi observado que os AGT são capazes de potencializar a secreção aguda de insulina (Lovejoy, 1999).

Também tem sido amplamente estudado o efeito dos AGT no perfil lipoprotéico. É consensual na literatura científica que o seu consumo eleva as concentrações séricas de LDL-

col e reduz as de HDL-col (Mozaffarian *et al.*, 2006), induzindo portanto, um perfil lipídico mais prejudicial do que a própria gordura saturada, que por sua vez também tem a capacidade de elevar o LDL-col, no entanto não reduz de forma importante os níveis de HDL-col (Dorfman *et al.*, 2009). Este efeito dos AGT nas lipoproteínas plasmáticas resulta em um significativo aumento na relação LDL-col / HDL-col, aproximadamente duas vezes maior quando comparado aos ácidos graxos saturados, o que é considerado por alguns autores como o prognóstico mais importante para doenças cardiovasculares (Ascherio & Willett, 1997).

Além da alteração do perfil lipídico, tem-se observado que o consumo de AGT está relacionado com disfunção endotelial e aumento das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e proteína-C-reativa (Mensink *et al.*, 2005; Lopez-Garcia *et al.*, 2005; Mozaffarian, 2006; Harvey *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2009), o que demonstra que a forte relação entre AGT e doenças cardiovasculares pode ser explicada não somente pela alteração do perfil lipídico, mas também pela indução de uma situação pró-inflamatória que favorece a aterosclerose.

Mais recentemente, os AGT têm sido relacionados com estresse oxidativo. Recentes estudos têm demonstrado aumento na peroxidação lipídica hepática e esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) (Machado *et al.*, 2010; Dhibi, 2011). Embora a etiologia da NAFLD não seja totalmente compreendida, o acúmulo de gordura no fígado tem sido atribuída a diversas anormalidades metabólicas de ácidos graxos, incluindo lipogênese hepática aumentada, prejudicada oxidação mitocondrial de ácido graxo, e conteúdo de triglicerídeos aumentada nas partículas de VLDL. Além disso, o fígado gorduroso pode estar associado com o estresse oxidativo local, peroxidação lipídica, e produção de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (Machado *et al.*, 2010).

Ainda, o consumo de AGT contidos em alimentos hidrogenados industrialmente, como por exemplo a margarina e *snacks*, estão positivamente relacionados com doenças como asma, eczema atópico ou rinite alérgica em crianças e adultos (Enke *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Ácido graxo Trans X Programação metabólica

A nutrição materno infantil pode ter um papel crucial no desenvolvimento do feto durante a gestação e também para a criança após o nascimento (Enke *et al.*, 2011). Diversos estudos vêm sugerindo que os AGT consumidos pela mãe durante a gestação passam para o feto através da placenta e são incorporados nos tecidos fetais, mostrando clara exposição fetal à nutrição materna (Larqué *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 1997; Moore & Dhopeswarkar, 1980).

Em estudo realizado com crianças a termo, Koletzko & Muller (1990) detectaram níveis similares de AGT no sangue do cordão umbilical e no plasma materno. Houwelingen & Hornstra (1994) encontraram direta correlação entre AGT no plasma materno e tecidos fetais após aborto natural.

Outra forma não menos importante de transferência mãe – filho dos AGT é através da amamentação. O conteúdo destes é variável no leite, refletindo a ingestão dietética materna (Kummerow *et al.*, 2004; Larqué *et al.*, 2000; Aitchison *et al.*, 1977).

O lipídeo é o macronutriente mais variável do leite humano, geralmente fornecendo de 40 a 55 %, em média 50 %, do total de energia do leite. A gordura do leite humano consiste principalmente de triglicerídeos, representando 98 % do total de lipídeos, os quais podem ser sintetizados na glândula mamária ou captados do plasma materno (Innis, 2007; Tinoco *et al.*, 2007).

Os AGT presentes na dieta materna são transferidos pelo leite humano aos filhos. Estudos realizados na América do Norte mostram níveis tão altos quanto 18% de AGT no leite humano, com média de 7 %, sendo que a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a ingestão de ácidos graxos trans na dieta não ultrapasse 1 % do total de energia. Assumindo que 50 % do total de energia do leite humano vem do lipídeo, o leite contendo de 7 a 18 % de AGT, fornece respectivamente, 3,5 a 9 % do total de energia, ou 2,1 e 5,3 g / dia ao bebê amamentado, trazendo efeitos deletérios à saúde (Innis, 2007).

No Brasil, Tinoco *et al.* (2008) realizaram um trabalho pioneiro com objetivo de investigar a composição lipídica do leite materno de mães de prematuros da cidade do Rio de Janeiro. Os autores observaram que 39 % da amostra apresentavam conteúdo intermediário de AGT (2 – 3 %) e 23 % apresentavam conteúdo superior a 3 %.

Estes AGT ingeridos através do leite, assim como ocorre na transferência placentária, são também absorvidos e incorporados em vários tecidos e órgãos em diferentes

concentrações. O tecido adiposo apresenta as maiores concentrações enquanto que o cérebro apresenta as menores (Pettersen & Opstvedt, 1992; Cook, 1981), o que reflete um claro mecanismo protetor, que limita a incorporação desses ácidos graxos no sistema nervoso central. Nas primeiras semanas de lactação, os níveis de AGT nos tecidos do neonato elevam-se rapidamente, e ao final desta, atingem níveis similares aos encontrados no leite materno (Pettersen & Opstvedt, 1989).

Estudos epidemiológicos e de intervenção demonstram que um aumento no consumo de AGT, e de ácidos graxos ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6), aumentam a transferência materna para o feto do respectivo ácido graxo. Entretanto, níveis circulantes de AGT são inversamente associados a ácido araquidônico e docosaesanoico, e o peso de nascimento. Isso pode ser explicado pela interferência do AGT no metabolismo do n-3 e n-6, ou pela falta destes últimos na dieta em função da qualidade ruim dos ácidos graxos presentes (Innis, 2007).

O maior consumo de AGT na dieta pode levar a um menor consumo de ácidos graxos essenciais de cadeia longa, entretanto este padrão alimentar durante a gestação e lactação pode desencadear um prejuízo no desenvolvimento cerebral. O pico de velocidade de crescimento cerebral ocorre nos últimos 3 meses de gestação e nos primeiros meses após o nascimento, sendo que o ácido docosaesanoico desempenha papel importante na neurogênese. Estima-se que da 34ª semana de gestação até os 2 anos de idade ocorra o pico de formação de sinapses, cerca de 40.000 / segundo (Innis, 2007). Ainda, os AGT consumidos durante a gestação e lactação podem ser incorporados em pequena quantidade no hipocampo e afetar a memória dos filhos (Souza *et al.*, 2011).

O consumo de gordura vegetal hidrogenada durante a gestação e lactação também está associado à inflamação no hipotálamo com prejuízo no controle de fome - saciedade, o que pode promover distúrbios metabólicos como a obesidade (Pimentel *et al.*, 2012).

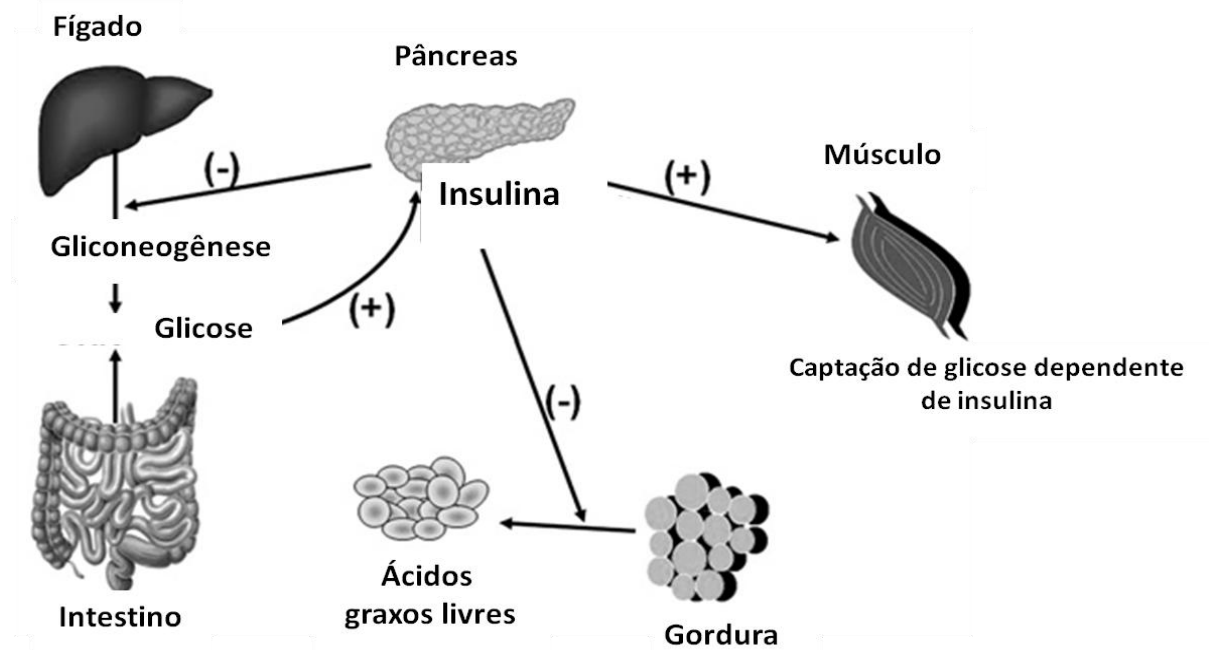
Estudos avaliando o efeito do consumo de AGT durante a lactação demonstrou elevação da expressão do gene PAI-1 (Inibidor do ativador de plasminogênio 1) no tecido adiposo, responsável por inibir a fibrinólise e assim, juntamente com o fibrinogênio, funcionar como perpetuador do estado pro trombótico (Pisani *et al.*, 2008).

Em recente publicação, nosso grupo demonstrou que o consumo de AGT durante a lactação promoveu programação metabólica nos animais, que apresentaram na vida adulta resistência à insulina, menor conteúdo de GLUT4 cardíaco e menor conteúdo de glicogênio hepático. Estes dados mostraram claramente e de forma pioneira, os efeitos dos AGT em causar a longo prazo, prejuízos na homeostase glicêmica (Osso *et al.*, 2008).

Entretanto, ainda nenhum estudo foi realizado a fim de verificar o efeito do consumo de AGT na lactação sobre o estresse oxidativo e disfunção endotelial da prole na idade adulta.

### 1.3 Insulina e Resistência à insulina (RI)

A insulina é um hormônio protéico secretado pelas células  $\beta$  de ilhotas pancreáticas, que tem como principal secretagogo a glicose. Entretanto, além da glicose, outros nutrientes como leucina, a glutamina, a alanina, a arginina, a frutose, e alguns ácidos graxos, também podem induzir de forma independente ou de forma potencializadora (do efeito primário da glicose) a secreção de insulina (Gylfe, 1988). Ou seja, a síntese deste hormônio é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (Zecchin *et al.*, 2004).



**Figura 2:** Resumo da função biológica da insulina. Adaptada de Eslam M, Khattab MA, Harrison SA, Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story.



A insulina é o maior hormônio anabólico, cuja ação é importante para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos e para a homeostasia da glicose. Após as refeições, a insulina age em vários tecidos periféricos, tais como o fígado, o músculo, o coração e o tecido adiposo, promovendo aumento da captação de glicose sanguínea e da síntese protéica, além de diminuir a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, e reduzir a lipólise e a proteólise (Saltiel & Kahn, 2001), além disso aumenta a síntese hepática de lipídios e suprime a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (Figura 2) (Shulman, 2000). Defeitos na secreção e ação da insulina conduzem a múltiplas alterações metabólicas tais como hiperglicemia, aumento da produção hepática de glicose e dislipidemia (Muoio & Newgard, 2008).

A cascata de sinalização da insulina nos tecidos periféricos (Figura 3) se inicia com a sua ligação ao seu receptor específico na membrana, composto de duas subunidades alfa e duas subunidades beta, que atua como uma enzima alostérica, ou seja, a ligação da insulina na subunidade alfa, permite que a subunidade beta adquira atividade quinase, levando a alteração conformacional e a autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina. O receptor da insulina (IR) além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em resíduos de serina, porém, isso diminui a transmissão do sinal para a cascata da sinalização da insulina, podendo provocar a resistência à insulina (Zecchin *et al.*, 2004).

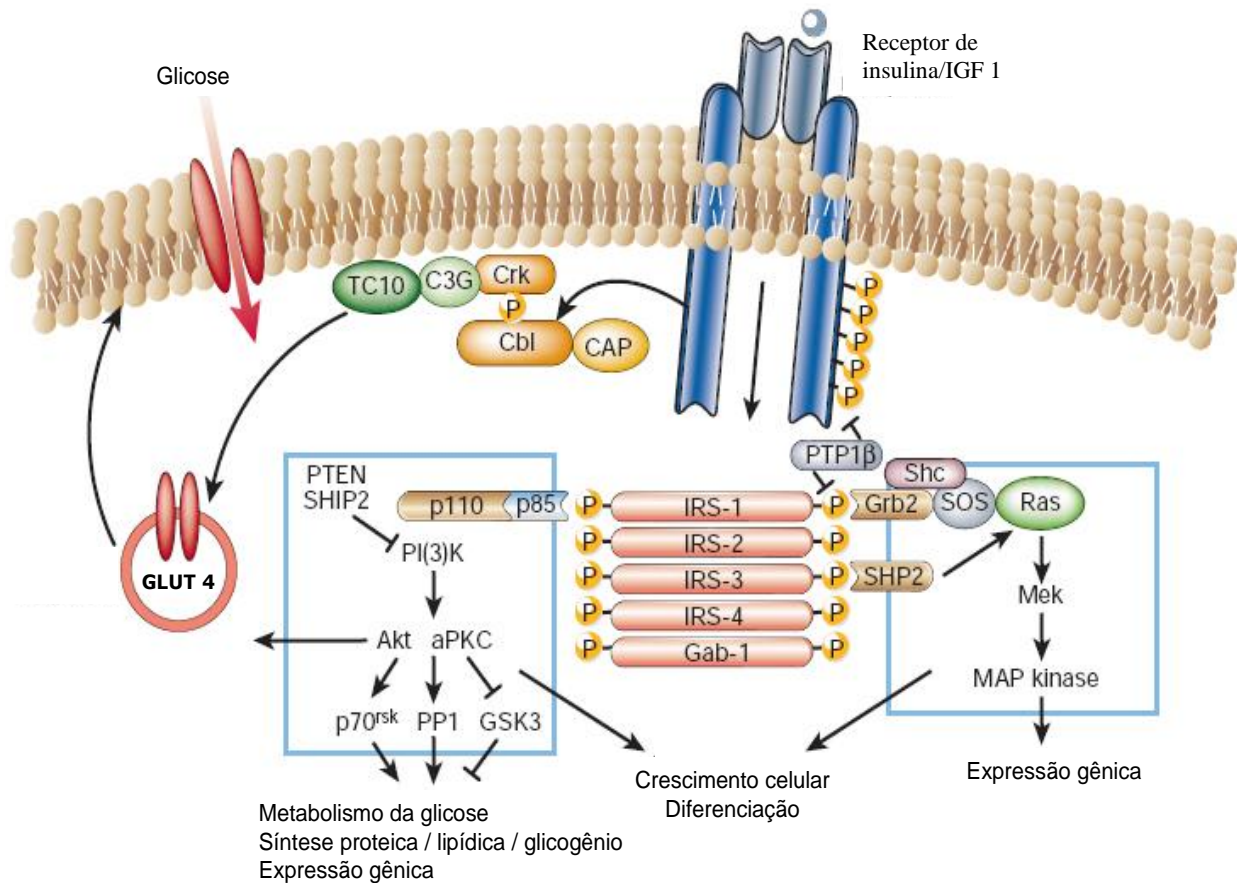
Uma vez ativado, o IR fosforila vários substratos protéicos em tirosina, como por exemplo a Cbl, um protooncogene também envolvido na via de transporte de glicose estimulada pela insulina, a JAK2 (Janus quinase A do tipo 2), envolvida na via de sinalização da leptina, e os substratos de receptor de insulina (IRS). Existem 4 tipos de IRS, sendo que o IRS-1 e 2 parecem estar mais envolvidos no metabolismo glicídico. Animais “Knockout” para IRS-1 desenvolvem resistência à insulina sem hiperglicemia, pois o IRS-2 pode compensar parcialmente a ausência de IRS-1. E aquele sem o gene que codifica o IRS-2 apresenta anormalidades na secreção e ação da insulina com resultante hiperglicemia. Por outro lado, os IRS-3 e IRS-4 não participam do metabolismo da glicose nem da via de crescimento, visto através de animais “Knockout” para essas proteínas, que tinham desenvolvimentos quase normais quanto à estes aspectos (Saltiel & Kahn, 2001).

A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia Src 2 (SH2), dentre elas a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). A PI3-K possui duas subunidades, uma catalítica (p110) e uma regulatória (p85). A ligação dos sítios fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-K ativa o domínio catalítico associado da subunidade p110. A enzima catalisa a

fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol gerando fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). O último é capaz de regular a PDK-1 (“phosphoinositide-dependent kinase 1”), que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase conhecida como Akt ou PKB (Saltiel & Kahn, 2001).

A ativação da Akt vai levar a translocação de vesículas intracelulares contendo GLUT4 para a superfície da membrana celular com conseqüente exocitose destes transportadores de glicose, que irão captar a glicose circulante. O mecanismo pelo qual este passo acontece permanece obscuro (Zecchin *et al.*, 2004).

A RI é definida como uma resposta diminuída às ações biológicas da insulina e isso significa uma menor ação da insulina não apenas no metabolismo dos carboidratos, como também seu papel no metabolismo dos lipídeos, sendo a marca da RI a hiperinsulinemia (Meerarani *et al.*, 2006; Nigro *et al.*, 2006). A resistência à insulina geralmente tem início anos antes do diagnóstico de diabetes tipo 2 (Harris & Eastman, 2000). A hipertrofia das ilhotas e hipersecreção de insulina surge na tentativa de compensar o estado de resistência e promover valores normais de glicemia num primeiro momento. Entretanto, esse trabalho exaustivo promove deterioração progressiva das ilhotas de maneira que 50 % da função das ilhotas pancreáticas já estão perdidas no momento do diagnóstico de hiperglicemia, momento onde a intolerância oral à glicose já está instalada (Yoon *et al.*, 2003; Taylor, 1999).



**Figura 3:** Cascata de sinalização da insulina em células musculares. Fonte: Adaptado de Saltiel e Kahn, 2001.

Além disso, com a diminuição na ação da insulina, pode haver também a ativação de fatores pró-inflamatórios, aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) e baixa regulação de vias de sinalização intra-celulares (Cubbon *et al.*, 2009).

Evidências crescentes sugerem que a progressão da RI para o DM2 é paralela à progressão da disfunção endotelial para a aterosclerose, estando também intimamente associada à adiposidade visceral, sendo essa associação atribuída aos ácidos graxos livres (Boden & Shulman, 2002). A hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres promovem fosforilação oxidativa mitocondrial, podendo levar a geração de intermediários reativos como o ânion superóxido, que acelera a degradação do NO (Brownlee, 2001; Rask-Madsen & King, 2007).

Estudos têm demonstrado que as anormalidades nas respostas metabólicas na sinalização do receptor de insulina são em parte decorrentes do aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona nos tecidos insulino-sensíveis (Bramlage *et al.*, 2004; Griess *et al.*, 2000) e do aumento das EROs (Evans, 2007).

Observa-se também que a sensibilidade à insulina possui influência da adiponectina, hormônio secretado pelo tecido adiposo, que estimula a secreção da insulina *in vivo e in vitro* (Okamoto *et al.*, 2008) pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que estimula a translocação do GLUT4 no coração e no músculo esquelético (Yamauchi *et al.*, 2002; Tomas *et al.*, 2002) e do receptor ativado por proliferadores do peroxissoma (PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$ ) (Yamauchi *et al.*, 2001; Fruebis *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado uma redução dos níveis de adiponectina plasmáticas em obesos e em humanos e modelos animais resistentes à insulina (Hu *et al.*, 1996; Arita *et al.*, 1999).

Entende-se hoje que o aparecimento de resistência à insulina não é uniforme em relação aos tecidos - alvo desse hormônio, nem em relação às vias intracelulares ativadas pela insulina. Desta forma, é possível que ocorra resistência à insulina em determinado tecido sem que haja em outro (Gill *et al.*, 2005). Mais recentemente, Wang *et al.* (2008) observaram em estudo com ratos “knockout” para lipoproteína lipase (LPL) muscular, que eles evoluíram com resistência à insulina em tecido adiposo, fígado e coração mas apresentaram aumento da ordem de 58% na captação de glicose estimulada por insulina no músculo, mostrando claro aumento de sensibilidade especificamente neste tecido.

#### 1.4 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), sistólica e/ou diastólica, conforme observado na tabela 1 (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2006; Williams, 2010).

**Tabela 1:** Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos). *Fonte:* VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010.

<b>Classificação</b>	<b>Pressão sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão diastólica (mmHg)</b>
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limitrofe*	130–139	85–89
Hipertensão estágio 1	140–159	90–99
Hipertensão estágio 2	160–179	100–109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.

\* *Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura.*

A HAS pode ser produzida pelo aumento do débito cardíaco ou principalmente pelo aumento da resistência vascular periférica, constituindo-se em uma das doenças cardiovasculares mais comuns e relevantes (Ganong, 1995). Esta doença ocorre quando a pressão arterial sistólica (PAS) é igual ou maior que 140 mm Hg e a pressão arterial diastólica (PAD) encontra-se igual ou superior a 90 mm Hg. Pesquisas epidemiológicas realizadas em algumas cidades apontam uma alta prevalência de HAS no Brasil e as taxas de prevalência na população urbana adulta brasileira variam de 22,3 % a 43,9 % (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010), sendo acima de 25 %, na maioria das cidades estudadas, predominando no sexo masculino e com fatores de risco associados semelhantes aos de outros países (Lessa, 2001). A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública, pois tem sido mostrado um aumento de indivíduos hipertensos e uma alta incidência de morte causada por essa doença e suas complicações (Sur *et al.*, 2011). A HAS é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo: a DAC, AVC, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca (Stukena *et al.*, 2011).

Um estilo de vida sedentário, sobrepeso e obesidade, idade, gênero, ingestão de sal e álcool, bem como fatores socioeconômicos e genéticos contribuem para a gênese e desenvolvimento da hipertensão, sendo, portanto, classificada como uma doença poligênica e multifatorial, relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico (Irigoyen *et al.*, 2005). Hábitos saudáveis devem ser adotados desde a infância e adolescência representando as principais recomendações não medicamentosas para a prevenção primária da HAS (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). A PA é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, que, por sua vez, são determinados por volume sistólico e frequência cardíaca, e pelo tônus vascular, respectivamente, de tal forma que seu controle envolve mecanismos neurais e neuro-humorais que, em curto e longo prazo, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios como renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, entre outros (Consolim-Colombo & Fiorino, 2005; Irigoyen *et al.*, 2005).

A PA elevada provoca alterações nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo, bem como anormalidades no músculo liso vascular e no endotélio associadas ao comprometimento da função destas estruturas (Verdecchia *et al.*, 1997). Entre estas disfunções, podemos considerar o aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio. O desequilíbrio entre o relaxamento e a contração é frequentemente citado como uma das causas do aumento do tônus vascular na hipertensão (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006).

### 1.5 Endotélio e Disfunção Vascular

Tanto estudos observacionais quanto ensaios randomizados têm demonstrado que o consumo de AGT produz disfunção endotelial (Micha & Mozaffarian, 2008). O endotélio é uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício. O fluxo sanguíneo com a sua força de cisalhamento *shear stress*, atua sobre as células endoteliais através de uma cascata de eventos que conduzem a produção de NO, pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Bahia *et al.*, 2006).

Acreditou-se durante anos que o endotélio era apenas uma barreira mecânica entre o meio circulante e os demais componentes da parede vascular, porém hoje já se sabe que ele

apresenta diversas atividades metabólicas. A importância do endotélio no processo de vasodilatação foi descrita por Furchgott e Zawadzki (1980), que demonstraram que a remoção mecânica ou química do endotélio impedia a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) em artérias isoladas de coelho, concluindo que o endotélio produzia uma substância vasodilatadora, denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Estudos posteriores, realizados com o objetivo de identificar a natureza química do EDRF (Ignarro *et al.*, 1987) constataram que tal fator se tratava do NO.

O NO é produzido pelo endotélio pela ação da eNOS que converte o aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a oxidação de cinco elétrons com a participação de NAD(P)H/NADP<sup>+</sup> e do complexo cálcio / calmodulina (Malinski, 2005). O relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pelo NO é mediado principalmente pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel muscular, que por sua vez, transforma guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento dos níveis de GMPc no interior das células musculares lisas, estimula o recrutamento de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) citosólico para os estoques intracelulares, causando assim, redução da concentração de Ca<sup>2+</sup> e conseqüente relaxamento vascular (Rapoport & Murad, 1983).

Sua função é regular o tônus vascular pela ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas e de inibição da atividade plaquetária, agregação de leucócitos e proliferação das células musculares lisas da parede vascular (Ramachandran *et al.*, 2002) sendo fundamental na modulação da PA (Flammer & Lüscher, 2010).

Além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras, como a prostaglandina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, assim como substâncias vasoconstritoras, como a Ang II e endotelina. Quando a função do endotélio é normal, há um equilíbrio entre a produção destas substâncias com uma tendência a vasodilatação (Bahia *et al.*, 2006; Flammer & Lüscher, 2010).

Vários estudos demonstram que a remoção do endotélio aumenta a resposta a uma variedade de agentes vasoconstritores, tanto em preparações vasculares de animais normotensos como hipertensos, indicando que estas células exercem um papel inibitório sobre a função contrátil do músculo liso vascular (Callera *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (Bahia *et al.*, 2006).

Em contra partida, evidências crescentes atribuem à disfunção endotelial caracterizada por um impedimento do relaxamento vascular dependente do endotélio, um papel importante na fisiopatologia da hipertensão (Suzuki *et al.*, 1995; Taddei *et al.*, 1996; Félétou *et al.*, 2010), já que contribui para elevada resistência periférica, favorecendo a ocorrência de complicações cardiovasculares (Sotomayor *et al.*, 1999; Félétou *et al.*, 2010).

O consumo de AGT parece estar associado com o aumento de marcadores inflamatórios sistêmicos (Mozaffarian *et al.*, 2004), e em estudo realizado com mulheres demonstrou estar associado ao aumento de 73% nos níveis de proteína C reativa (PCR), preditor independente para doença cardiovascular, e dos níveis de diversos marcadores da disfunção endotelial como moléculas de adesão ICAM e VCAM solúveis e e-selectina (Lopez-Garcia *et al.*, 2005). Dentre os principais fatores que contribuem para a etiologia da disfunção endotelial, grande destaque tem sido dado ao estresse oxidativo (Dai & Dai, 2010; Touyz & Briones, 2011).

Os mecanismos biológicos pelo qual os AGT podem causar efeitos adversos na função endotelial ainda não estão claros. Os AGT são incorporados nas membranas celulares do endotélio e assim podem alterar os componentes celulares e macrocelulares atuando na superfície da parede do vaso sanguíneo. Isso pode resultar em alteração no tônus vascular, aumento na produção de citocinas e de fatores de crescimento, entre outros. Entretanto, o alto consumo de AGT também pode afetar a função endotelial pela redução dos níveis de colesterol HDL, o qual pode desencadear o aumento da oxidação do colesterol LDL levando a aterosclerose (Lopez-Garcia *et al.*, 2005).

## 1.6 Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Em condições patológicas, o estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a formação e remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes (Touyz, 2004; Grossman, 2008; Duracková, 2010). Promove a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas, DNA, carboidratos, ocorrendo quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (Cai & Harrison, 2000).



As EROS são derivadas do metabolismo do oxigênio, que pela sua configuração eletrônica, tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos encontrados no ambiente e em todos os sistemas biológicos (Touyz & Shiffrin, 1999; Loukides *et al.*, 2011). No sistema cardiovascular, as EROS exercem um papel fisiológico essencial, mantendo a integridade cardíaca e vascular. No entanto, as EROS também possuem um papel fisiopatológico na disfunção cardiovascular associado a condições como aterosclerose, hipertensão e DM2 (Landmesser & Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001; Duracková, 2010). As principais EROS nestes processos são: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

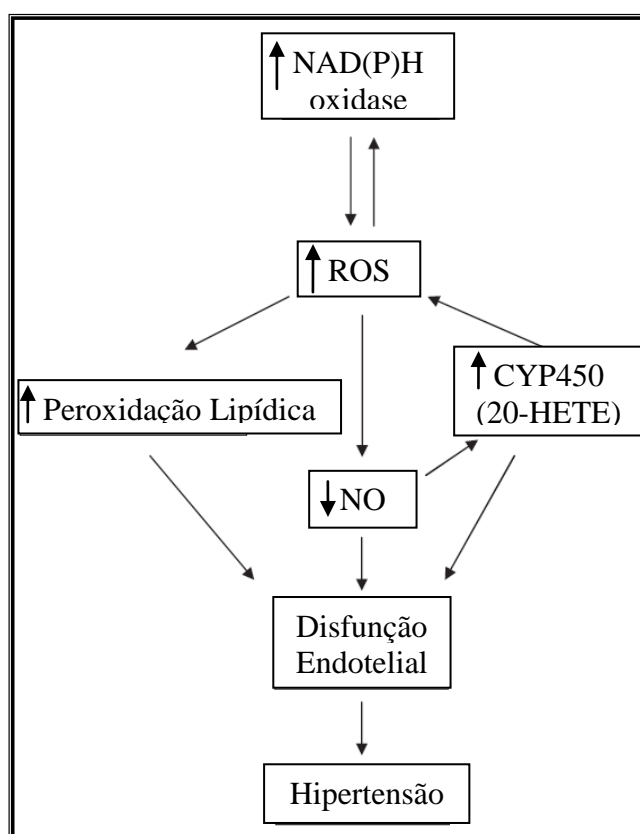
Em concentrações fisiológicas as EROS funcionam como moléculas de sinalização regulando a contração-relaxamento da célula do músculo liso vascular (VSMC) (Rao & Berk, 1992; Cosentino *et al.*, 1994; Zafari *et al.*, 1998; Touyz, 2005) sendo indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo a sinalização intracelular, diferenciação celular, apoptose e defesa contra microorganismos (Duracková, 2010).

Em condições patológicas, ocorre um aumento da produção de EROS e ou uma redução da capacidade dos agentes antioxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo, levando à disfunção endotelial, contratilidade aumentada, crescimento da VSMC, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação, deposição aumentada de proteínas da matriz extracelular, oxidação de proteínas e danos ao DNA, contribuindo para o dano vascular na doença cardiovascular (Rao & Berk, 1992; Harrison, 1997; Landmesser & Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001; Touyz & Briones, 2011).

Segundo estudos, a hipertensão pode estar associada com o aumento do estresse oxidativo vascular, no entanto, ainda há um certo grau de controvérsia se o estresse oxidativo é causa ou conseqüência da hipertensão (Grossman, 2008). O estresse oxidativo pode contribuir para a geração ou manutenção da hipertensão através de inúmeros mecanismos como a geração de lipídeos vasoconstrictores produtos da peroxidação como F2-isoprostanos (Cracowski *et al.*, 2002), esgotamento da tetrahydrobiopterina (BH4), um importante co-fator da eNOS (Vaziri *et al.*, 2000), o seqüestro do NO pela ação das EROs, como o  $O_2^-$  (Ceriello, 2008), bem como por meio de alterações estruturais e funcionais dentro da vasculatura (Zalba *et al.*, 2001).

Vários tipos celulares, como fibroblastos, macrófagos residentes, células do músculo liso e células endoteliais produzem EROS. Dentro da célula endotelial as fontes produtoras dessas espécies são: a NAD(P)H oxidase, NOS, ciclooxigenases, lipoxigenases e xantina

oxidase. Presentes também na vasculatura, as enzimas do citocromo P450, são fontes significativas de estresse oxidativo (Figura 4). Entretanto, a contribuição dessas enzimas para a geração de EROS é relativamente menor quando comparadas com a NAD(P)H oxidase (Touyz, 2004). A NAD(P)H oxidase é regulada por agentes vasoativos (Ang II, endotelina-1, trombina, serotonina), por citocinas (interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF)) e por forças mecânicas. Dos fatores vasoativos que estimulam a NAD(P)H oxidase, a Ang II parece ser um dos mais importantes (Touyz & Briones, 2011) (Figura 4).



**Figura 4:** Possível interação entre estresse oxidativo, disfunção endotelial e a hipertensão arterial. CYP450 – Citocromo P450; 20-HETE – ácido 20-hidroieicosatetranóico, NO – Óxido Nítrico e ROS – Espécies Reativas de Oxigênio. Fonte: Adaptado de Ward & Croft, 2006.

Estudos também tem demonstrado associação entre marcadores do estresse oxidativo com obesidade, resistência à insulina e diabetes através da interferência na via de sinalização da insulina. Trabalhos recentes tem sugerido que a produção aumentada de EROS pode ser a chave inicial que precede o aparecimento da resistência à insulina em resposta a nutrição materna (Alfaradhi & Ozanne, 2011).

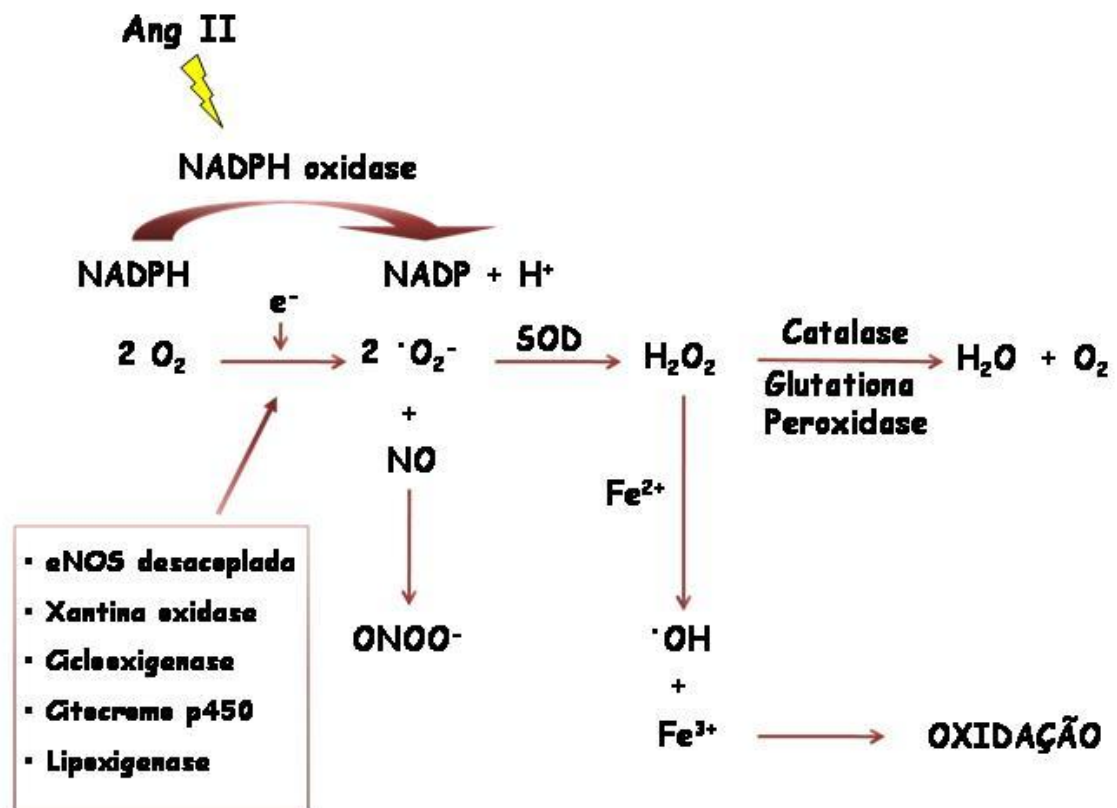
Ingestão dietética elevada de AGT está associada com aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica, o que pode contribuir para um estado inflamatório (Innis, 2007).

### 1.7 Sistema de Defesa Antioxidante

Para se proteger e evitar os danos causados pelas EROs, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos conforme sua estrutura. A maior parte dos antioxidantes não enzimáticos é exógena. Os principais são vitaminas lipossolúveis (Vitamina A, E e betacarotenos); hidrossolúveis (Vitamina C e Vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O sistema enzimático é composto por diversas enzimas, destacando-se a superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx) é o primeiro sistema a agir, evitando o acúmulo de  $\cdot O_2^-$  e  $H_2O_2$ . Os agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana (Kojo, 2004; Valko *et al.*, 2007)

A SOD é a primeira linha de defesa da célula vascular. Em mamíferos existem três isoformas: a SOD-cobre-zinco (SOD 1) presente principalmente no citosol, SOD-manganês (Mn-SOD, SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD-extracelular (ecSOD, SOD3) (Paravicini & Touyz, 2008). A SOD desempenha seu papel antioxidante, catalisando a dismutação do ânion  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Ross & Moldeus, 1991; Achyara *et al.*, 1991) (Figura 5).

A GPx tem ação fundamentalmente citosólica e catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos através da utilização da glutathiona (GSH), que atua como co-substrato da glutathiona peroxidase, com propriedades de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada através da glutathiona redutase (GR) com a transferência do hidrogênio do NADPH (Masella *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007; Paravicini & Touyz, 2008) (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática das espécies reativas e a ação das enzimas antioxidantes. Ang II – Angiotensina II, SOD – Superóxido Desmutase,  $\cdot\text{O}_2^-$  – Ânion Superóxido,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de Hidrogênio,  $\cdot\text{OH}$  – Radical Hidroxil,  $\text{ONOO}^-$ –Peroxinitrito, NO – Óxido Nítrico, eNOS – Óxido Nítrico Sintase,  $\text{H}_2\text{O}$  – Água e  $\text{O}_2$  – Oxigênio. Fonte: Adaptado de Al-Gubory *et al.*, 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes.

A catalase é uma heme proteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol, que catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . A catalase é efetiva em altos níveis de estresse oxidativo e protege as células da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo que a suplementação com catalase exógena previne a oxidação da GSH (Ferreira & Matsubara, 1997; Heck *et al.*, 2010).

### 1.8 Extrato Hidroalcoólico do Caroço do Açaí (ASE)

A planta *Euterpe oleracea* Mart. também conhecida pelo nome popular açaí (Figura 6), é amplamente encontrada na região Amazônica principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces e é muito consumido no Brasil. Aproximadamente 10.000 toneladas de extrato aquoso gelado são consumidas no Brasil e 1.000 toneladas são exportadas para muitos países como Japão, Estados Unidos e Itália (Organização Pan-Americana de Saúde, 2009).



**Figura 6:** Fruto da *Euterpe oleracea* Mart (Açaí)

Estudos químicos têm mostrado que o açaí é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (Bobbio *et al.*, 2000; Pozo-Isfran *et al.*, 2004; Gallori *et al.*, 2004). Crescentes evidências, inclusive em estudos epidemiológicos, sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra a doença cardiovascular (Stoclet *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005). Este efeito benéfico dos polifenóis pode ser devido a diferentes ações como antioxidante (Frankel *et al.*, 1993) que aumenta a biodisponibilidade do NO, vasodilatação (Fitzpatrick *et al.*, 2000) e/ou propriedades anti-hipertensivas (Soares de Moura *et al.*, 2002; 2004 a,b).

O açaí tem sido estudado mundialmente demonstrando um importante potencial terapêutico, sugerindo diferentes mecanismos de ação. Trabalhos com a sua polpa demonstraram uma ação antioxidante sobre o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), por ensaio de SOD, mostrando-se também excelente contra o radical peroxila ( $R O_2$ ) (Schauss *et al.*, 2006). Também foi observada uma inibição potencial das enzimas COX-1 e COX-2 (Schauss *et al.*, 2006), assim como redução da expressão de iNOS e da produção de NO por macrófagos (Matheus *et al.*, 2006). Em animais hipercolesterolêmicos, o tratamento com suco de açaí reduziu o risco de aterosclerose, devido, em parte, a redução da peroxidação lipídica e aumento de enzimas antioxidantes (Xie *et al.*, 2011). Em publicação recente, a ingestão diária de polpa de açaí (200g/dia durante 30 dias) por um grupo de indivíduos com sobrepeso induziu a redução dos valores de glicemia e insulinemia de jejum e de colesterol total (Udani *et al.*, 2011).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o extrato hidroalcolólico do caroço do açaí (*Açai Stone Extract* - ASE), cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), assim como, no Patent Cooperative Treaty (PCT), induz um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha *et al.*, 2007) e efeito anti-hipertensivo (Rocha *et al.*, 2008) e anti-hiperglicêmico (Oliveira *et al.*, 2010).

Demonstramos ainda, que o ASE reduz o dano oxidativo, em modelo experimental de inflamação pulmonar aguda, enfisema pulmonar e em modelo experimental de síndrome metabólica (Rocha *et al.*, 2008; de Moura *et al.*, 2011, 2012; Oliveira *et al.*, 2010). Ainda, dados do nosso grupo indicam que a ação anti-hipertensiva e vasodilatadora dependente de endotélio induzida pelo extrato hidroalcolólico de caroço de açaí é maior do que observado pela casca do fruto ou o extrato aquoso (Rocha *et al.*, 2007, 2008). Estes achados demonstram um efeito benéfico do extrato ASE, como uma planta medicinal, apresentando uma importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar do consumo do extrato de caroço de Açaí (ASE) sobre alterações cardiovasculares e metabólicas da prole adulta de mães submetidas a dieta normocalórica rica em ácidos graxos trans (AGT), oferecidas exclusivamente durante a lactação.

### 2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar os efeitos do ASE sobre o peso corporal, gordura corporal, glicemia, lipídios plasmáticos e insulina em prole adulta de mães que receberam AGT durante a lactação.
- ❖ Analisar, através do índice de HOMA, a resistência à insulina e a capacidade funcional da célula  $\beta$  da prole adulta
- ❖ Investigar a ação do ASE nas proteínas da cascata de sinalização de insulina de tecido muscular cardíaco e tecido adiposo da prole de mães que receberam AGT durante a lactação.
- ❖ Avaliar as alterações do consumo de AGT durante a lactação sobre o estresse oxidativo da prole na idade adulta, e o efeito do consumo de ASE sobre estas alterações.
- ❖ Dosar a atividade das enzimas antioxidantes: glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase no plasma, rim e no coração.
- ❖ Mensurar o dano oxidativo na prole adulta de mães que receberam AGT na lactação, concomitante ou não com ASE, através de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas plasmática, renal e cardíaca.
- ❖ Avaliar as alterações causadas pela ingestão de AGT na lactação, sobre pressão arterial, função endotelial e reatividade em artérias mesentéricas e estudar o efeito do tratamento crônico com ASE sobre essas alterações.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço do Açaí (ASE)

Frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açaí), provenientes da cidade de Belém, foram fornecidos pelo nosso colaborador Prof. Pergentino José Cunha Souza da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, que obtém o fruto de um único fornecedor, com o objetivo de minimizar as variações das características químicas do fruto.

Para a obtenção do extrato, 200 g do fruto do açaí foram lavados e os caroços separados, posteriormente foram vigorosamente triturados, embebidos em 400 ml de água destilada e fervidos por 5 minutos. Após a fervura acrescentou-se 400 ml de etanol. O extrato hidro-alcoólico foi acondicionado sob refrigeração e agitado periodicamente por 2 a 4 horas durante aproximadamente 10 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel filtro tipo Whatman número 1 e submetido à evaporação do etanol a baixa pressão. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso (Rocha *et al.*, 2007).

A concentração de polifenóis no ASE, medida pelo procedimento de Folin-Ciocalteu para análise total de fenóis (Singleton & Rossi, 1965), foi de aproximadamente 250 mg/g de extrato. Usualmente 100 g do caroço proporciona aproximadamente 5 g de extrato liofilizado.

#### 3.2 Modelo animal e dieta experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experiências Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Foram utilizadas ratas *Wistar* virgens com 3 meses de idade, pesando entre 200 e 250 g, obtidas do Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/ IBRAG/ UERJ, mantidas a uma temperatura média de 23°C, com umidade relativa de 40 a 60% e ciclo de luminosidade 12h claro e 12h escuro. O cruzamento foi realizado com ratos de aproximadamente 4 meses de idade obtidos do mesmo laboratório. Após fecundação, as



fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais e continuaram a receber ração industrializada específica para ratos (Nuvilab<sup>®</sup>), descrita na tabela 1, e água *ad libitum* durante toda gestação.

Com o nascimento dos filhotes, foram mantidos 6 filhotes, preferencialmente machos, por mãe para melhor performance lactotrófica. As ratas (n=20) foram divididas em 4 grupos:

- a) Grupo Controle (n= 5) → Ração controle e água *ad libitum*
- b) Grupo Controle + ASE (n= 5) → Ração controle e extrato de caroço de açaí dissolvido na água de beber (200 mg/kg/dia)
- c) Grupo Trans (n= 5) → Ração rica em Trans e água *ad libitum*
- d) Grupo Trans+ASE (n= 5) → Ração rica em Trans e extrato de caroço de açaí dissolvido na água de beber (200 mg/kg/dia)

Todos os grupos passaram a receber durante toda lactação, ração experimental específica para ratos, elaboradas de acordo com a AIN-93 M (American Institute of Nutrition Rodents Diets), diferindo apenas na fonte lipídica.

Os grupos Controle e Controle+ASE receberam ração contendo como fonte lipídica 9% de óleo de soja, já os grupos Trans e Trans+ASE receberam ração com 7% de gordura vegetal parcialmente hidrogenada acrescida de 2% de óleo de soja para garantia dos ácidos graxos essenciais. Ambas as dietas experimentais (tabela 2) foram balanceadas pela empresa Rhoster<sup>®</sup> (Rhoster, SP, Brasil, [www.rhoster.com.br](http://www.rhoster.com.br)). As rações foram produzidas tendo em vista serem entre si isoenergéticas e isolipídicas. O conteúdo de vitaminas e minerais foi baseado nas recomendações da AIN-93M.

Após o 21º dia de lactação, período correspondente ao desmame, os filhotes foram separados das mães e cada ninhada mantida em gaiolas comunitárias. Todos passaram a receber ração industrializada para ratos (Nuvilab<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

As análises foram realizadas em machos com 90 dias de idade de acordo com o protocolo estabelecido para este estudo, utilizando-se aleatoriamente 2-3 animais por ninhada para formação dos grupos, a fim de evitar a influência genética.

**Tabela 2:** Composição de macronutrientes da ração industrializada específica para ratos Nuvilab<sup>®</sup>.

<b>Nutrientes</b>	<b>Ração industrial NUVILAB<sup>®</sup></b>
Umidade (máxima)	12,5%
Proteína bruta (mínimo)	22,0%
Carboidrato (mínimo)	72,6%
Lipídios (mínimo)	5,4%
Calorias/g de ração	4,21 Kcal
Material mineral (máximo)	10,0%
Matéria fibrosa (máximo)	8,0%
Cálcio (máximo)	1,4%
Fósforo (mínimo)	0,8%

**Tabela 3:** Composição das rações experimentais específicas para ratos balanceadas pela Rhoster<sup>®</sup>.

<b>Nutrientes</b>	<b>Rica em Trans (%)</b>	<b>Controle</b>
Amido de Milho	36,15	37,35
Caseína Láctea	21,60	21,40
Amido Dextrinizado	13,20	13,20
Gordura Vegetal Hidrogenada	7,00	ZERO
Sacarose P.A.	10,00	9,00
Óleo de Soja	2,00	9,00
Celulose Microfina	5,00	5,00
Premix Mineral AIN-93G	3,50	3,50
Premix Vitamínico AIN-93	1,00	1,00
L-Cistina	0,30	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
Tert-ButilHidroquinona	0,0014	0,0014
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

### 3.3 Consumo alimentar

O consumo de ração e a ingestão de líquido das matrizes foram acompanhados durante o período gestacional, sendo o consumo diário calculado fazendo-se a diferença da oferta pela sobra, dividido pelo número de dias.

### 3.4 Medida da Pressão arterial

As pressões arteriais sistólica (PAS) e a diastólica (PAD) foram medidas por método não invasivo (pletismografia de cauda – Letica LE 5000) na prole de todos os grupos experimentais, a partir dos 30 dias de vida, por meio de um garrote e de um sensor de pulso posicionados em torno da cauda do animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e desinsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal, e assim determina a PAS e PAD.

Os animais foram treinados desde os 60 dias de vida, a fim de adaptar o animal ao procedimento e conseqüentemente minimizar o estresse durante a manipulação. As medidas foram realizadas em ratos acordados, aos 90 dias de vida.

### 3.5 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de rato

Aos 90 dias de vida, os ratos foram anestesiados com tiopental intraperitoneal (50 mg/kg) para coleta de sangue arterial através da aorta abdominal em tubo com anti coagulante EDTA, e em seguida submetidos a laparotomia. O sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, o plasma foi separado dos elementos figurados do sangue e mantido em freezer a -20°C até o momento das análises posteriores.

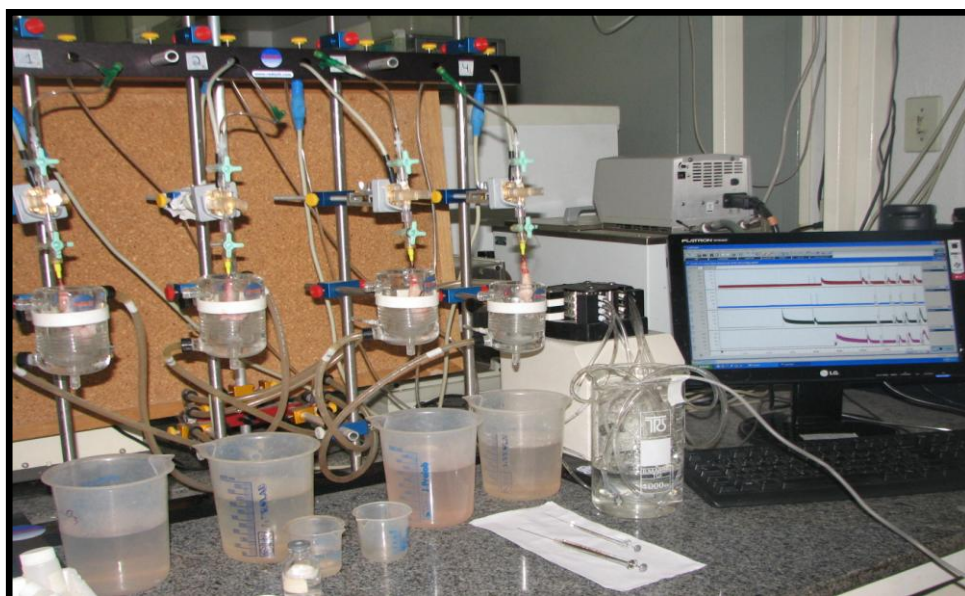
O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl (Cloreto de Sódio) (6.9); KCl (Cloreto de Potássio) (0.35); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Cloreto de Cálcio dihidratado) (0.44); MgSO<sub>4</sub> (Sulfato de Magnésio) (0.29); NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de Sódio) (2.1); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato de

Potássio Monobásico) (0.16);  $C_6H_{12}O_6$  (Glicose) (2.0). Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados.

O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

### 3.6 Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson<sup>®</sup>). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95%  $O_2$  e 5%  $CO_2$ ) foi infundida à velocidade constante de 4mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa Labchart 7 reader, por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30) (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal deve se manter próxima de 20 a 40 mm Hg (Resende et al., 1997) e então, foram administradas injeções de 120  $\mu\text{mol}$  de KCl de 10 em 10 minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a norepinefrina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30  $\mu\text{M}$ ) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mm Hg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, realizamos curvas dose-resposta à ACh (1-100 pmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Avaliamos também o efeito vasodilatador induzido pela NG (1-100 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. A resposta vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela NE. As injeções “*in bolus*” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de micro-seringas de 10 e 100  $\mu\text{l}$  (Hamilton). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50  $\mu\text{l}$ .

### **3.7 Análise bioquímica do sangue**

#### **3.7.1 Análise da glicose plasmática**

A dosagem de glicose plasmática de jejum foi realizada com auxílio de um glucômetro (Accu-check Active<sup>®</sup>- Roche) através da obtenção de amostra de sangue por punção caudal nos animais em jejum por 12 horas. Os valores foram expressos em mmol/l.

#### **3.7.2 Análise da Insulina plasmática**

A insulina plasmática foi analisada em duplicata pelo Kit de Elisa (Calbiotech, INC., USA).

### 3.7.3 Índice de HOMA

O índice de HOMA (Homesostasis Model Assessment) foi utilizado para determinação da resistência a insulina (RI) e da capacidade funcional das células  $\beta$  (BcC), na qual (Matthews *et al.*, 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum (\mu\text{UI/mL})}{22,5}$$

$$\text{HOMA-BcC} = \frac{20 \times \text{insulinemia de jejum (\mu\text{UI/mL})}{\text{glicemia de jejum (mmol/L)} - 3,5}$$

### 3.7.4 Perfil lipídico

Os triglicerídeos (TG) e o colesterol total (CT) foram avaliados no plasma através de Kit comercial (Bioclin<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil) que se baseia em método enzimático colorimétrico. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

## 3.8 **Teste de tolerância à glicose (GTT – Glucose Test Tolerance) e teste de tolerância à insulina (ITT – Insulin Test Tolerance)**

GTT e ITT foram avaliados duas e uma semana antes do sacrifício (90 dias) respectivamente. Após 12 - 14 horas de jejum, glicose (2g/Kg) ou insulina (0,5 U/Kg) foram ofertados intraperitonealmente no tempo zero. O sangue caudal foi coletado nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120. A glicemia foi dosada através de um medidor automático (ACCU CHEC-Active, Roche<sup>®</sup>), baseado na reação glicose oxidase. As áreas sobre a curva (ASC; milimolar/minuto) foram calculadas.

### 3.9 Peso da gordura epididimal e retroperitoneal

O tecido adiposo branco (gordura epididimal e retroperitoneal) dos animais de todos os grupos foi retirado e mensurado em balança eletrônica de precisão (AND<sup>®</sup>, HM-202, Japan) aos 90 dias de vida.

### 3.10 Atividade das Enzimas Antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), foi realizada em amostras de plasma, e em homogenato de rim direito e coração preparados com tampão fosfato.

#### 3.10.1 Medida da Superóxido Dismutase

O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o  $H_2O_2$  que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. Uma unidade de enzima é definida pela quantidade transformada em 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. A atividade enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm). A adrenalina é oxidada pelo  $O_2^{\bullet-}$  para formar um produto róseo, adrenocromo. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Bannister *et al.* (1987) e adaptada para o tecido vascular.

Foi utilizado 20, 40 e 60  $\mu\text{l}$  de cada amostra (rim, coração e plasma) em cubetas separadas. Em cada cubeta foi adicionado 20  $\mu\text{l}$  de catalase (0,0024 g/ml de água destilada – C9322, SIGMA) + 970  $\mu\text{l}$  de tampão glicina (0,75g em 200 ml de água destilada – 32°C) + 40  $\mu\text{l}$  de norepinefrina (95 mg em 5ml de água destilada + 15  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de HCl fumegante).

Para o cálculo foi utilizado o alfa da reta de cada amostra em todas as concentrações utilizadas em planilha do excel<sup>®</sup>. Os resultados foram ponderados em mg de proteína.

### 3.10.2 Medida da Catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do  $H_2O_2$ . Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água. Este método mede a atividade da enzima produzida pelas células e organelas em resposta a quantidade de peróxido de hidrogênio, medido pelo espectrofotômetro.

Foram utilizados 200  $\mu$ l de homogenato de rim e coração e 20  $\mu$ l de amostra de plasma em cubetas separadas (quartzo). Em cada cubeta foi adicionado 1 ml de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (2 5ml de tampão para 40  $\mu$ l de  $H_2O_2$ ). O comprimento de onda utilizado foi 240 nm e a leitura foi feita nos tempos 0, 30 e 60 segundos (Aebi, 1984).

### 3.10.3 Medida da Glutathione Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para  $H_2O$  e álcool, usando a glutathione (GSH) como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 200  $\mu$ l de homogenato de rim, coração e plasma em cubetas separadas. Em cada cubeta foi adicionado 1800  $\mu$ l de tampão fosfato (PBS) com glutathione reduzida (GSH), glutathione reductase (GR) e azida sódica (20ml de tampão para 4 ml de GSH + 4 ml GR + 1ml de azida sódica) e incubada por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu$ l de NADPH e a leitura realizada por 3 minutos. Posteriormente a esta leitura foi adicionado 200  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio e lido por 5 minutos. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé *et al.* (1984) e adaptada para o tecido renal e cardíaco.



### 3.11 Ensaio pró-oxidantes

#### 3.11.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper *et al.* (1990) e adaptada para medida em soro.

Foi utilizado 200 µl de homogenato de rim e coração para 400 µl de ácido tricloroacético (TCA). Para o plasma, foi utilizado 200 µl de amostra, diluídos em 600 µl de TCA. As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500 µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm).

Para o cálculo foi utilizado:

- Fator de Correção (FC) médio do TBA →  $FC = \frac{[nmol.TMP]}{Abs. ptn}$
- Abs. da amostra x FC médio = nmol de TBARS
- nmol de TBARS ÷ quantidade de proteína da amostra (nmol de TBARS/mg de proteína).

#### 3.11.2 Carbonilação de proteínas

O método utilizado para dosagem de oxidação de proteínas baseia-se no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrophenylhydrazine. O conteúdo de carbonil é determinado

espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente 22.0000 Molar<sup>-1</sup> em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

### 3.12 Medida de nitrito

Como o óxido nítrico possui um tempo de meia vida muito curto, este é rapidamente oxidado a nitrito e/ou nitrato pelo oxigênio, a determinação da produção deste radical é mensurado pela formação do nitrito (NO<sub>2</sub>), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, em comprimento de onda de 540 nm (Green *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 2003).

Solução 1: sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico 2,5%.

Solução 2: N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5%.

Para a reação, adicionou-se 100 µl da amostra em 50 µl da solução 1. Após 10 minutos, adicionou-se 50 µl da solução 2. Após homogeneizar, a leitura foi feita a 540 nm em espectrofotômetro. O resultado foi expresso em µM (ou mMol)/ mg proteína.

### 3.13 Dosagem de Proteínas

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (Bradford, 1976).

### 3.14 **Biologia Molecular (Western Blotting) do IR, Akt, p-Akt e GLUT-4 do tecido cardíaco e adiposo**

O ventrículo esquerdo isolado e o tecido adiposo, retirados após o sacrifício do animal, foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise das proteínas através de western blotting.

O tecido cardíaco, após ter sido descongelado em baixa temperatura, foi picotado com auxílio de bisturi e em seguida homogeneizado em solução de lise gelada (em mmol: HEPES 30, pH 7,4;  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  50; NaF 100; EDTA 1,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  10; Triton X-100 1%) acrescentada de coquetel de inibidores (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostic, California, USA), por trituração manual com auxílio de um pilão até se tornar líquido, posteriormente deixado em 30 minutos no gelo.

O homogeneizado foi centrifugado durante 15 minutos a 9000 rpm a 4° C. Parte do sobrenadante foi coletado para obtenção do conteúdo total das proteínas da cascata de sinalização de insulina: IR, Akt e p-Akt e GLUT-4.

O tecido adiposo epididimal foi lisado em solução de lise contendo Hepes (50mM),  $\text{MgCl}_2$  (1mM), EDTA (10mM) e SDS 1%, acrescentada de coquetel de inibidores (Complete EDTA-Free, Roche Diagnostics, California, USA), por trituração manual com o auxílio de um bisturi e pilão, e posteriormente deixado em repouso no gelo por 30 minutos. Após a lise as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm à 4 C, e o sobrenadante foi coletado e transferido para novos eppendorfs.

A dosagem da concentração de proteínas nas amostras de tecido cardíaco e adiposo foi determinada usando o reagente BCA Protein Assay Kit (Pierce, EUA), utilizando diferentes concentrações de albumina para montagem da curva padrão. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de dosagem de proteínas  $\text{BCA}^{\text{TM}}$  (Thermo Scientific USA, Rockford, IL). A leitura foi realizada no leitor de Elisa.

Em seguida, as amostras de tecido cardíaco foram fervidas com solução tampão (glycerol 10%, 2 $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 1%. NaOH 10N e azul de bromofenol 0,0001%) durante 3 minutos a 100° C, para desnaturação das proteínas. O mesmo tempo foi utilizado para as amostras de tecido adiposo, porém foi utilizado uma solução tampão contendo Tris-HCL 50mM; pH 6,8; SDS 1%; 2 $\beta$ -mercaptoetanol 5%; glycerol 10%; e azul de bromofenol 0,0001%.

As proteínas totais (15 µg) foram aplicadas sobre um gel a 8 ou 12% de poliacrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 1.6%, APS 10%, Temed5 µl diluídos em tampão Tris 1,5 mM, SDS 0,4%) juntamente com um padrão de peso molecular (Rainbow-Sigma®, USA) em cuba de eletroforese (Hoefer®) para separação protéica, e a seguir, as proteínas foram transferidas, utilizando o sistema semi-dry (Bio-RAD, EUA) para uma membrana PVDF (Hybond- P, Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio Tween-TBS (NaCl 0,5M, Tris-HCl 20nM, pH 7,5, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado.

Para estudo do metabolismo glicídico, foram utilizados anticorpos primários específicos para detecção de proteínas chave da cascata de sinalização da insulina: anticorpo primário para IR, Akt, p-Akt Ser-473, GLUT-4 e actina (Santa Cruz Biotech) na diluição 1:1000 durante período mínimo de 12 horas. Para imunodeteccção foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário apropriado biotilado (Santa Cruz Biotech - diluição 1:1000), seguida de incubação com estreptavidina (Caltag Laboratories®, Burlingame, CA, USA) também na diluição 1:1000 por mais 1 hora. A revelação das proteínas foi realizada por ECL plus (GE Healthcare – Life sciences). As bandas (n = 3) foram quantificadas segundo sua densidade, utilizando-se o software Image J (NIH, USA).

### 3.15 Análise estatística

Para verificar a normalidade das variáveis, aplicou-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, assim, foram utilizados testes paramétricos para as variáveis que apresentaram distribuição normal. Para comparar três ou mais grupos independentes que seguiram distribuição normal, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e em situações em que houve diferença estatística significativa o teste *post-hoc* de *Tukey* a fim de identificar quais grupos diferiram entre si, sendo consideradas significativas, quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros maternos durante a gestação

A ingestão de ração e de líquido das mães foi avaliada durante o período da lactação e nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais para os diferentes parâmetros (Figura 8).

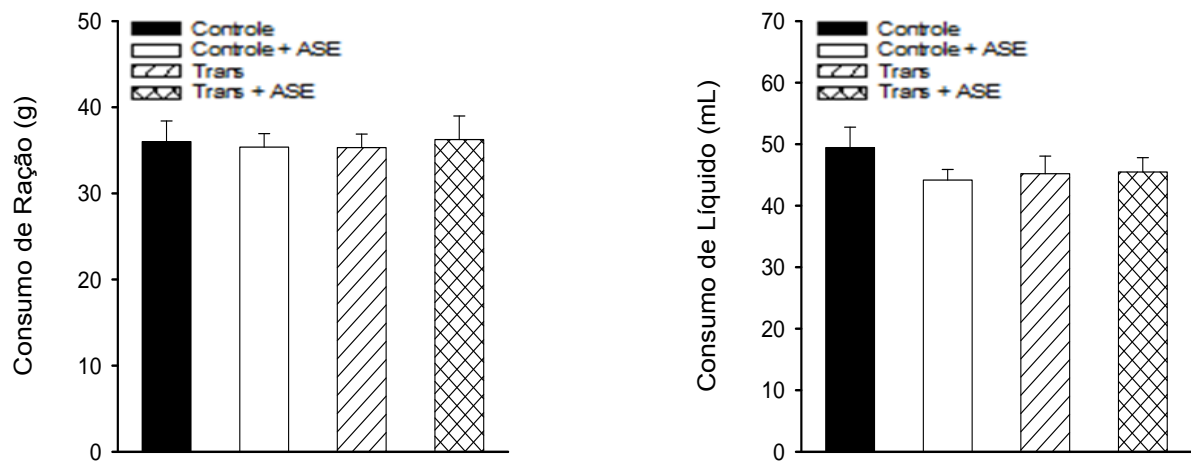


Figura 8 – Consumo materno de ração (A) e de líquido (B) durante o período da lactação. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão,  $n = 8$  para todos os grupos.

#### 4.2 Efeito do tratamento com ASE sobre o peso corporal da prole (machos) de mães submetidas à dieta rica em Trans durante a lactação.

Não houve alteração significativa do peso corporal, durante o período experimental nos animais estudados (Figura 9).

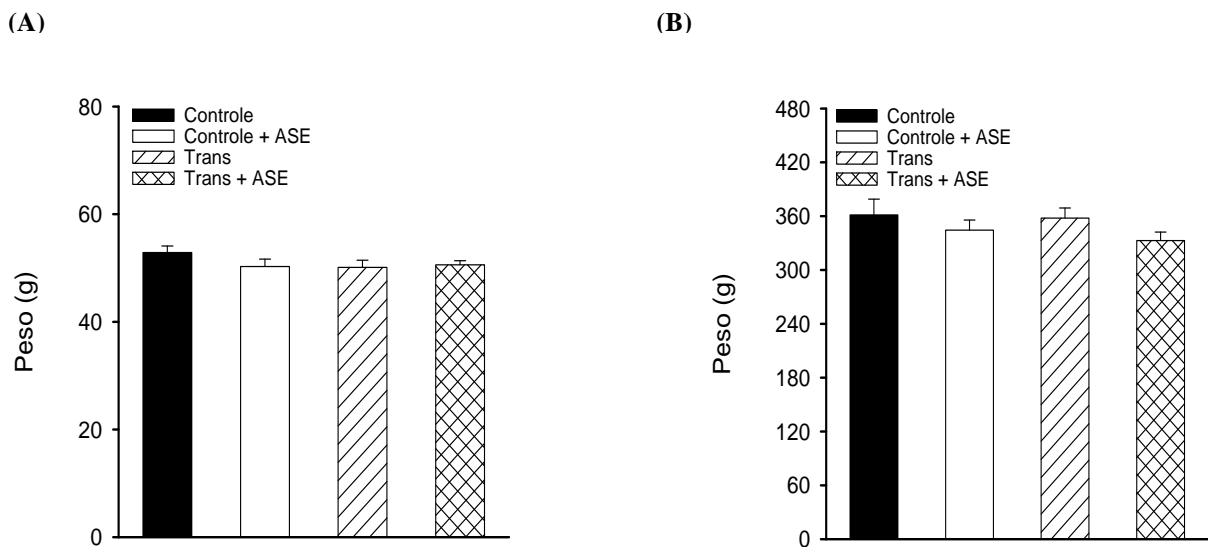


Figura 9 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o peso corporal aos 21 dias (A) e aos 90 dias de vida (B) dos machos da prole de ratas submetidas à dieta trans durante a lactação, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n= 8 para todos os grupos.

### 4.3 Efeito do Tratamento com ASE sobre a Pressão Arterial Sistólica e Diastólica

A PAS e a PAD foi maior nos animais do grupo trans, aos três meses de vida quando comparado ao grupo controle tratado ( $p < 0,05$ ). O tratamento com ASE reduziu a PAS no grupo controle (Figura 10 A), assim como a PAD no grupo Trans (Figura 10 B).

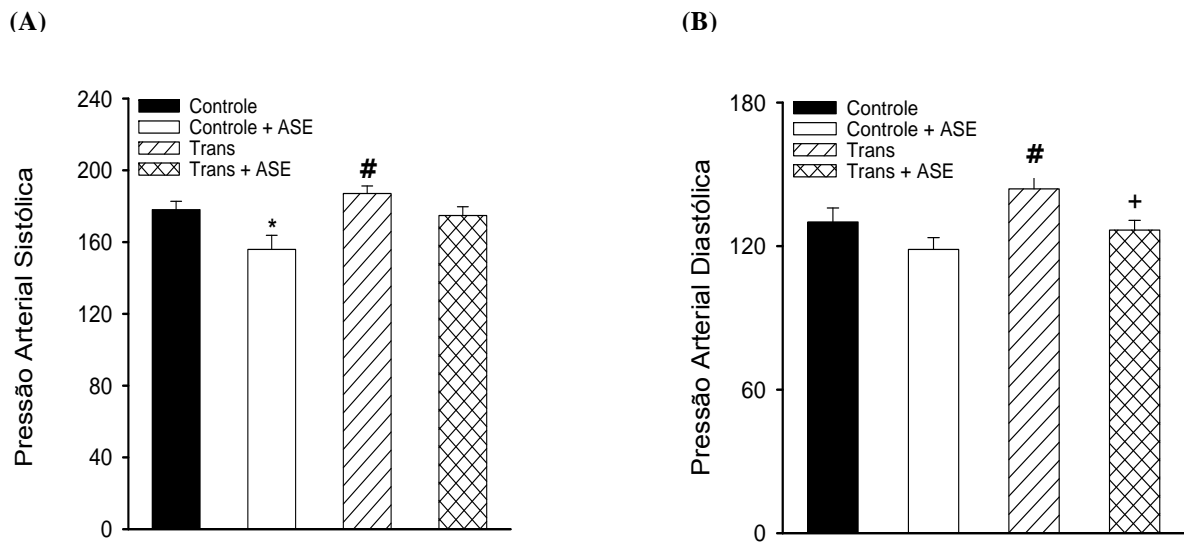


Figura 10 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a Pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) (mmHg) com machos de 3 meses de vida, prole de ratas submetidas à dieta trans durante a lactação, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n = 8$  para todos os grupos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle + ASE e +  $p < 0,05$  em relação ao grupo trans.

#### 4.4 Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da Acetilcolina em LAM

A resposta vasodilatadora dose-dependente induzida pela acetilcolina não foi significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente no LAM isolado dos animais experimentais dos grupos estudados (Figura 11).

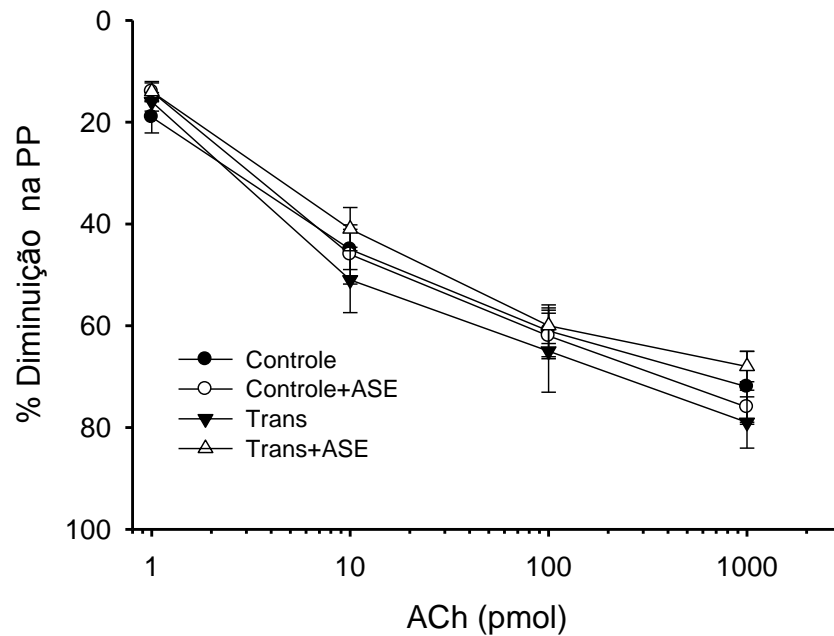


Figura 11 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico, da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n = 8$  para todos os grupos.



#### 4.5 Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da Nitroglicerina em LAM

Não houve alteração na resposta vasodilatadora induzida pela NG em LAM dos animais dos diferentes grupos estudados (Figura 12).

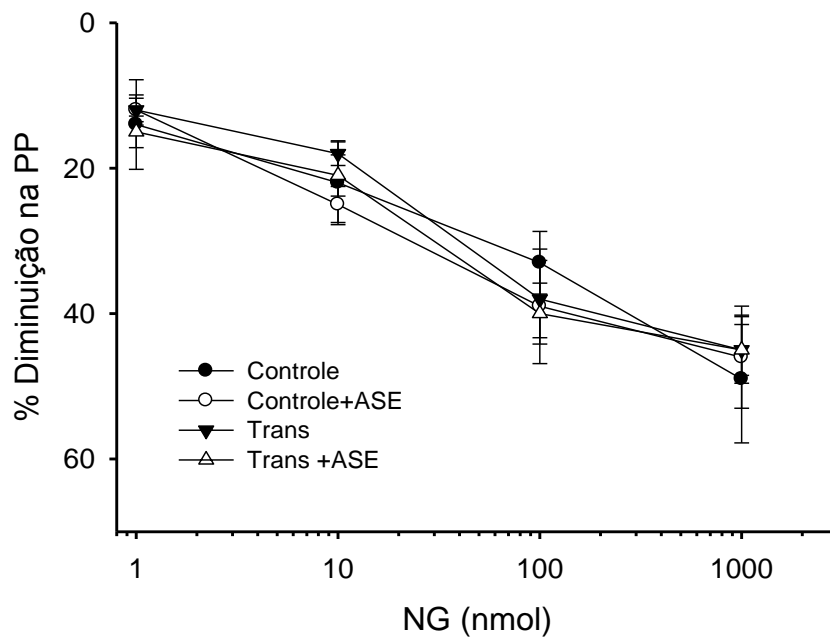


Figura 12 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico, da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média ± erro padrão; n = 8 para todos os grupos.

## 4.6 Efeito do tratamento com ASE sobre os Ensaio pró-oxidantes

### 4.6.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Não foram observadas diferenças significativas na formação do subproduto (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica em amostras de plasma e tecido cardíaco nos grupos estudados (Figura 13 A e C). Entretanto, há uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de MDA no tecido renal dos animais Controle+ASE; Trans e Trans+ASE, com três meses de vida quando comparada com aos animais Controles (Figura 13 B).

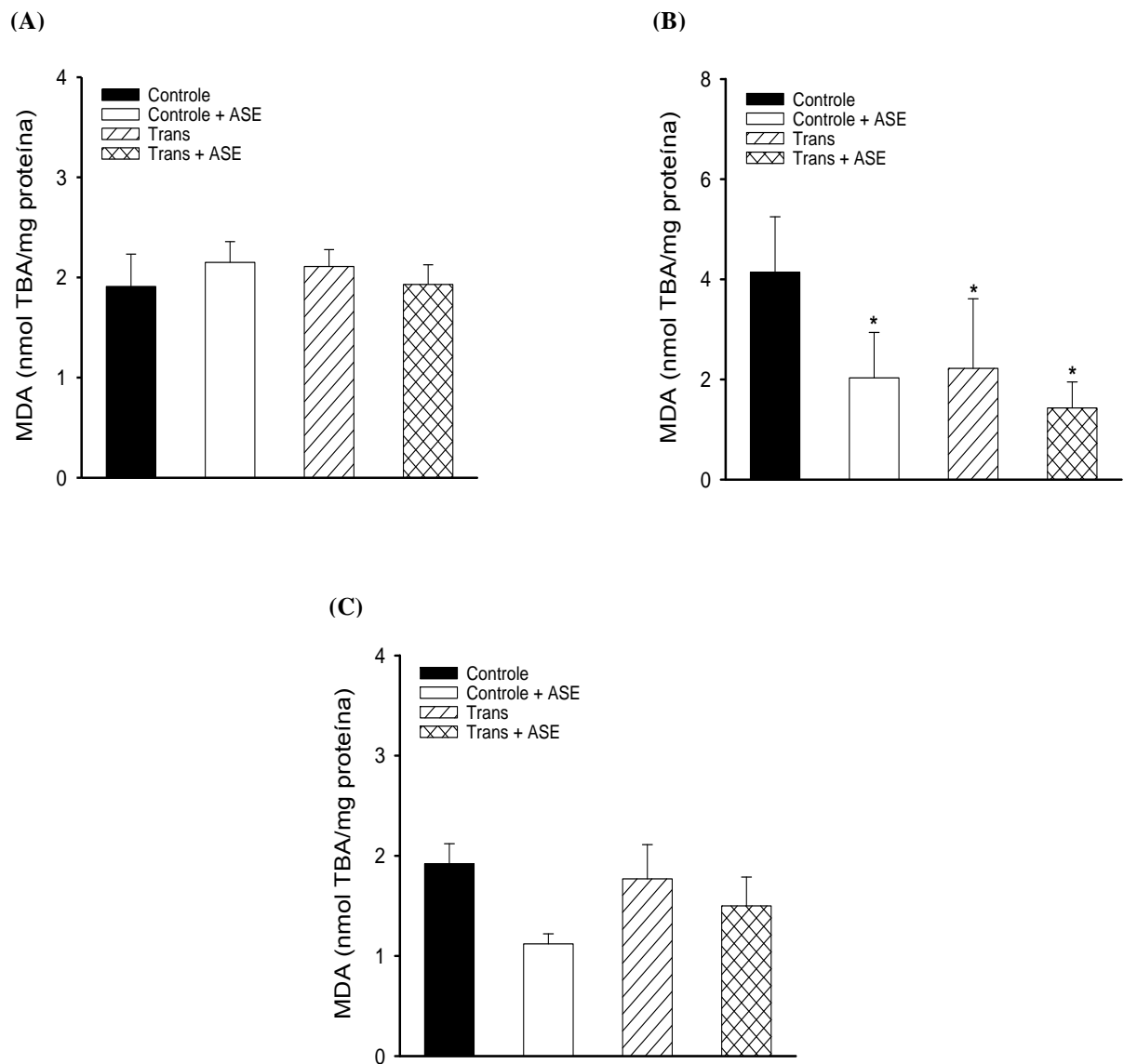
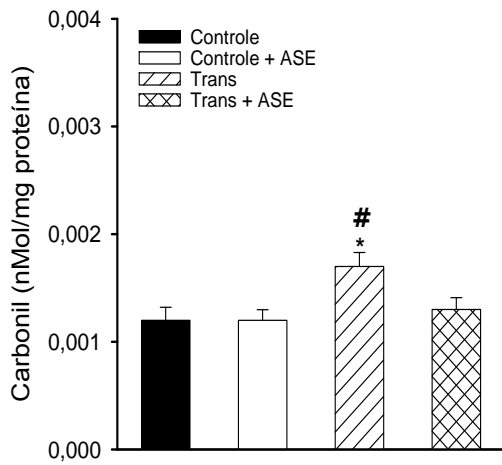


Figura 13 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis de TBARS em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = 8 para todos os grupos. \* p<0,05 em relação ao grupo controle.

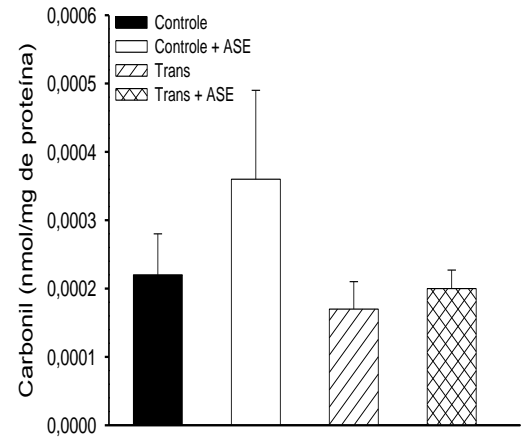
#### 4.6.2 Carbonilação de proteínas

Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na carbonilação de proteínas em amostras de plasma nos animais do grupo Trans quando comparado com os animais Controles (Figura 14 A). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de proteínas carboniladas nos tecidos renais e cardíacos entre os grupos estudados (Figura 14 B e C).

(A)



(B)



(C)

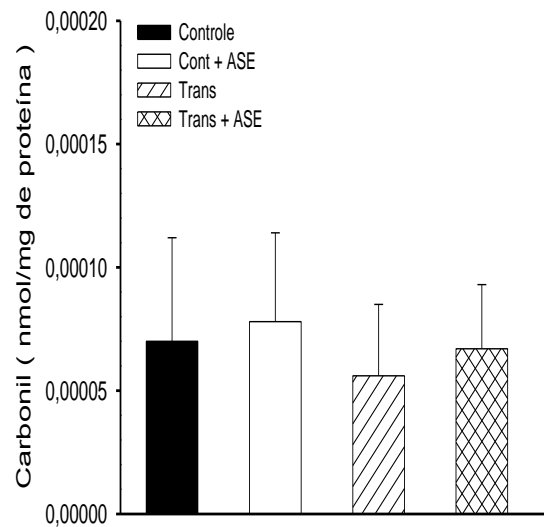


Figura 14 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a carbonilação de proteínas em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n = 8$  para todos os grupos. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos controles e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle + ASE.

## 4.7 Efeito do tratamento com ASE sobre a Atividade das Enzimas Antioxidantes

### 4.7.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em amostras de tecido renal dos animais controles quando comparados aos controles tratados (Figura 15 B).

Entretanto a atividade da SOD no plasma e no tecido cardíaco não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 15 A e C).

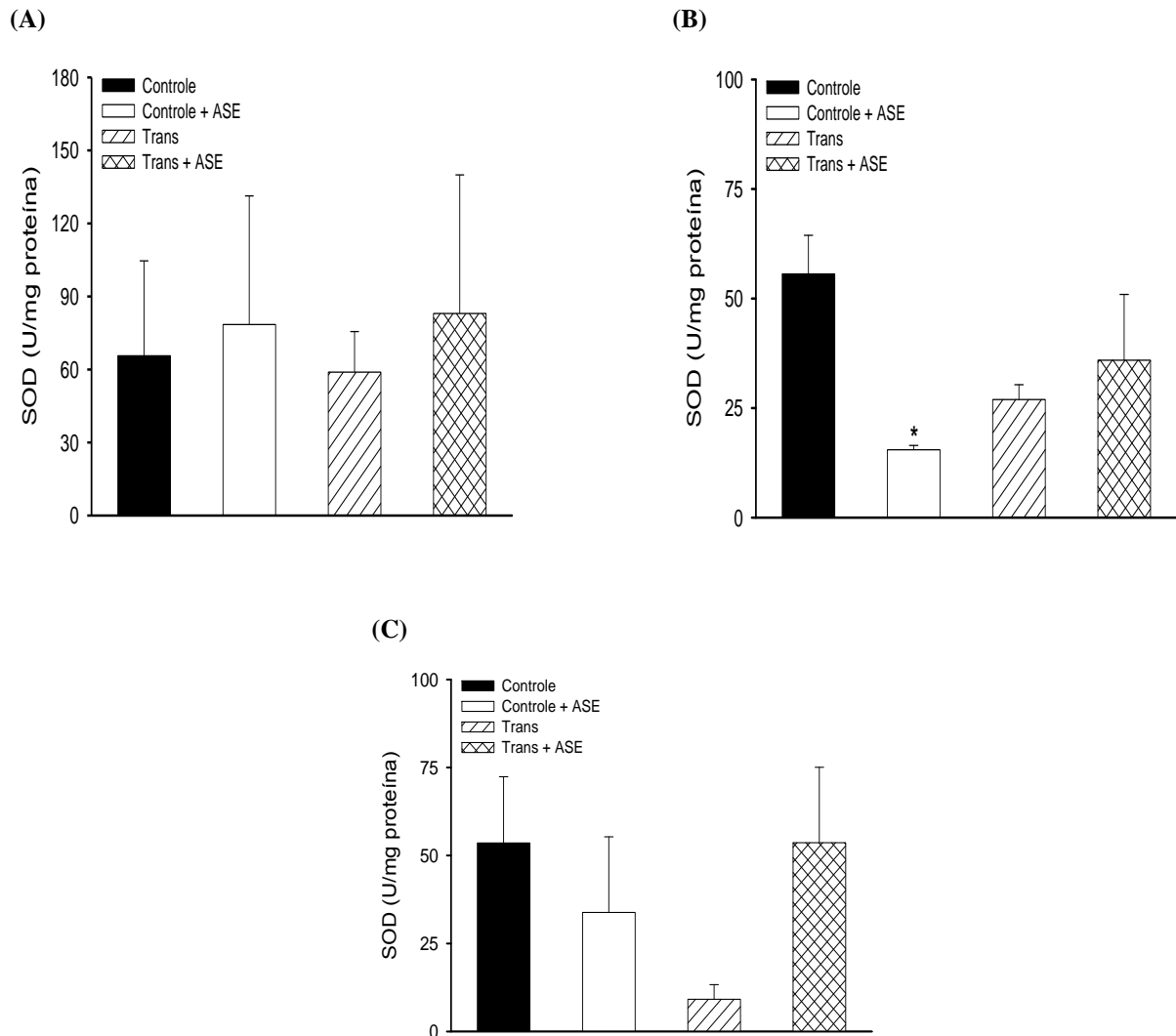


Figura 15 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a atividade da enzima SOD em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = 8 para todos os grupos. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos controles.

#### 4.7.2. Catalase

Foi observada uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade da catalase no plasma e no tecido renal no grupo Trans quando comparado com os Controles (Figura 16 A e B). O tratamento com ASE aumentou significativamente a atividade desta enzima no tecido renal dos animais Trans (Figura 16 B). Não houve alteração significativa na atividade da catalase nas amostras de tecido cardíaco, entre os grupos estudados (Figura 16 C).



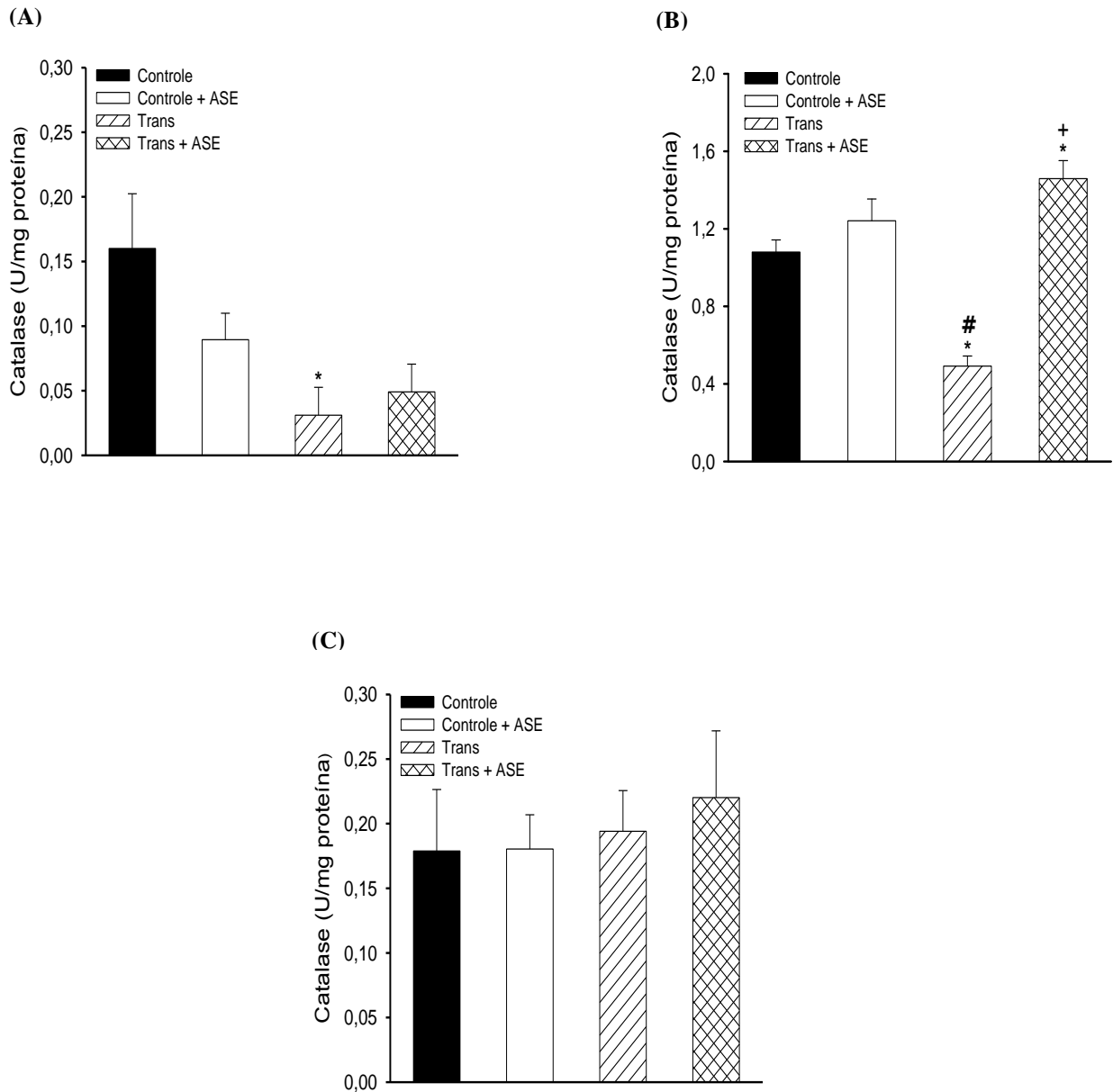


Figura 16 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a atividade da enzima catalase em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n = 8$  para todos os grupos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle + ASE e +  $p < 0,05$  em relação ao grupo trans.

#### 4.7.3. Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em amostras de tecido renal dos animais controles tratados com ASE, quando comparados com os animais controles, trans e trans tratado (Figura 17 B). Não houve alteração significativa na atividade da GPx nas amostras de plasma e tecido cardíaco, entre os grupos estudados (Figura 17 A e C).

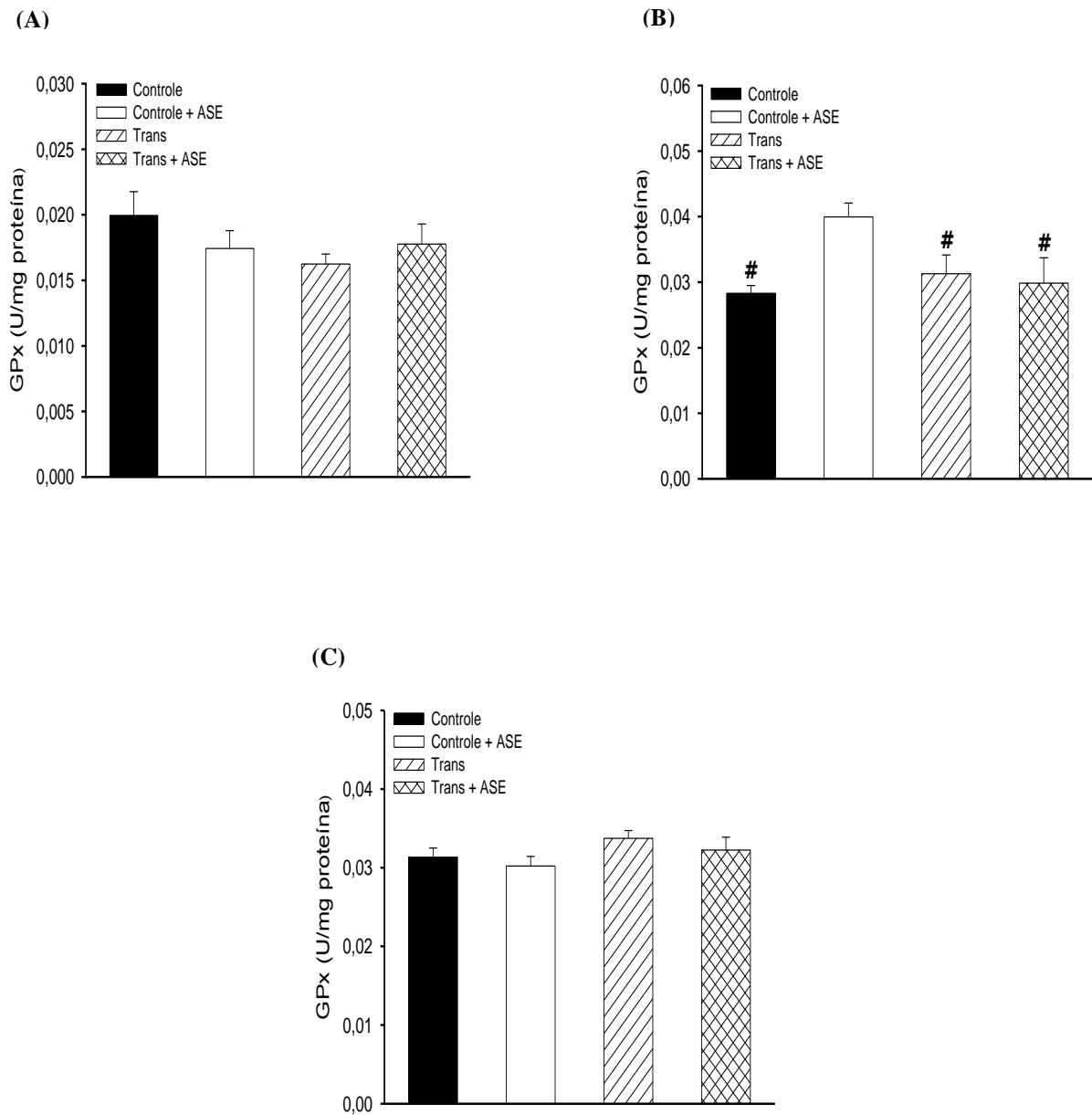


Figura 17 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a atividade da enzima GPx em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) em da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=8 para todos os grupos. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle + ASE.

#### 4.8 Efeito do tratamento com ASE sobre os Níveis de Nitrito

A dieta Trans não modificou os níveis de nitrito em relação aos Controles nas amostras de plasma, rim e coração. Entretanto, os níveis de nitrito foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) no tecido renal dos animais Trans tratados com ASE quando comparados com os animais Trans (Figura 18 B). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de nitrito em amostras de plasma e tecido cardíaco, entre os grupos estudados (Figura 18 A e C).

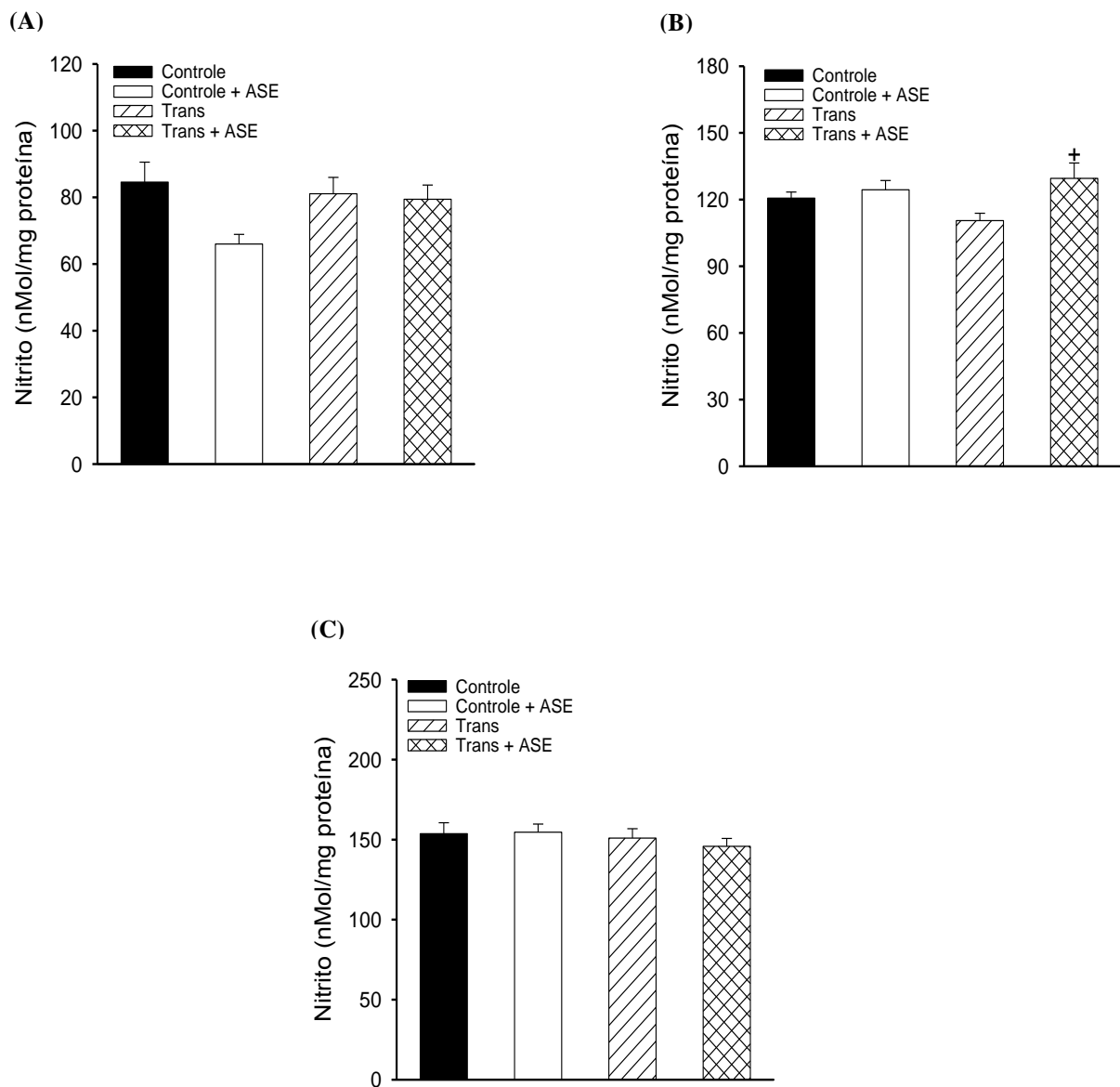


Figura 18 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o conteúdo total de nitrito em amostras de plasma (A), rim direito (B) e coração (C) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = 8 para todos os grupos. <sup>†</sup> p<0,05 em relação ao grupo trans.

#### 4.9 Efeito do tratamento com ASE sobre o Perfil Lipídico

Os níveis plasmáticos de triglicerídeos foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais trans quando comparados com os controles. O tratamento com ASE reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) esses níveis no grupo Trans+ASE e Controle + ASE (Figura 19 A).

Os níveis plasmáticos de colesterol total foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais trans quando comparados com os controles (Figura 19 B).

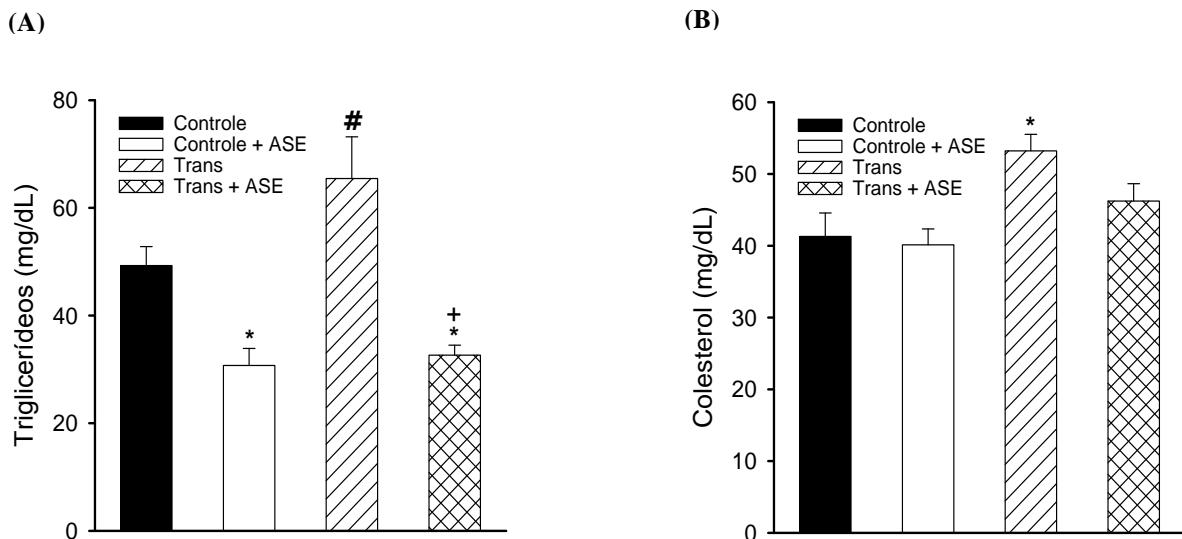


Figura 19 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis de triglicerídeos (A) e colesterol total (B) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n = 8$  para todos os grupos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle + ASE e +  $p < 0,05$  em relação ao grupo trans.

#### 4.10 Efeito do tratamento crônico com ASE sobre o Tecido Adiposo

O peso do tecido adiposo não foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais estudados (Figura 20).

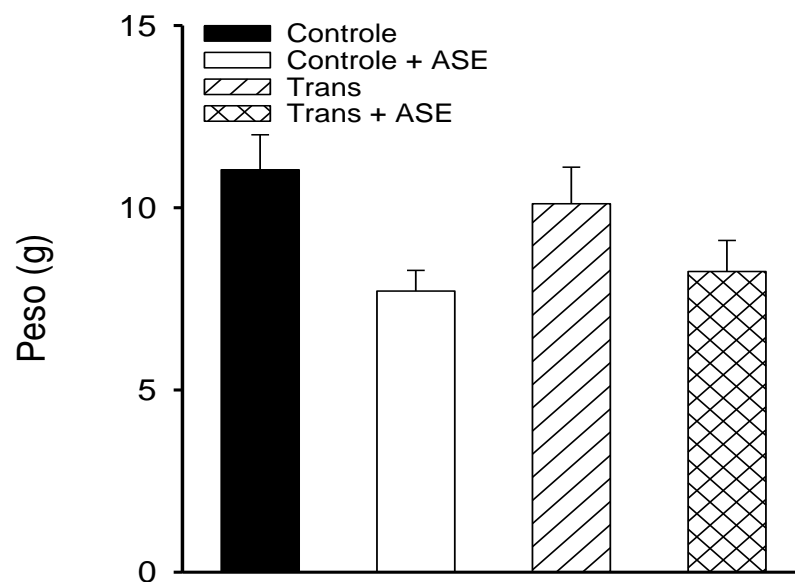


Figura 20 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o peso do tecido adiposo da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n = 8$  para todos os grupos.

#### 4.11 Efeito do tratamento crônico com ASE sobre a Glicemia e Resistência à Insulina

Os níveis plasmáticos de glicose não foram significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes entre os grupos estudados (Figura 21 A).

Os níveis de insulina plasmáticos encontraram-se significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) no grupo trans, quando comparados com os controles (Figura 21 B).

A resistência à insulina pode ser determinada pelo índice de HOMA, que apresentou-se significativamente ( $p < 0,05$ ) aumentado no grupo trans, quando comparado aos controles (Figura 21 C).

O índice HOMA BcC indicativo da capacidade funcional de célula  $\beta$  pancreática, apresentou-se significativamente aumentado ( $p < 0,05$ ) no grupo Trans quando comparado aos Controles (Figura 21 D). O tratamento com ASE reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) esse índice no grupo Trans (Figura 21 D).



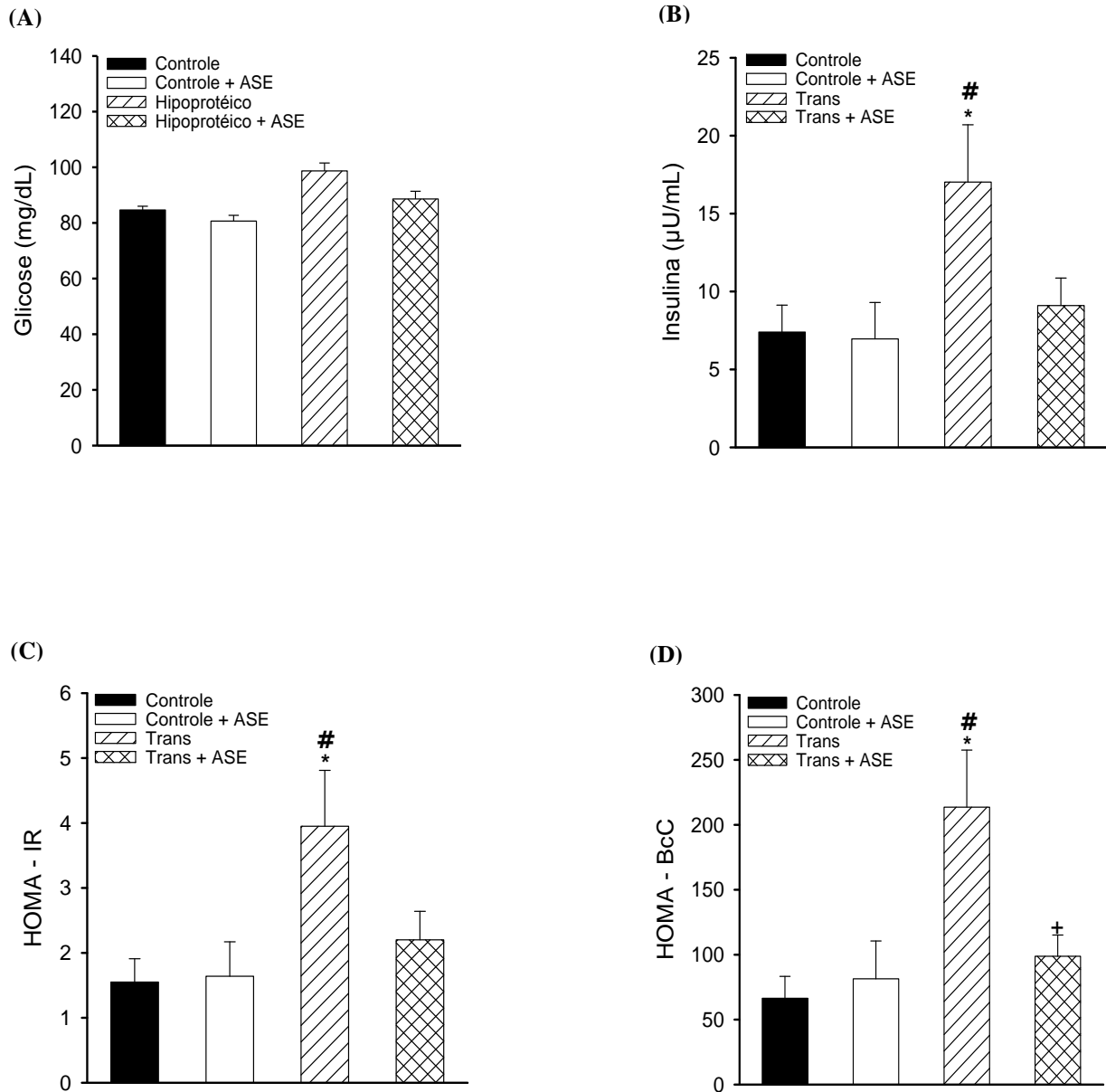


Figura 21 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis glicêmicos (A), insulinêmicos (B), o índice de HOMA (C) e o índice de HOMA BcC (D) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = 8 para todos os grupos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle + ASE e †  $p < 0,05$  em relação ao grupo trans.

#### **4.12 Efeito do tratamento crônico com ASE sobre o Teste de Tolerância (GTT) à Glicose e à Insulina (ITT)**

Os níveis glicêmicos significativamente aumentados encontrados no teste GTT nos diferentes tempos estudados demonstraram que o grupo trans desenvolveu intolerância à glicose quando comparado aos controles (Figura 22 A). O tratamento com ASE reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) esses níveis no grupo trans, como pode ser observado na área sobre a curva (ASC) (Figura 22 B).

Os níveis glicêmicos encontrados no teste ITT não foram significativamente diferentes nos tempos analisados entre os grupos estudados, como pode ser observado na área sobre a curva (ASC) (Figura 22 D).

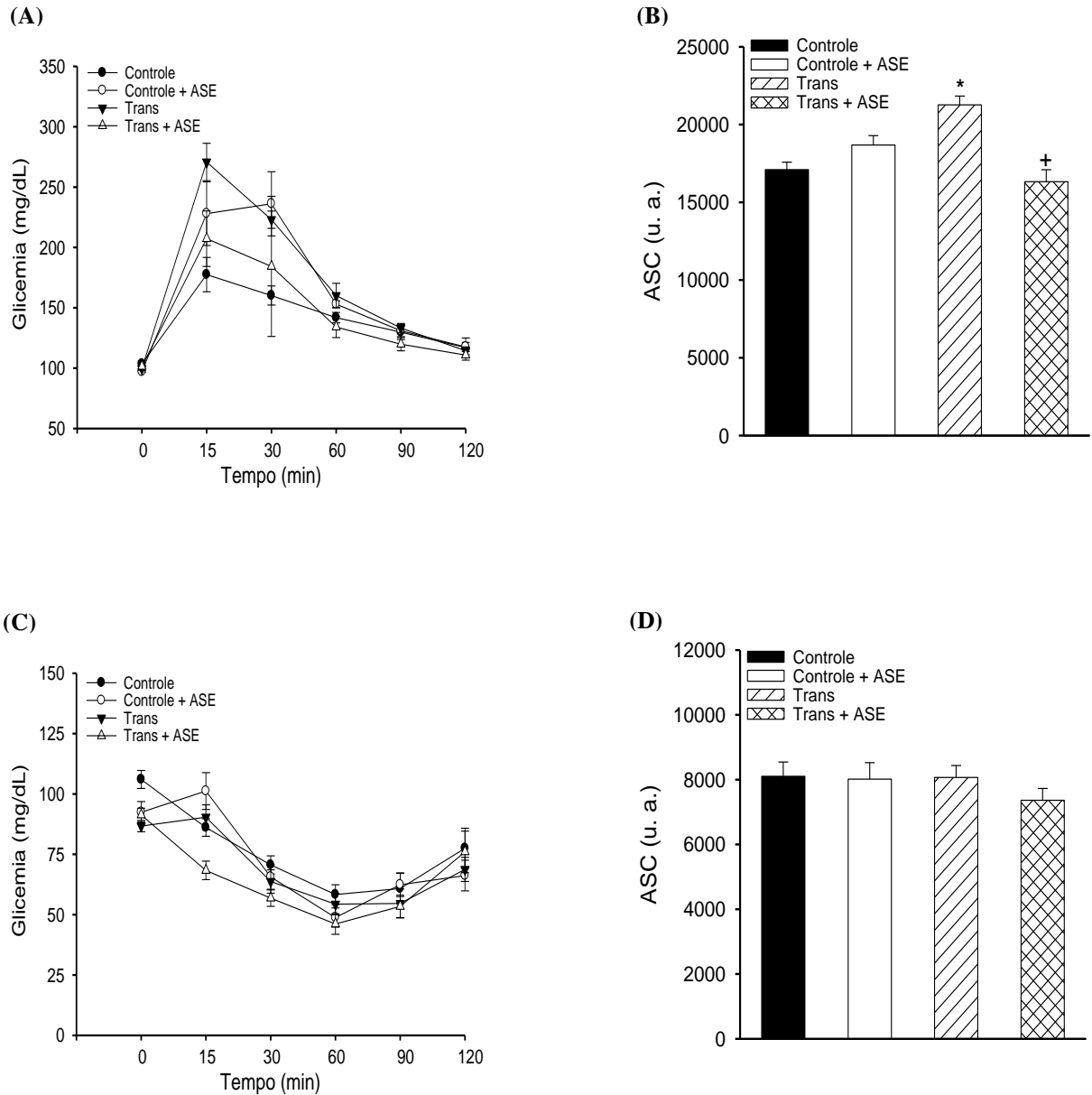


Figura 22 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre os níveis glicêmicos no teste de tolerância à glicose (A), na área sobre a curva do TTG (B), no teste de tolerância à insulina (C) e na área sobre a curva do ITT (D) da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle, Controle + ASE, Trans e Trans + ASE. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão;  $n=6$  para todos os grupos. \*  $p<0,05$  em relação ao grupo controle e †  $p<0,05$  em relação ao grupo trans.

#### **4.13 Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas da Cascata de Sinalização da Insulina no Tecido Cardíaco**

A expressão do receptor de insulina, da proteína AKT e AKT fosforilada e do transportador de glicose GLUT-4, foi avaliada por Western Blotting em ventrículo esquerdo cardíaco.

Não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 23).

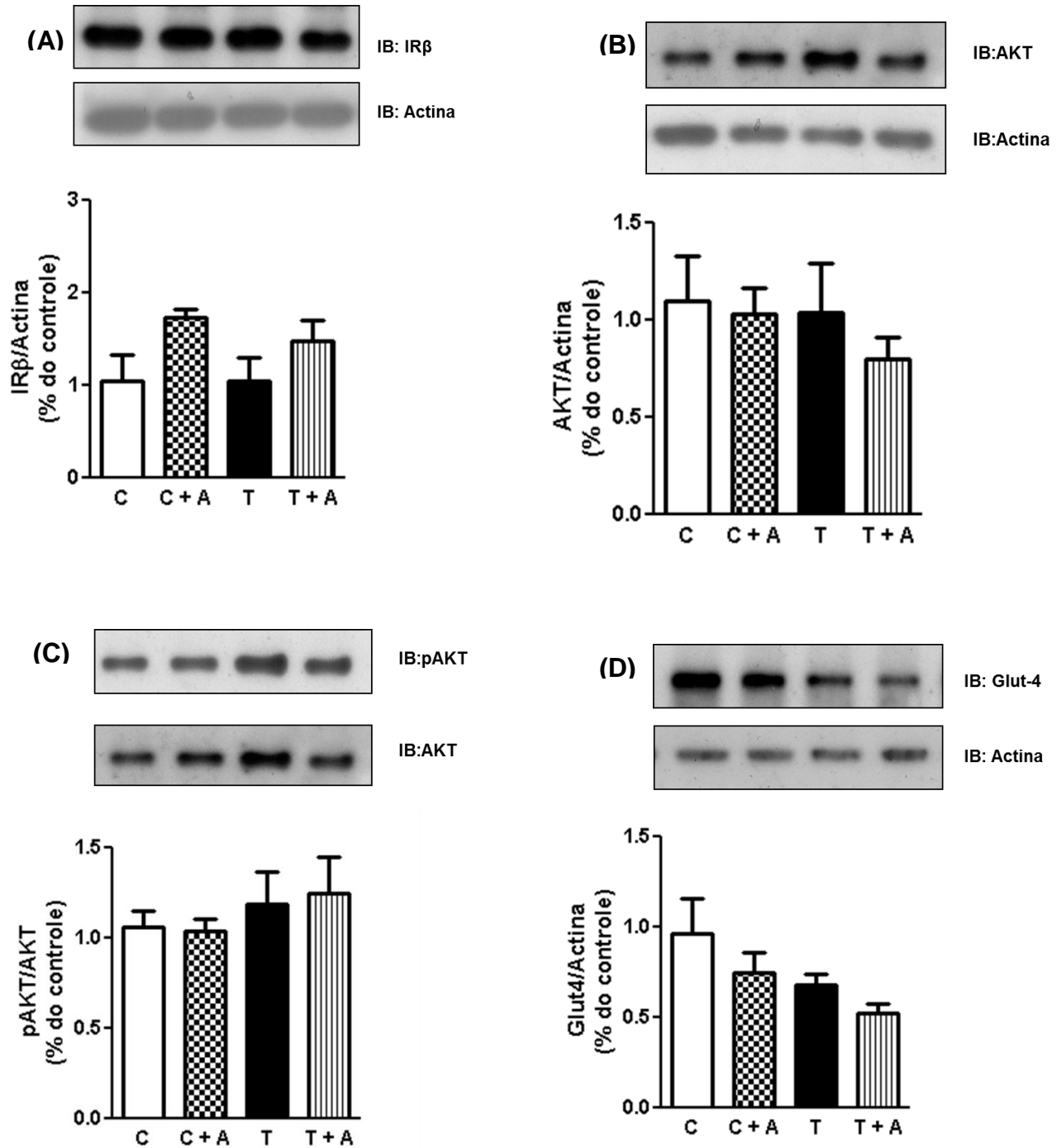


Figura 23 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre as expressões de IR (A), Akt (B), relação Akt/P-Akt (C) e GLUT-4 (D) de tecido cardíaco da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle (C) , Controle + ASE (C+ASE), Trans (T) e Trans + ASE (T+ASE). Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=3 para todos os grupos.

#### **4.14 Efeito do tratamento com ASE sobre as proteínas da Cascata de Sinalização da Insulina no Tecido Adiposo**

A expressão do receptor de insulina, da proteína AKT e AKT fosforilada e do transportador de glicose GLUT-4, foi avaliada por Western Blotting em tecido adiposo.

Não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 24).

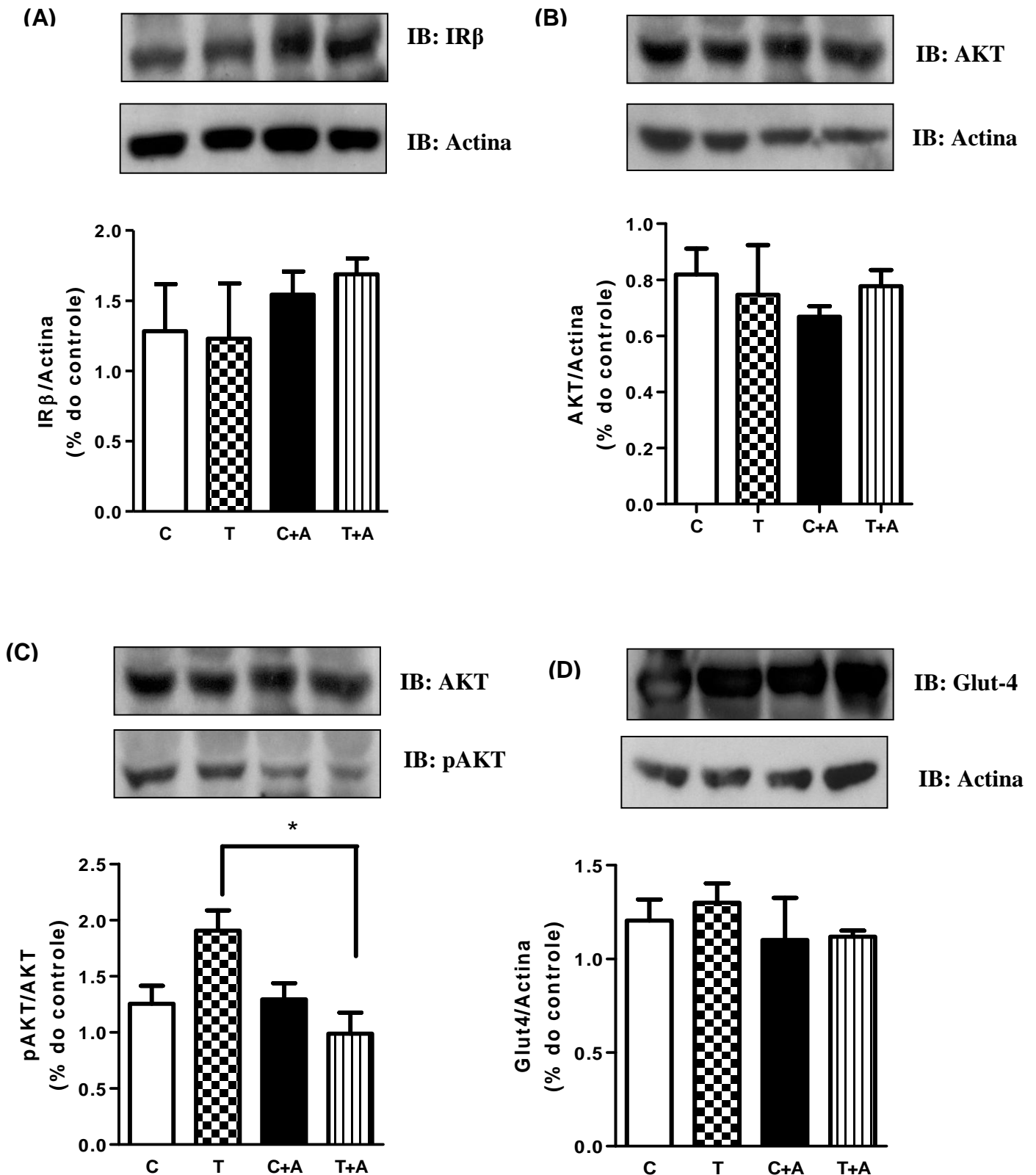


Figura 24 – Efeito do tratamento (lactação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre as expressões de IR (A), Akt (B), relação Akt/P-Akt (C) e GLUT-4 (D) de tecido adiposo da prole de machos com 3 meses, dos grupos Controle (C), Controle + ASE (C+ASE), Trans (T) e Trans + ASE (T+ASE). Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=3 para todos os grupos. \* p<0,05 em relação ao grupo Trans + ASE.

## 5 DISCUSSÃO

A programação metabólica pode ser definida como um evento uterino, que tem efeitos permanentes sobre a fisiologia, estrutura e metabolismo do indivíduo (Godfrey & Barker, 2000). Neste estudo, o peso corporal, metabolismo glicídico e lipídico, disfunção endotelial e estresse oxidativo, foram avaliados em animais adultos filhos de mães que foram expostas a dieta rica em AGT durante a lactação, concomitante ou não com exposição a extrato hidroalcoólico de caroço de açaí (ASE).

No presente estudo foi demonstrado que o consumo de AGT durante a lactação imprimiu alterações metabólicas na prole adulta como a hiperinsulinemia e resistência à insulina, a hipercolesterolemia, aumento do dano oxidativo e redução da defesa antioxidante. Por outro lado, o tratamento com o ASE durante a lactação mostrou reduzir a resistência a insulina no grupo Trans, diminuir os níveis plasmáticos de triglicerídeos e níveis pressóricos, além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathiona peroxidase, e a biodisponibilidade de NO.

Em relação ao consumo alimentar dos grupos estudados não houve diferença entre a ingestão da ração, o que propõe que o ganho de peso esperado seja o mesmo em função das dietas serem isoenergéticas. Ao analisar dados de peso corporal, o consumo de AGT na lactação não teve efeito na prole, uma vez que não houve diferença do peso corporal entre os grupos tanto aos 21 quanto aos 90 dias de idade. Kavanagh *et al.*, 2010, notou em seu estudo que os animais expostos ao AGT durante a lactação tiveram crescimento retardado na primeira semana de vida, mas acelerada durante a segunda semana, de tal modo que eles tinham pesos corporais comparáveis aos 14 dias de vida, sem diferença entre os grupos no momento do desmame e o mesmo na idade adulta para os animais machos, assim como observado neste estudo.

Entretanto, estudo similar, fornecendo 7% de AGT na dieta durante a gestação e lactação, encontrou redução no peso corporal de animais expostos ao AGT em comparação aos animais controles aos 90 dias de idade, inclusive observando ingestão dietética menor nestes animais. Foi sugerido, que a programação metabólica com AGT pode modular o comportamento alimentar dos animais através de adaptações em mecanismos hipotalâmicos controladores da fome e apetite, neste caso de exposição tanto na gestação quanto na lactação, diferentemente deste estudo (Albuquerque *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002).



Quanto à composição corporal, embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os grupos estudados, é possível observar que há uma tendência à diminuição no conteúdo de gordura corporal dos animais que receberam ASE durante a lactação, visto pelo peso bruto do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal coletados no momento da eutanásia. Isto é importante, pois o tecido adiposo contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia aterogênica, hipertensão arterial, e favorece para um estado pró-trombótico e pró-inflamatório (Allende-Vigo, 2010). Esta hipótese é reforçada por estudos recentes sobre a regulação da função do tecido adiposo por antocianinas que demonstram que as mesmas apresentam um efeito anti-obesidade e melhoraram a função dos adipócitos por aumentar a expressão da adiponectina, uma das principais adipocinas, *in vitro* e em sistemas *in vivo* (Tsuda, 2008). Por outro lado, estudo realizado com polifenóis de limão, mostrou supressão do ganho de peso e acúmulo de gordura corporal, aumentando  $\beta$ -oxidação peroxissomal através de *upregulation* do nível de RNAm de acyl Coa oxidase no fígado e tecido adiposo branco, o qual provavelmente foi mediado por *upregulation* dos níveis de mRNA de PPAR $\alpha$  (Fukuchi *et al.*, 2008).

O AGT é reconhecidamente fator de risco para desenvolvimento de doença cardiovascular, resistência à insulina e obesidade acompanhada por inflamação sistêmica (Dhibi *et al.*, 2011). Tem-se relacionado o seu consumo com elevação de marcadores inflamatórios como IL-6 e TNF- $\alpha$ , marcadores de ativação endotelial incluindo VCAM e ICAM, e-selectina. Sugere-se que os AGT estão envolvidos na promoção da disfunção endotelial, como visto em redução do fluxo em artéria braquial (De Ross *et al.*, 2001). Entretanto, quando a exposição aos AGT ocorre através da lactação, um possível efeito agressor ao endotélio vascular da prole adulta não foi verificado neste estudo, uma vez que não foi encontrada diferença na resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Assim como, o tratamento com o ASE, realizado somente durante a lactação, também não alterou a resposta endotelial nos grupos estudados.

O tratamento com ASE reduziu de forma significativa neste estudo a pressão arterial sistólica de animais controles tratados, e a pressão diastólica dos animais trans tratados. Não foi observada diferença significativa entre os valores de pressão arterial dos animais que receberam trans durante a lactação e os controles. É possível que o tempo de exposição a dieta rica em trans (somente durante a lactação) no qual foram submetidas as mães, não foi suficiente para o desenvolvimento da hipertensão na prole quando na idade adulta. Contudo, foi notável o efeito do ASE, rico em polifenóis, em prevenir o aumento da pressão arterial diastólica dos animais Trans. O efeito anti-hipertensivo observado neste estudo corrobora com

resultados previamente publicados pelo nosso grupo em modelos de hipertensão (Rocha *et al.*, 2008).

Sugere-se que o NO gerado pela conversão de L-arginina na parede arterial através da ação enzimática da eNOS é um dos maiores determinantes do relaxamento vascular (Malinski, 2005). Observou-se, pela medida do nitrito, aumento na biodisponibilidade do NO nos animais trans + ASE, o que pode ter estimulado a vasodilatação, reduzindo a resistência vascular periférica e conseqüentemente os valores de pressão arterial.

Estudos mostram que a inibição da geração de EROs com antioxidantes diminui a pressão arterial e previne o desenvolvimento da hipertensão, em modelos experimentais de hipertensão arterial (Costa *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2007; Frenoux *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001). Em nosso estudo foi verificado aumento da atividade da catalase nos animais trans + ASE, e também redução do dano oxidativo, indicada pela menor produção de subproduto da peroxidação lipídica no rim, importante sítio de controle de pressão arterial através do sistema renina angiotensina, o que também pode ter contribuído para o efeito anti-hipertensivo do ASE.

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas no meio celular, super produção de agentes oxidantes que sobrecarregam a capacidade antioxidante (Grossman, 2008). Neste estudo observamos diferença no dano oxidativo induzido pelo consumo de AGT na lactação, apenas medido pela carbonilação de proteínas, entretanto este parâmetro não foi recuperado pelo tratamento com o ASE, embora saibamos do seu potencial antioxidante.

À respeito do metabolismo lipídico, animais filhos de mães que receberam AGT durante a lactação apresentaram aumento do colesterol plasmático total em relação ao controle. Estudo realizado com programação metabólica induzida com Trans durante a gestação e lactação demonstrou que aos 21 dias este animal tem aumento dos valores de colesterol plasmático (Pisani *et al.*, 2008b), porém nosso trabalho é pioneiro em mostrar que esta alteração se mantém até a idade adulta como resultado provável da impressão metabólica ocorrida. As gorduras trans elevam o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), como os ácidos graxos saturados, e ainda com um efeito adicional, o de reduzir o colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), aumentando, portanto, a relação colesterol total/HDL (Mensink *et al.*, 2003). Os mecanismos responsáveis por essas alterações parecem estar associados com a modulação de receptores de membranas celulares, por meio da incorporação de fosfolípidos, assim como com a regulação da transcrição de genes (Mensink *et al.*, 2003). Neste estudo não foi investigada a fração do colesterol total que está

aumentada. Entretanto considerando que 60 a 70% do colesterol total é formado por fração de LDL-col, podemos sugerir que este constitua grande parte do colesterol total, observado em nosso estudo. Devemos ressaltar que a elevação do LDL-col, está relacionada com o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (Godoy-Matos, 2005).

Embora não tenhamos encontrado em nossos resultados elevação dos valores de triglicerídeos nos animais Trans em relação aos controles, foi possível observar, uma redução dos níveis de triglicerídeos pelo ASE, tanto em animais controles e nos submetidos a dieta rica em trans no início da vida. Este achado corrobora com resultados anteriores obtidos no nosso laboratório no qual a prole adulta de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ASE, rico em polifenóis, apresentou redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos (Oliveira *et al.*, 2010). Provavelmente esse efeito se deve aos polifenóis presentes no extrato, já que, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com polifenóis provenientes do limão proporcionou redução dos níveis de triglicerídeos (Fukuchi *et al.*, 2008).

Em relação ao metabolismo glicídico não foi encontrada diferença entre as glicemias de jejum dos animais estudados, entretanto observou-se uma elevação dos níveis de insulina de jejum nos animais do grupo Trans, e, utilizando-se do modelo homeostático, Índice de HOMA, confirmou-se a resistência a insulina nos animais trans em relação ao controle, indicando que os AGT podem interferir no mecanismo de ação deste hormônio, assim como foi visto por Osso *et al.*, 2008.

Vários são os trabalhos que apontam a relação dos AGT com a resistência à insulina (Ludwig *et al.*, 2003; Bray *et al.*, 2002; Lovejoy *et al.*, 2002; Simopoulos, 1994; Mann, 1994). O mecanismo envolvido seria não somente por diminuir a fluidez de membrana e, conseqüentemente, alterar a atividade do receptor de insulina, mas também por inibir a formação dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC- PUFA), que estão positivamente correlacionados com a sensibilidade à insulina (Simopoulos, 1994).

O tratamento com ASE durante a lactação imprimiu uma redução da resistência à insulina aos 90 dias de vida, com redução dos valores do HOMA-IR, e melhora da capacidade funcional de células  $\beta$  pancreáticas visto pelo HOMA-BcC. Esses dados corroboram com dados prévios do nosso laboratório que demonstraram que o Extrato de Casca de Uva, também rico em polifenóis, apresenta efeito protetor na hiperglicemia e resistência à insulina de animais adultos, cujas mães receberam dieta hiperlipídica durante a lactação (Emiliano *et al.*, 2011), assim como no sistema de sinalização de insulina em camundongos diabéticos, provavelmente em função de aumento no conteúdo do receptor da insulina, da Akt fosforilada

e do GLUT-4 no músculo esquelético (Soares de Moura *et al.*, 2012). Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório sugerem efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperinsulinêmico do ASE quando utilizado em tratamento crônico em animais obesos (Oliveira *et al.*, 2010). É possível que se o consumo de ASE tivesse perdurado ao longo da vida esse mesmo efeito fosse encontrado neste estudo.

Diante desses achados, poderíamos inferir que há a possibilidade do ASE atuar reduzindo a resistência à insulina pela ativação da cascata de sinalização de insulina nos tecidos periféricos. Com este objetivo, foi avaliada a expressão de proteínas chaves da cascata de sinalização da insulina em tecido cardíaco e adiposo. Apesar da nítida resistência à insulina apresentada pelo grupo Trans, não foi observada nenhuma diferença estatística quanto à expressão de proteínas da cascata de sinalização da insulina em tecido adiposo e cardíaco. Segundo Saltiel & Kahn, 2001, cerca de 75% da captação de glicose dependente da ação da insulina ocorre no músculo esquelético, enquanto o tecido adiposo é responsável apenas por uma pequena fração. Desta forma, a futura investigação da cascata de sinalização de insulina em músculo esquelético pode ajudar a elucidar esta questão.

Estudos mostram que o aumento de EROs pode levar a resistência à insulina, através da ativação da cascata da insulina via fosforilação em serina e inibir em tirosina. As formas do substrato de receptor de insulina (IRS) fosforilada em serina/treonina são menos capazes de se associar ao receptor de insulina (IR) e as proteínas subsequentes na cascata de sinalização como a PI3-quinase, resultando em prejuízo na ação da insulina, incluindo a ativação da AKT e o transporte de glicose através do GLUT-4 (Evans, 2007).

Sugere-se que os compostos fenólicos presentes no vinho tinto reduzem e/ou neutralizam radicais livres e promovem a formação de NO (Marfella *et al.*, 2006). Neste contexto, estudos demonstraram que no músculo esquelético, o NO aumenta a expressão do GLUT-4 via mecanismos dependentes de GMP cíclico e AMPK (Lira *et al.*, 2007).

Entretanto, por outro lado, a insulina é um hormônio que exerce um efeito antioxidante pela supressão da geração de EROs. Com o prejuízo na ação da insulina, provocado pela resistência a este hormônio, e o aumento na sua produção, pode ocorrer aumento das EROs, desencadeando o dano oxidativo (Dandona *et al.*, 2005).

Por fim, resultados distintos encontrados na literatura mundial podem ser fruto dos diferentes conteúdos de gordura hidrogenada usados na dieta. Além disso, com o objetivo de estudar o efeito da programação metabólica induzida exclusivamente no período de lactação, as mães apenas foram expostas ao agente agressor, ácido graxo trans, durante um curto período de tempo, os 21 dias de lactação. É possível que efeitos mais expressivos tivessem

vido encontrados com a exposição às modificações da dieta, caso esta tivesse sido ofertada também durante a gestação.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que o consumo de AGT durante a lactação compromete o metabolismo glicídico da prole adulta, levando a aumento da resistência à insulina possivelmente por um comprometimento na cascata de sinalização de insulina induzida por um aumento do estresse oxidativo, além de induzir um comprometimento no metabolismo lipídico com aumentos dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos. Entretanto, o uso concomitante de ASE durante a lactação promoveu na idade adulta níveis pressóricos reduzidos dos animais tratados, possivelmente em função do aumento das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase, e da disponibilidade do óxido nítrico, aumentando a vasodilatação e reduzindo o dano endotelial. Além de, aumentar a sensibilidade à insulina e atenuar a dislipidemia. Desta forma, podemos sugerir que o uso do ASE durante a lactação promove efeitos protetores a longo prazo na prole, com redução de fatores de risco para doença cardiovascular.

## REFERÊNCIAS

- Aalinkeel R, Srinivasan M, Song F, Patel MS. Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(3):640-8.
- Achyara J, Punched NA, Taylor JA, Thompson RPH, Pearson TC. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol.* 1991; 47:287-91.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Aitchison JM, Dunkley WL, Canolty NL, Smith LM. Influence of diet on trans fatty acids in human milk. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30(12):2006-15.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(10):1634-50.
- Albuquerque KT, Sardinha FL, Telles MM, Watanabe RL, Nascimento CM, Tavares do Carmo MG, Ribeiro EB. Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. *Nutrition.* 2006 Jul-Aug;22(7-8):820-9.
- Alfaradhi MZ, Ozanne SE. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet.* 2011; 2:27.
- Allende-Vigo MZ. Pathophysiologic mechanisms linking adipose tissue and cardiometabolic risk. *Endocr Pract.* 2010 Jul-Aug;16(4):692-8.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N e cols. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257:79–83.
- Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(5):1419-26.
- Ascherio A, Willett WC. Health effects of trans fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(4):1006-1010.
- Aued-Pimentel S.; Caruso MSF.; Cruz JMM.; Kumagai, EEE Corrêa, DUO. Ácidos graxos saturados versus ácidos graxos trans em biscoitos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 2003, 62, 131.
- Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50(2):291-303.
- Balazy M. Trans-arachidonic acids: new mediators of inflammation. *J Physiol Pharmacol.* 2000;51(4 Pt 1):597-607.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1982; 32:131-138.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life, *BMJ.* 1990; 4;301(6746):259-62.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995; 311(6998): 171-174.

Barrera-Relland D, Block JM. Ácidos grasos trans em aceites hidrogenados: implicaciones técnicas y nutricionales. *Grasas Aceites* 1996;44(4-5):28.

Basso R, Almeida IG, Mancini JF. Avaliação qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos trans em gorduras vegetais hidrogenadas. *Bol SBCTA* 1999; 33(1):57-63.

Bertolino CN, Castro TG, Sartorelli DS, Ferreira SRG, Cardoso MA. Influência do consumo alimentar de ácidos graxos trans no perfil de lipídios séricos em nipo-brasileiros de Bauru. São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2006; 22(2): 357-364.

Bobbio FO, Druzian JL, Abrão PA, Bobbio PA, Fadelli S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterp oleracea* Mart). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2000; 20: 388-390.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32 Suppl 3:14-23.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

Bramlage P, Pittrow D, Wittchen HU, Kirch W, Boehler S, Lehnert H, Hoefler M, Unger T, Sharma AM. Hypertension in overweight and obese primary care patients in highly prevalent and poorly controlled. *Am j Hypertens.* 2004; 17(10):904-910.

Brasil. Lei nº 8078, 11 de setembro de 1990. *Diário Oficial.* Brasília, 12 set, 1990. Seção I (supl.). p.1-12. Dispõe sobre a proteção do consumidor.

Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr.* 2002;132(9):2488-91.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 13;414(6865):813-20.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidative stress. *Circ Res.* 2000; 87:840.

Callera GE, Yeh E, Tostes RC, Caperuto LC, Carvalho CR, Bendhack LM. Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2004; 141(7):1151-8.

Carlson SE, Clandinin MT, Cook HW, Emken EA, Filer LJ Jr. trans Fatty acids: infant and fetal development. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(3):715S-36S.



- Castro, MA de; Barros, RR; Bueno, MB; César, CLG; Fisberg, RM. Trans fatty acid intake among the population of the city of São Paulo, Brazil. *Rev. Saúde Pública.* 2009; 43(6): 991-997.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative Stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(5):861-823.
- Chen X, Touys RM, Park SB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide and dismutase in stroke – SHR. *Hypertension* 2001; 38 (2), 606-611.
- Chiara VL, Sichieri R, Carvalho TSF. trans fatty acids of some foods consumed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Nutr Campinas,* 2003; 16(2): 227-223.
- Chiara VL, Sichieri R. Food consumption of adolescents. A simplified questionnaire for evaluating cardiovascular risk. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77(4): 337-41.
- Chiara VL; Rosilaine S; Jorge R; Brasil, AP. Ácidos graxos Trans: doenças cardiovasculares e saúde materno infantil. *Rev. Nutr.* 15 (3): 341-349; 2002.
- Choy PC, Tran K, Hatch GM, Kroeger EA. Phospholipid metabolism in the mammalian heart. *Prog Lipid Res.* 1997;36(2-3):85-101.
- Christensen FH, Stankevicius E, Hansen T, Jørgensen MM, Valverde VL, Simonsen U, Buus NH. Flow- and acetylcholine-induced dilatation in small arteries from rats with renovascular hypertension--effect of tempol treatment. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul 2;566(1-3):160-6
- Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2006. 111:81-98.
- Consolim-Colombo FM, Fiorino P. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica – aspectos clínicos. *Rev Bras de Hipertensão.* 2005; 12:251-5.
- Cook HW. The influence of trans-acids on desaturation and elongation of fatty acids in developing brain. *Lipids.* 1981;16(12):920-6.
- Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1994; 23:229-235.
- Costa CA, Amaral TA, Carvalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Moss MB, Valença SS, de Moura RS, Resende AC. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. *Am J Hypertens.* 2009; 22(12):1242-1249.
- Cotrell EC, Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav.* 2008; 1: 17-28.
- Cracowski J, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: Physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23: 360.

Cubbon RM, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clin Sci*. 2009; 117:173–190.

Dai DZ, Dai Y. Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6: 787-794.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 2005; 111(11): 1448-54.

Danish Nutrition Council, 2003. The influence of trans fatty acids on health (fourth edition). Stender,S., Dyerberg, J. ed. Available from: [www.ernaeringsraadet.dk](http://www.ernaeringsraadet.dk). Cited:12 nov.2004

de Souza AS, Rocha MS, Carmo MD. Effects of a normolipidic diet containing trans fatty acids during perinatal period on the growth, hippocampus fatty acid profile, and memory of young rats according to sex. *Nutrition*. 2011 Dec 12.

De Souza Caldeira Filho J, Moura AS. Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2000;108-13

Desai M, Hales CN. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1997;72(2):329-48

Dhibi M, Brahmi F, Mnari A, Houas Z, Chargui I, Bchir L, Gazzah N, Alsaif MA, Hammami M. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2011; 23;8(1):65

Dorfman SE, Laurent D, Gounarides JS, Li X, Mullarkey TL, Rocheford EC, Sari-Sarraf F, Hirsch EA, Hughes TE, Commerford SR. Metabolic implications of dietary trans-fatty acids. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17(6):1200-7.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol*. 1990; 186: 421-431.

Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010; 59(4):459-69.

Emiliano AF, de Cavalho LC, da Silva Cristino Cordeiro V, da Costa CA, de Oliveira PB, Queiroz EF, Col Moreira DD, Boaventura GT, de Moura RS, Resende AC. Metabolic disorders and oxidative stress programming in offspring of rats fed a high-fat diet during lactation: effects of a vinifera grape skin (ACH09) extract. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 58(3):319-28.

Enke U, Jaudszus A, Schleussner E, Seyfarth L, Jahreis G, Kuhnt K. Fatty acid distribution of cord and maternal blood in human pregnancy: special focus on individual trans fatty acids and conjugated linoleic acids. *Lipids Health Dis*. 2011; 30;10:247.

Enke U, Seyfarth L, Schleussner E, Markert UR. Impact of PUFA on early immune and fetal development. *Br J Nutr*. 2008; 100(6):1158-68.

Evans JL. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? *Indian J Med Res.* 2007; 125(3):355-72.

Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.* 2010; 12(4):267-75.

Fernández-San Juan, P.-M. Trans fatty acids (tFA): sources and intake levels, biological effects and content in commercial Spanish food. *Nutr. Hosp.* 2009; 24(5): 515-520.

Ferreira, AL; Matsubara, LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Méd. Brasil.* 1997; 43(1): 61-68.

Ferreri, C.; Kratzsch, S.; Brede, O.; Marciniak, B.; Chatgililoglu, C. Trans lipid formation induced by thiols in human monocytic leukemia cells. *Free Radic. Biol. Med.* 38:1180–1187; 2005.

Fitzpatrick DF, Fleming RC, Bing B, Maggi DA, O'Malley RM. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(12): 6384-90.

Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly.* 2010; E1-E12.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 114-121.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993; 341(8843): 454-7.

Frenoux SMR, Noirot B, Porst ED, Madame S, Blond SP. Very High alpha tocoferol diet diminishes oxidative stress and hypercoagulation in hipertensive rats but not in normotensive rats. *Med Sci Monit* 2002; 8 (10), 401-407.

Frota, KMG; Matias, ACG; Arêas, JAG. Influence of food components on lipid metabolism: scenarios and perspective on the control and prevention of dyslipidemias. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2010; 30: 7-14,.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:2005–2010.

Fukuchi Y, Hiramitsu M, Okaba M, Hayashi S, Nabeno Y, Osawa T, Naito M. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by Up-regulation of mRNA levels of the enzymes involved in beta-oxidation in mouse white adipose tissue. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 43(3):201-9.

Furchgott RT & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.

Gagliardi, ACM; Mancini Filho, J; Santos, RD. Nutritional profile of foods with zero trans fatty acids claim. Rev. Assoc. Med. Bras. 2009; 55(1): 50-53.

Gallori S, Bilia AR, Bergonzi MC, Barbosa WLR, Vincieri FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterp oleracea Mart.* (Açaí palm). Cromatografia. 2004; 59: 739-743.

Ganong WF. Fisiologia médica. 17ª ed. Rio de Janeiro: editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1995.

Gennser G, Rymark P, Isberg PE. Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. Br Med J (Clin Res Ed). 1988; 296: 1498-1500.

Gill H, Mugo M, Whaley-Connell A, Stump C, Sowers JR. The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome. Am J Med Sci. 2005;330(6):290-4.

Godfrey K, Robinson S. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. Proc Nutr Soc. 1998;57(1):105-11.

Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. Am J Clin Nutr. 2000; 71: 1344-1352.

Godoy-Matos AF. Síndrome metabólica. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum S. Analyses of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry. 1982; 126:131-138.

Griess TW, Nieto FJ, Shahar E, et al. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus: Atherosclerosis Risk in Communities Study. N Engl J Med. 2000; 342:905.

Grossman E. Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? Diabetes Care. 2008; 31 2:S185-189.

Gylfe E: Nutrient secretagogues induce bimodal early changes in cytoplasmic calcium of insulin-releasing ob/ob mouse beta-cells. J Biol Chem 1988;263:13750-13754.

Hansen JC, Pedersen HS, Mulvad G. Fatty acids and antioxidants in the Inuit diet. Their role in ischemic heart disease (IHD) and possible interactions with other dietary factors. A review Arctic Med Res. 1994;53(1):4-17. .

Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. Diabetes Metab Res Rev. 2000; 16(4):230-6.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest. 1997; 2153-2157.

Harvey KA, Arnold T, Rasool T, Antalis C, Miller SJ, Siddiqui RA. Trans-fatty acids induce pro-inflammatory responses and endothelial cell dysfunction. Br J Nutr. 2008 Apr;99(4):723-31.

Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1203:120-125.

Houwelingen AC, Hornstra G. Trans fatty acids in early human development. *World Rev Nutr Diet* 1994;75:175-8.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996; 271:10697-10703.

Ibrahim A, Natrajan S, Ghafoorunissa R. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism.* 2005;54(2):240-6.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(24):9265-9269.

Innis SM. Dietary lipids in early development: relevance to obesity, immune and inflammatory disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007 Oct;14(5):359-64.

Irigoyen MC, Fiorino P, De Angelis K, Krieger EM. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. *Rev Bras de Hipertensão.* 2005;12:229-33.

Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimram A. Sodium and Angiotensin in hypertension induced by long term nitric oxide blockade. *Hypertension.* 1993; 21:944-948.

Kavanagh K, Sajadian S, Jenkins KA, Wilson MD, Carr JJ, Wagner JD, Rudel LL Neonatal and fetal exposure to trans-fatty acids retards early growth and adiposity while adversely affecting glucose in mice. *Nutr Res.* 2010; 30(6):418-26.

Kawashima LM, Soares LMV. Gordura em Sorvetes. Nacionais: conteúdo, composição de ácidos graxos e teor de trans-isômeros. *Ciênc Tecnol Alim* 1993; 13(2):194-202.

Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2004;11(8):1041-64.

Koletzko B, Muller J. Cis- and trans-isomeric fatty acids in plasma lipids of newborn infants and their mothers. *Biol Neonate.* 1990;57(3-4):172-8.

Koletzko B. Trans fatty acids may impair biosynthesis of long-chain polyunsaturates and growth in man. *Acta Paediatr.* 1992;81(4):302-6.

Kummerow FA, Zhou Q, Mahfouz MM, Smiricky MR, Grieshop CM, Schaeffer DJ. Trans fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells. *Life Sci.* 2004 Apr 16;74(22):2707-23.

Lake R, Thomson B, Devane G, Scholes P. Trans fatty acid content of selected New Zealand Foods. *J Food Comp Anal* 1996; 9(4):365-74.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001; 12(6):455-461.

Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)*. 1994 ; 86(2):217-22.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental Origins of Adult Disease. *Med Princ Pract*. 2010; 19(2):87-98.

Larque E, Zamora S, Gil A. Dietary trans fatty acids affect the essential fatty-acid concentration of rat milk. *J Nutr*. 2000;130(4):847-51.

Larqué E, Zamora S, Gil A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Hum Dev*. 2001 Nov;65 Suppl:S31-41.

Leon DA., Koupilova I, Lithell HO, Berglund L, Mohsen R, Vagero D, Lithell UB, McKeigue PM. Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men. *BMJ*. 1996; 312(7028):401-6.

Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Bras de Hipertensão*. 2001; 8(4):383-92.

Lessa, I. Hipertensão arterial sistêmica no Brasil: tendência temporal/ Systemic arterial hypertension in Brazil: temporal trends . *Cad. Saúde Pública*. 2010; 26(8): 1470-1470.

Levine RI, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*. 1990; 186: 464-478.

Lira VA, Soltow QA, Long JH, Betters JL, Sellman JE, Criswell DS. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(4):E1062-8.

Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr*. 2005;135(3):562-6.

Loukides S, Bakakos P, Kostikas K. Oxidative stress in patients with COPD. *Curr Drug Targets*. 2011; 12(4): 469-477.

Lovejoy JC, Smith SR, Champagne CM, Most MM, Lefevre M, DeLany JP, Denkins YM, Rood JC, Veldhuis J, Bray GA. Effects of diets enriched in saturated (palmitic), monounsaturated (oleic), or trans (elaidic) fatty acids on insulin sensitivity and substrate oxidation in healthy adults. *Diabetes Care*. 2002;25(8):1283-8.

Lovejoy JC. Dietary fatty acids and insulin resistance. *Curr Atheroscler Rep*. 1999;1(3):215-20.

Lucas A. Programming not metabolic imprinting. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(2):602.

Ludwig DS. Diet and development of the insulin resistance syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2003;12 Suppl:S4.

Machado RM, Stefano JT, Oliveira CP, Mello ES, Ferreira FD, Nunes VS, de Lima VM, Quintão EC, Catanozi S, Nakandakare ER, Lottenberg AM. Intake of trans fatty acids causes

nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J Nutr.* 2010; 140(6):1127-32.

Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol.* 2005; 96(7B):13-24.

Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(1):77-84.

Marfella R, Cacciapuoti F, Siniscalchi M, Sasso FC, Marchese F, Cinone F et al. Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2006;23:974-81

Martin, CA; Matshushita, M; Souza, NE de. Ácidos graxos trans: implicações nutricionais e fontes na dieta/ Trans fatty acids: nutritional implications and sources in the diet. *Rev. Nutr.* 2004; 17(3): 351-359.

Matheus ME, de Oliveira Fernandes SB, Silveira CS, Rodrigues VP, de Sousa Menezes F, Fernandes PD. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol.* 2006 Sep 19;107(2):291-6.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 177:21-30.

McGee CD, Lieberman P, Greenwood CE. Dietary fatty acid composition induces comparable changes in cardiolipin fatty acid profile of heart and brain mitochondria. *Lipids.* 1996;31(6):611-6.

Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med* 2006; 6(5):501–514.

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77: 1146-55.

Mensink RP. Metabolic and health effects of isomeric fatty acids. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(1):27-30.

Mensink, R.P., Katan, M.B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New England Journal of Medicine.* 1990;323, 439–445.

Mesquita FF, Gontijo JAR, Boer PA. Expression of renin–angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 380–388.

Micha R, Mozaffarian D. Trans fatty acids: effects on cardiometabolic health and implications for policy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008, 79(3-5):147-52.

Moore CE, Dhopeswarkar GA. Placental transport of trans fatty acids in the rat. *Lipids*. 1980;15(12):1023-8.

Morgado N, Sanhueza J, Galleguillos A, Garrido A, Nieto S, Valenzuela A. Effect of dietary hydrogenated fish oil on the plasma lipoprotein profile and on the fatty acid composition of different tissues on the rat. *Ann Nutr Metab*. 1999;43(5):310-8.

Moura EG, Lisboa PC, Passos MCF. Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15: 176-188.

Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, Sousa PJ, da Silva AJ, Porto LC, Valença SS. Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(4):855-863.

Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, Rimm EB. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr*. 2004 Apr;79(4):606-12.

Mozaffarian D. Trans fatty acids - effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler Suppl*. 2006 May;7(2):29-32.

Muoio DM, Newgard CB. Fatty acid oxidation and insulin action: when less is more. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1455-6.

Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev*. 2006; 27:242–259.

Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S, Kadowaki T. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration *Diabetologia*. 2008; 51(5): 827-35.

Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF, de Cavalho LC, de Souza MA, de Lemos Neto M, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010; 56(6): 619-626.

Omega-3 fatty acids prevent whereas Trans fatty acids induce vascular inflammation and

Organização Pan Americana da Saúde. Guias para gerenciamento de riscos sanitários em alimentos. Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças – OPAS/OMS 2009:320.

Ossó FS, Moreira AS, Teixeira MT, Pereira RO, Tavares do Carmo MG, Moura AS. Trans fatty acids in maternal milk lead to cardiac insulin resistance in adult offspring. *Nutrition*. 2008;24(7-8):727-32.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.

Pettersen J, Opstvedt J. trans fatty acids. 5. Fatty acid composition of lipids of the brain and other organs in suckling piglets. *Lipids*. 1992;27(10):761-9.



Pettersen J, Opstvedt J. Trans fatty acids. 3. Fatty acid composition of the brain and other organs in the newborn piglet. *Lipids*. 1989 Jul;24(7):616-24.

Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oliveira JL, Losinskas-Hachul AC, Souza GI, das Graças T do Carmo M, Santos RV, de Mello MT, Tufik S, Seelaender M, Oyama LM, Oller do Nascimento CM, Watanabe RH, Ribeiro EB, Pisani LP. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NF $\kappa$ Bp65 signaling in adult offspring. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(3):265-71.

Pisani LP, Oller do Nascimento CM, Bueno AA, Biz C, Albuquerque KT, Ribeiro EB, Oyama LM. Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. *Lipids Health Dis*. 2008 Apr 4;7:13.

Pisani LP, Oyama LM, Bueno AA, Biz C, Albuquerque KT, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. *Nutrition*. 2008 Mar;24(3):255-61.

Pozo-Insfran DD, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 2004; 52(6): 1539-45.

Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, et al. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J* 2001;356(pt 1):1.

Ramachandran A, Levonen AL, Brookes PS, Ceaser E, Shiva S, Barone MC, Darley-Usmar V. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Rad Biol Med*. 2002; 33(11):1465-34.

Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 1992; 70:593-599.

Rapopport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*. 1983; 9(4-5):281-296.

Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007; 3(1):46-56.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976;295(7):349-53.

Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992; 20:298-303.

Ribeiro, APB; Moura, JMLN de; Grimaldi, R; Gonçalves, LAG. Chemical interesterification: alternative to production of zero trans fats. *Quím. Nova*. 2007; 30(5): 1295-1300.

Risérus U. Trans fatty acids and insulin resistance. *Atheroscler Suppl*. 2006; 7(2):37-9.

Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, Madeira SV, Sousa PJ, Tano T, Schini-Kerth VB, Resende AC, Soares de Moura R. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe

oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol.* 2007 Feb;46(2):97-104.

Rocha AP, Resende AC, Sousa MVA, Carvalho LCRM, Sousa PJC, Tano T, Criddle DN, Porto LC, Valença SS, Soares de Moura R. Antihypertensive effects and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *Euterpe Oleracea Mart.* (Açaí). *J Pharmacol Toxicol.* 2008; 3(6): 435-448.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;13:799-806.

Santana DMN, Marques MM, Rosa CAR. Determinação por cromatografia gasosa da composição em ácidos graxos e teor de ácido trans oléico em algumas marcas de batata frita. *Bol SBCTA* 1999, 33(1):64-9.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen GS, Hart AN, Shanbrom E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea mart.* (acai). *J Agric Food Chem.* 2006; 1;54(22):8604-10

Scherr, C; Ribeiro, JP. O que o cardiologista precisa saber sobre gorduras trans/ What the cardiologist should know about trans fats. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007; 90(1): e4-e7.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:171-176.

Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(5):614-8.

Sichieri R, Siqueira KS, Pereira RA, Ascherio A. Short stature and hypertension in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Public Health Nutr.* 2000;3(1):77-82

Sichieri R. Dietary patterns and their associations with obesity in the Brazilian city of Rio de Janeiro. *Obes Res.* 2002;10(1):42-8

Siddiqui RA, Harvey KA, Ruzmetov N, Miller SJ, Zaloga GP. n-3 fatty acids prevent whereas trans-fatty acids induce vascular inflammation and sudden cardiac death. *Br J Nutr.* 2009 Dec;102(12):1811-9

Simopoulos AP. Is insulin resistance influenced by dietary linoleic acid and trans fatty acids? *Free Radic Biol Med.* 1994;17(4):367-72

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolis with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *AM. J. Enol. Vitic.* 1965; 16: 144-158.

Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54(11): 1515-20.

Soares de Moura R, Miranda DZ, Pinto ACA, Sicca RF, Souza MAV, Rubenich LMS, Carvalho LCRM, Rangel BM, Tano T, Madeira SVF, Resende AC. Mechanism of the

endothelium-dependent vasodilation and antihypertensive effect of brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44: 302-309 (b).

Soares de Moura R, Resende AC, Emiliano AF, Tano T, Mendes-Ribeiro AC, Correia ML, de Carvalho LC. The role of bradykinin, AT<sub>2</sub> and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol.* 2004; 141 (5): 860-866 (a).

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2006 Fev: 1–48.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.. 2010; 95 (1): 1-51.

Sotomayor, M.A., Perez-Guerrero, C., Herrera, M.D., Marhuenda, E. Effects of chronic treatment with simvastatin on endotelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1999; 17:769-779.

Sposito, AC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2007; v. 88, n. 1, p. 2-19.

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500 (1-3): 299-313.

Stukena I, Apanavičienė DA, Bahs G, Kalvelis A, Dzerve V, Ansmite B, Kalejs O, Lejnicks A. Blood pressure control in treated hypertensive patients in daily practice of latvian family physicians. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47(10):586-592.

Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors.* 2003; 3:276-284.

Sur G, Sur M, Kudor-Szabadi L, Sur L. Difficulties in achieving arterial hypertension control. *Maedica (Buchar).* 2011; 6(2):114-119.

Suzuki H, Zweifach W, Schmid-Schonbein GW. Vasodilator response of mesenteric arterioles to histamine in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 26:397-400.

Taddei S, Viedis AA, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Deffective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation.* 1996; 84:1298-1303.

Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 1999; 97:9-12.

Tinoco SM, Sichieri R, Setta CL, Moura AS, do Carmo MG. Trans fatty acids from milk of Brazilian mothers of premature infants. *J Paediatr Child Health.* 2008; 44(1-2):50-6.

Tinoco SMB, Sichieri R, Moura AS, Santos FS, Tavares do Carmo MG. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Cad. Saúde Pública*. 2007; 23(3):525-534.

Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CcC, Itani S, Lodish HF, Ruderman RB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(25):16309-16313.

Touyz R, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Res*. 2011; 34:5-14.

Touyz RM, Schiffrin EL. AngII-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999; 34:976-982.

Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(9-10):1302-14.

Touyz, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: Whats is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44: 248-52.

Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary Cyanidin 3-O-D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133(7):2125-30.

Tsuda T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins, possibility of preventing the metabolic syndrome. *J Agr Food Chem*. 2008; v.56 642-646.

Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J*. 2011; 12;10:45.

Valenzuela A, Nieto S. Technological innovation applicable to marine oils rich in n-3 fatty acids to allow their nutritional and pharmacological use: a challenge for the present decade. *Arch Latinoam Nutr*. 1994;44(4):223-31.

Valenzuela A; King J; Nieto S. *Grasas y Aceites*. 1995, 46, 369.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39:44-84.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36: 957-964.

Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, Reboldi G, Porcellati C. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*. 1997. 97:48-54.

Vidgren HM, Louheranta AM, Agren JJ, Schwab US, Uusitupa MI. Divergent incorporation of dietary trans fatty acids in different serum lipid fractions. *Lipids*. 1998;33(10):955-62.

Wang H, Knaub LA, Jensen DR, Jung DY, Hong EG, Ko HJ, Coates AM, Goldberg IJ, de la Houssaye BA, Janssen RC, McCurdy CE, Rahman SM, Choi CS, Choi CS, Shulman GI, Kim JK, Kim JK, Friedman JE, Eckel RH. Skeletal Muscle-Specific Deletion of Lipoprotein Lipase Enhances Insulin Signaling in Skeletal Muscle but Causes Insulin Resistance in Liver and Other Tissues. *Diabetes*. 2008 Oct 24.

Ward NC, Croft KD. Hypertension and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006; 33(9):872-876.

Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):179-97.

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23(15):5293–5300.

Wenzel DG, Kloepell JD. Incorporation of saturated and cis and trans unsaturated long-chain fatty acids in rat myocytes and increased susceptibility to arrhythmias. *Toxicology*. 1980;18: 27-36

Williams B. The year in hypertension. *JACC*. 2010; 55(1): 66–73.

Wiseman, H. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. *J. Nutr. Biochem*. 1996; 7: 2 – 15

World Health Organization. Manual on monitoring cardiovascular diseases. Washington (DC). 2001.

Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, Wu X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*. 2011; 216(2):327-33.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 2002; 8(11):1288–1295.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001; 7:941–946.

Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2300-2308.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Griendling K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998; 32:488-495.

Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NADPH oxidase. *Hypertension*. 2001; 38:1395-1399.

Zamboni L, Ferreri C, Cabrini L, Prata C, Chatgililoglu C, Landi L. Occurrence of trans fatty acids in rats fed a trans-free diet: a free radical-mediated formation? *Free Radic Biol Med*. 2006;40(9):1549-56.

Zambonin L, Prata C, Cabrini L, Maraldi T, Fiorentini D, Vieceli Dalla Sega F, Hakim G, Landi L. Effect of radical stress and ageing on the occurrence of trans fatty acids in rats fed a trans-free diet. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(4):594-601.

Zecchin HG, Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica - *Rev Soc Cardiol.* 2004;4:574:89.