

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Papel do TLR-4 na resposta inflamatória e resistência à insulina  
no tecido adiposo em condição de sobrecarga nutricional crônica**

**Fabiane Valentini Francisqueti**

Dissertação apresentada ao programa  
de Pós- graduação em Patologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista-  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

**Botucatu- SP**

**2014**

**Fabiane Valentini Francisqueti**

**Papel do TLR-4 na resposta inflamatória e resistência à insulina  
no tecido adiposo em condição de sobrecarga nutricional crônica**

Dissertação apresentada ao programa  
de Pós- graduação em Patologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista-  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Camila Renata Corrêa**

**Co-orientador: Prof. Dr. André Ferreira do Nascimento**

**Botucatu- SP**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Francisqueti, Fabiane Valentini.

Papel do TLR-4 na resposta inflamatória e resistência à insulina no tecido adiposo em condição de sobrecarga nutricional crônica / Fabiane Valentini Francisqueti. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Camila Renata Corrêa

Coorientador: André Ferreira do Nascimento

Capes: 40105008

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Síndrome metabólica. 4. Receptores Toll-like.

Palavras-chave: Inflamação; Obesidade; Receptor Toll-like 4; Síndrome metabólica.

## **Dedicatória**

---

*Aos meus pais, Moisés e Darlene, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todos os momentos e decisões. Que me deram bronca quando preciso, sem deixar de lado o carinho e cuidado de sempre. Que me ensinaram tudo que sei e que sou hoje.*

*Ao meu irmão Gabriel, que muito mais que irmão é amigo e companheiro, que será meu elo sanguíneo e de amor pro resto da vida.*

*A minha orientadora, Camila, que desde o começo sempre esteve ao meu lado ajudando, apoiando e me fazendo crescer e aprender nesse campo novo e inexplorado pra mim: a pesquisa. Pela amizade e apoio em todos os momentos.*

*Ao meu co-orientador, André, por toda paciência e ensinamentos.*

*Aos amigos de Botucatu: Andréa, Damiana, Sabrina, Maria Eugênia, Igor, Klinsmann, Renato, Camila, Camila Maria, por me ajudarem com tudo que precisei e agüentarem meus momentos de irritação. Também pela companhia nas viagens, afinal temos que apresentar trabalho!*

*Aos amigos de Catanduva que mesmo não sendo da área da pesquisa sempre me apoiaram, ajudaram, agüentaram e se interessavam pelo o que faço. E também por entenderem os finais de semana ou demais vezes que não pude estar presente lá e mesmo assim nunca me esqueceram: Jaqueline, Gabriela, Rafaella.*

*E a Deus, o meu guia em todos os momentos. Que naqueles momentos difíceis, que chega a dar vontade de desistir e questionar o porquê de estar fazendo tudo isso, faz renascer uma força interior e mostra de diversas maneiras que vale a pena todo o esforço.*

## ***Agradecimentos***

---

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dra. Camila Renata Corrêa e ao Prof. Dr. André Ferreira do Nascimento pelos ensinamentos e dedicação.

À coordenadora do Programa de Pós- graduação em Patologia: Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Guimarães da Silva (triênio 2010-12) pela colaboração para execução desse projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Fecchio, atual coordenadora do programa de Pós- graduação em Patologia por estar sempre solícita aos pós- graduandos.

À Vânia do Amaral Soler, secretária do Programa de Pós- graduação em Patologia, por não medir esforços em ajudar os alunos sempre que preciso.

À Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), por viabilizar a execução desse projeto.

Aos funcionários da UNIPEX: Mário Batista Bruno, José Carlos Georgete, Renata Campos Capela, Sueli Clara, pelo auxílio no biotério, dosagens laboratoriais, auxílio com questões relacionadas à FAPESP.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsa para execução desse projeto

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Ao Dr. Marcos Dias, pela orientação na parte histológica.

Às alunas de pós- graduação do Programa em Fisiopatologia em Clínica Médica: Aline Lima, Andréa de Freitas Gonçalves e Priscila Portugal pela ajuda na técnica de Western Blot.

À Dra. Renata de Azevedo Mello Luvizoto pela ajuda com a biologia molecular.

À Prof. Dra. Luciane Alarcão Dias- Melício, docente do depto. de Patologia- FMB e à Prof. Dra. Débora Cristina Damasceno, pesquisadora do depto. de Ginecologia e Obstetrícia- FMB, pelas preciosas sugestões durante o exame de qualificação.

Às alunas de graduação: Aline Martins, Maria Eugênia Lopes Navarro, Tamiris Oliveira, Cíntia Miyake, por toda ajuda durante o biotério.

Ao Dijon Campos e à Maria Teresa Sívio pela ajuda nos sacrifícios dos animais.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Lúcia A. Ferreira- prof<sup>a</sup>. Adjunta do depto. de Clínica Médica- FMB, pelas sugestões feitas ao trabalho.

Aos funcionários da seção de Pós- graduação da FMB: Regina, Lilian, Janete por toda dedicação e gentileza no atendimento.

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”.*

Roberto Shinyashiki

## Resumo

A prevalência da obesidade tem aumentado durante as duas últimas décadas; esse aumento tem sido atribuído a mudanças no hábito dietético onde prevalece o aumento de gorduras e açúcares. É fator de risco para doenças cardiovasculares e o processo inflamatório favorece esse contexto. Porém ainda não está bem esclarecido o efeito do tempo de consumo de dieta desequilibrada sobre o processo inflamatório via receptor Toll-like 4 (TLR-4) e sua associação com alterações metabólicas. Sendo assim o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese que um aumento da exposição a uma sobrecarga nutricional acarreta em aumento da expressão de TLR-4 e esse inicia a resposta inflamatória com conseqüentes alterações metabólicas. Para isso foram utilizados ratos *Wistar* machos (n=32 animais), com 30 dias de idade, que foram casualmente divididos para receberem dieta controle (C) ou hiperlipídica + água com açúcar (HFD), durante 6 ou 24 semanas, perfazendo 4 grupos experimentais independentes (C6, C24, HFD6, HFD24; n=8 animais/grupo). Os ratos C receberam ração padrão para roedores e o grupo HFD uma ração hiperlipídica. Foi avaliado peso corporal, índice de adiposidade (IA), hipertensão arterial, perfil glicêmico e lipídico, avaliação hormonal, inflamatória no plasma. No tecido adiposo foram avaliados os indicadores de inflamação: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina -6 (IL-6), fator transcrricional NFkB e receptor Toll like 4. Ao final de 6 semanas, os animais apresentaram maior IA, triglicérides, glicemia, insulina, leptina e menor adiponectina em comparação a C6, caracterizando um quadro de síndrome metabólica. Ao final de 24 semanas, além das alterações metabólicas, os animais apresentaram aumento da expressão de TLR-4, NFkB e das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 no tecido adiposo. Assim, concluímos que um tempo prolongado de consumo de dieta rica em açúcar e gordura agrava o quadro de síndrome metabólica, além de desencadear um quadro inflamatório via TLR-4.

**Palavras chave:** Obesidade, inflamação, receptor TLR-4, síndrome metabólica

## Abstract

The prevalence of obesity has increased over the past two decades , and this increase has been attributed to changes in dietary habit where the increase of fats and sugars prevails . It is a risk factor for cardiovascular disease and inflammatory process favors this context. But is not yet well understood the effect of time - consuming unbalanced diet on inflammation via Toll-like receptor 4 ( TLR - 4 ) and its association with metabolic abnormalities . Therefore the aim of this study was to test the hypothesis that increased exposure to a nutritional overload leads to increased expression of TLR-4 and this initiates the inflammatory response with consequent metabolic changes. Male Wistar rats ( n = 32 animals ) were used , with 30 days of age, who were randomly divided to receive control diet ( C ) or high fat + sugar water ( HFD ) for 6 to 24 weeks , totaling 4 groups independent experimental ( C6 , C24 , HFD6 , HFD24 n = 8 animals / group ) . The C mice fed standard rodent chow diet and HFD group a high-fat diet . Body weight , adiposity index (AI ) , hypertension , glucose and lipid profile , hormonal evaluation , inflammatory plasma was evaluated . Tumor necrosis factor -alpha ( TNF -  $\alpha$  ) , interleukin 6 ( IL - 6 ) , transcription factor NFkB and Toll like receptor 4 : the adipose tissue indicators of inflammation were evaluated . At the end of 6 weeks, the animals showed higher AI , triglycerides , glucose , insulin, leptin and lower adiponectin compared to C6 , featuring a picture of metabolic syndrome . At the end of 24 weeks , in addition to metabolic changes , the animals showed increased expression of TLR - 4 , NFkB and inflammatory cytokines TNF -  $\alpha$  and IL - 6 in adipose tissue . Thus, we conclude that a prolonged time consumption of a diet rich in sugar and fat aggravates the situation of metabolic syndrome , and trigger an inflammation via TLR - 4 .

**Key- words:** obesity, inflammation, toll-like receptor 4, metabolic syndrome



## Sumário

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 1- Revisão de Literatura .....</b>                                      | <b>8</b>  |
| Obesidade, Inflamação e complicações metabólicas .....                              | 9         |
| Obesidade: problema mundial .....                                                   | 9         |
| O tecido adiposo .....                                                              | 10        |
| Tecido adiposo e Inflamação .....                                                   | 13        |
| Disfunção do tecido adiposo e consequências metabólicas: papel das adipocinas ..... | 15        |
| Comentários .....                                                                   | 21        |
| Referências .....                                                                   | 23        |
| <b>Capítulo 2- Manuscrito .....</b>                                                 | <b>28</b> |
| Introdução .....                                                                    | 31        |
| Materiais e Métodos .....                                                           | 32        |
| Resultados .....                                                                    | 37        |
| Discussão .....                                                                     | 46        |
| Referências .....                                                                   | 50        |

***Capítulo 1***  
***Revisão de Literatura***

---

## **Obesidade, inflamação e complicações metabólicas**

### **Obesidade: problema mundial**

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que pode prejudicar a saúde. Dados da própria OMS apontam que o número de pessoas obesas praticamente dobrou no mundo desde 1980, sendo que 1,4 bilhões de pessoas estavam acima do peso em 2008 (1). No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que a proporção de pessoas com excesso de peso no país avançou de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011; no mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8% (2).

O problema do excesso de peso não atinge somente os adultos. Dados da OMS apontam que em 2011, mais de 40 milhões de crianças menores de cinco anos estavam acima do peso. É importante destacar que 30 milhões dessas crianças vivem em ambientes urbanos de países de baixa e média renda, mostrando que o problema não é restrito a países desenvolvidos. Essa situação também é vista no Brasil, no qual em 2009, uma em cada três crianças estava acima do peso, com destaque para a região Sudeste, com 40,3% dos meninos e 38% das meninas com sobrepeso, mostrando que o problema está começando cada vez mais cedo.

A causa fundamental da obesidade é o desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas. No mundo todo, observa-se uma redução da prática de atividade física e um aumento no consumo de alimentos de alta densidade energética, ricos em açúcar e gordura (3). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que nos últimos 100 anos o consumo de gordura e açúcar

cresceu 67% e 64%, respectivamente; em contraste, o consumo de verduras e legumes diminuiu 26% e o de fibras 18% (4). No Brasil também se observa uma transição nutricional, no qual dados da Pesquisa do Orçamento Familiar (POF) de 2002-03 e 2008-09, comparando os resultados referentes à alimentação da população, mostrou que o grupo de alimentos preparados e misturas industriais tiveram maior aumento domiciliar (37%), passando de 2, 560 kg para 3, 506 kg.

Atualmente, a obesidade adquiriu as características de uma pandemia e é considerada um problema de saúde pública por estar associada a um aumento no risco de doenças cardiovasculares (5), diabetes melito tipo 2 (DM2) (6), hipertensão arterial, dislipidemia, doença hepática e alguns tipos de cânceres (7). Por essa associação, a crescente incidência de obesidade torna-se uma relevante preocupação mundial, uma vez que pode comprometer os setores de serviço e previdência, além de efeitos adversos sobre a qualidade de vida das pessoas.

## **O tecido adiposo**

Durante muito tempo, acreditou-se que o tecido adiposo era apenas o principal local de armazenamento para o excesso calórico consumido. Ao longo das últimas décadas, dados experimentais têm ressaltado sobre a biologia e bioquímica do tecido adiposo. Este tecido não é mais considerado um tecido inerte que apenas armazena gordura (8). O tecido adiposo é um órgão dinâmico metabolicamente, que além de ser o principal local de armazenamento para o excesso de energia, tem função endócrina, sendo capaz de sintetizar uma série de compostos biologicamente ativos que regulam a homeostase metabólica. Este tecido dinâmico é constituído não

apenas por adipócitos, mas também de outros tipos de células chamadas fração de estroma vascular, compreendendo as células sanguíneas, células endoteliais, pericitos e células precursoras adiposas entre outras (9). Vários estudos têm demonstrado que o tecido adiposo produz uma série de substâncias, as quais são denominadas adipocinas, dentre as quais a leptina, adiponectina, resistina, e algumas citocinas como, interleucina- 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a proteína quimioatraente de monócito (MCP-1) dentre outros (10). Por isso tem sido reconhecido como um órgão importante de uma complexa rede que participa na regulação de uma variedade de funções biológicas (11), como por exemplo, regular o apetite, o gasto energético, a sensibilidade periférica à insulina, a capacidade oxidativa, a absorção de lipídeos em tecidos não adiposos, como o coração, o fígado, as células beta pancreáticas e músculo esquelético (12).

Em situações de balanço energético positivo, o excesso de energia é armazenado no tecido adiposo sob a forma de triacilglicerol (TG) (13). Os adipócitos maduros presentes no tecido expandem em resposta ao aumento dos lipídios da circulação. Além disso, com a necessidade de maior armazenamento, pré-adipócitos presentes no tecido podem diferenciar-se em adipócitos maduros, capazes de armazenar gordura (12). Assim, as células adiposas têm, particularmente, uma grande capacidade de sintetizar e armazenar TG durante os períodos de oferta de alimentação, bem como hidrolisar e liberar os TG como ácidos graxos livres e glicerol em situações de jejum (14). Spalding *et al* (15) observaram que o número de adipócitos, tanto para indivíduos magros quanto para obesos é definido durante a infância e adolescência e está sujeito a pequena variação durante a vida adulta, o

que sugere que a hipertrofia dos adipócitos é o principal mecanismo para a expansão do tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade.

No entanto, quando a capacidade de estoque é ultrapassada, ocorre uma alteração na secreção dessas adipocinas (12). Há uma hipersecreção de adipocinas que são potencialmente prejudiciais tais como *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 ou visfatina, que dentre outras funções desencadeiam o processo inflamatório, e uma hiposecreção de adipocinas potencialmente benéficas, tais como a adiponectina. Tais alterações podem estar entre os principais mecanismos envolvidos nas doenças relacionadas com estilo de vida, incluindo a diabetes melito tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão, que são componentes da síndrome metabólica (SM) (16). A redução da gordura visceral, portanto, pode ser uma medida preventiva essencial para a SM e sua consequência, a doença cardiovascular. A regulação de adipocinas-chave, como a adiponectina, pode ser considerada como um procedimento terapêutico eficiente (17).

Diante desses relatos pode-se considerar a obesidade como um estado inflamatório de baixo grau o qual merece especial atenção, pois essa inflamação é considerada um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento das comorbidades (18). Esse relato é confirmado por estudos que apontam que a obesidade (circunferência da cintura) tem um forte impacto na secreção de adipocinas e resistência à insulina (19). Outro trabalho, tem apontado que os macrófagos, tanto os residentes no tecido adiposo como os recrutados da circulação, são uma parte importante da função secretora de tecido adiposo e a fonte principal de citocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1. Portanto,

como um órgão secretório, o tecido adiposo apresenta diversas particularidades e a sua atividade secretória é regulada por mecanismos humorais e hormonais (11).

### **Tecido adiposo e inflamação**

Investigadores têm percebido já há algum tempo, que o estado inflamatório induzido pelo estresse metabólico é diferente do paradigma da inflamação clássica como definida pelos sinais cardinais de vermelhidão, inchaço, calor, e dor (20). Além disso, esta resposta clássica está uniformemente associada à resposta do sistema imunológico a um local de ferimento ou infecção e normalmente, tal insulto é removido ou neutralizado, e a inflamação desaparece. Em caso de obesidade, a resposta inflamatória encontrada é de natureza diferente (20). Nesse caso, o fator desencadeante é o excesso de nutrientes (21) o qual se manifesta com aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e também do seu número (hiperplasia) (22). Essa adipogênese implica na diferenciação de preadipócitos em adipócitos maduros, os quais secretam adipocinas (23), que juntamente podem ter efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (24). Sendo assim, o estado inflamatório que acomete indivíduos obesos é denominado inflamação metabólica ou metainflamação (25). Todo esse processo altera o funcionamento do tecido adiposo e de diversos de seus mecanismos, caracterizando então, um tecido disfuncional. Dentre as características dessa disfunção, a massa adiposa vai apresentar mudanças na sua composição celular, como por exemplo, o tecido adiposo possui macrófagos residentes, porém diante da disfunção ocorre um aumento na quantidade dessas células inflamatórias oriundas da circulação. O recrutamento dessas células ocorre por atividade das

quimiocinas, como a MCP-1 e IL-8, que é liberado pelos adipócitos. Uma vez infiltrados no tecido adiposo, nos estágios avançados da obesidade, os macrófagos recrutados juntamente com os que já residiam no tecido adiposo ampliam o evento inflamatório por produzirem mais citocinas (26).

Diversos fatores podem desencadear a resposta inflamatória no tecido adiposo em condições de sobrecarga nutricional, dentre eles a microhipóxia (27), estresse do retículo endoplasmático (28) e, mais recentemente descrito, ácidos graxos saturados, um mecanismo dependente da ativação de receptor Toll-like 4 (TLR4) (29).

Com a hipertrofia dos adipócitos, o tecido adiposo torna-se hipoperfundido, o que cria áreas de microhipóxia, ativando as vias IKK/NFkB, aumentando a expressão de genes envolvidos na inflamação com maior liberação de citocinas e recrutamento de macrófagos para o tecido (30).

A sobrecarga de carboidratos e lipídios que ocorre na obesidade acarreta um aumento do metabolismo celular. Um aumento de um desses substratos leva a um acréscimo na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, gerando uma hipóxia relativa, devido à maior necessidade de oxidação de nutrientes, gerando uma quantidade acima do normal de espécies reativas de oxigênio, levando a um estado de estresse oxidativo. Essa condição ativa quinases como JNK p38, IKK e NFkB, aumentando a produção de citocinas (28). Essas quinases também podem ser ativadas pelo aumento do estresse do retículo endoplasmático que acontece normalmente pelo aumento de nutrientes, como ácidos graxos livres (31).

O TLR4 é membro de uma família de receptores presentes em diferentes células e tecidos, estando envolvidos na resposta imune inata (32). Esses



receptores, ao reconhecerem uma endotoxina bacteriana composta de oligossacarídeos e ácidos graxos - o lipopolissacarídeo (LPS) - ativam quinases e fatores transcricionais intracelulares responsáveis pela resposta imune inata (33). Evidências demonstram que os ácidos graxos saturados também podem ativar TLR4. Esse mecanismo de ativação tem sido considerado um importante fator de ligação entre inflamação e resistência à insulina em condições de obesidade e sobrecarga nutricional.

Assim, o excesso de nutrientes e a obesidade estão relacionados com o estímulo dessas vias principais, levando à produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (34). Essas citocinas, principalmente as quimiocinas, atraem monócitos da circulação, que ao infiltrarem no tecido adiposo transformam-se em macrófagos, aumentando a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6, um fator importante para o desenvolvimento de resistência tecidual à insulina (35).

### **Disfunção do tecido adiposo e consequências metabólicas: papel das adipocinas**

Em circunstâncias normais, a insulina estimula a absorção da glicose pelo músculo esquelético, inibe a gliconeogênese e a produção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), além de diminuir a lipólise no tecido adiposo.

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina quinase intrínseca, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominada receptor de insulina (IR) (36). A ativação do IR resulta em fosforilação

em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (37, 38). A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação. A PI3q é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulada pela insulina. A ativação da PI3q aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) e isso permite o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo, através da translocação da proteína GLUT-4 para a membrana celular, permitindo a entrada da glicose por difusão facilitada. Os GLUT-4 são os principais responsáveis pela captação da glicose circulante nos humanos (37).

No entanto, resultados demonstram que a ativação crônica na produção de citocinas pró-inflamatórias no interior das células que sofrem a ação da insulina, pode levar à deterioração da resposta do tecido ao hormônio (39). Corroborando essa idéia, trabalhos evidenciam elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, no tecido adiposo e soro de indivíduos e animais obesos com resistência insulínica. Em contraste, a neutralização dessas citocinas melhora esse quadro metabólico. Investigadores verificaram que esse fato ocorre porque essas citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF- $\alpha$ , age na fosforilação de alguns resíduos de serina no substrato do receptor de insulina IRS-1 impedindo assim a continuidade da cascata que tem por último estágio expressar o GLUT 4 (30). Assim, a ativação de TLR4 por uma sobrecarga nutricional por ser um mecanismo que acarreta inflamação pode torna-se também um fator promotor para o desenvolvimento da resistência à insulina e, conseqüentemente, disfunção do tecido adiposo. (40)

Outras adipocinas como a leptina, adiponectina e resistina também participam do processo inflamatório e da resistência à insulina em condições de obesidade (41). A leptina foi o primeiro hormônio a ser caracterizado uma adipocina pelo fato de ser produzido principalmente pelo tecido adiposo (42). Tem como função regular o nível de energia, consumo de alimento e mediadores inflamatórios. Ela proporciona a ligação funcional entre o sistema imunitário e homeostase energética (43). Estudos mostram que ratos que possuem deficiência nos receptores de leptina sofrem atrofia do timo, e são imunodeficientes (44). Isto pode explicar porque o sistema imunitário dos murinos é pressionado por redução da ingestão de alimentos e da fome aguda, ambos os quais resultam em baixos níveis de leptina, e porque esta depressão é revertida pela administração exógena de leptina (45). Esse hormônio age centralmente no hipotálamo para reduzir a ingestão de alimentos e aumentar a utilização de energia e os seus níveis diretamente correlacionam-se com a massa adiposa (46). Os indivíduos obesos apresentam altas concentrações de leptina e isso está ligado ao aumento de tecido adiposo. Quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maiores os níveis circulantes desse hormônio, um paradoxo visto que elevados níveis de leptina deveriam diminuir o apetite e aumentar o gasto energético.

No entanto, de forma similar ao que ocorre com indivíduos com diabetes melito, nos quais os níveis de insulina estão aumentados, é provável que ocorra um aumento da resistência periférica à leptina em indivíduos obesos. Este paradoxo pode ser explicado por diversos mecanismos celulares. Um deles envolve um possível defeito no transporte da leptina através da barreira hematoencefálica. Uma

menor expressão dos receptores da leptina nos obesos, associada à ingestão de dietas ricas em gorduras também pode ser uma explicação (25, 47).

Leptina regula vários mediadores da inflamação vascular como o TNF- $\alpha$ , IL6, IL-2, a MCP-1, ROS, citocinas de tipo Th1 a partir de células endoteliais e as células mononucleares de sangue periférico (48). Estudos clínicos têm demonstrado uma correlação positiva entre leptina e PAI-1, fator de von Willebrand, ativador do plasminogênio tecidual (tPA), os níveis de fibrinogênio no plasma e uma relação inversa com a proteína C e inibidor da via do fator tecidual. Estes resultados demonstram claramente uma forte ligação da atividade das plaquetas circulantes com o aumento dos níveis circulantes de leptina observado na síndrome metabólica. Com relação a doenças cardiovasculares, a leptina também parece ter uma variedade de funções pró-aterogênicas. Estimula a produção de citocinas pró-proliferativas e aumenta a agregação das plaquetas (46), causando disfunção endotelial, induzindo o estresse oxidativo (49). Outra ação pró-aterogênica da leptina é sua capacidade de induzir a expressão da proteína C reativa (PCR) em artéria coronária (50). Portanto, a leptina fornece uma ligação funcional entre a obesidade e doenças cardiovasculares e seus níveis aumentam exponencialmente com a gordura corporal.

A resistina é outra adipocina que foi identificada em 2001 como uma proteína especificamente secretada pelo adipócito (28). Resistina induz a expressão de moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1); adiponectina inibe as ações de resistina (52). Existe uma relação funcional entre a leptina e resistina: a administração de leptina suprime a

expressão de mRNA de resistina e os níveis de proteína em ratos ob / ob, juntamente com a redução nos níveis de glicose e de insulina (53).

A adiponectina é uma outra adipocina que é sintetizada não só pelos adipócitos, mas também pelo músculo esquelético, células endoteliais e cardiomiócitos. É abundante no plasma representando 0,01% das proteínas do plasma (3-30 ug / ml) (54). É uma proteína de 244 aminoácidos e peso molecular de 30 kDa (55) . Os níveis séricos aumentam com a perda de peso e com drogas de sensibilização à insulina, parecendo assim, ser inversamente proporcional à resistência à insulina e obesidade (56).

Esse adipocina exerce suas funções através de três receptores: AdipoR1 e AdipoR2 (56) e T-caderina (57). Por meio da fosforilação da AMPK, aumenta a sensibilidade à insulina, a oxidação de ácidos graxos e reduz a síntese de glicose no fígado e outros tecidos (58). A estimulação dos receptores modula AMPK, mas também de PI3K, p44/42 MAP quinase p38 MAP quinase e da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (59). Adiponectina pode ser intrinsicamente anti-aterogênico, regulando as principais vias de sinalização envolvidos na gênese da aterosclerose: PI3K-Akt, NO sintase endotelial (eNOS) e AMPK (60). A adiponectina parece suprimir a adesão de monócitos ao endotélio vascular e promove a angiogênese, estimulando a diafonia entre Akt e AMPK no ECs (61). Akt é uma serina / treonina proteína quinase que desempenha um papel importante como um segundo mensageiro em muitas funções celulares tais como a proliferação celular, apoptose e metabolismo da glicose (41).

A adiponectina também tem propriedades anti-inflamatórias, que podem regular os passos no processo aterogênico combinados com a prevenção da

apoptose em células endoteliais, bem como as ações de promoção angiogênicas (62). As propriedades anti-inflamatórias ocorre através da supressão do fator nuclear kappa (NF- $\kappa$ B) em macrófagos e monócitos. Do mesmo modo, a supressão do NF- $\kappa$ B em células endoteliais retarda o desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, a adiponectina inibe a conversão dos macrófagos para as células de espumosas e reduz a oxidação da LDL. Em ambos os casos, a supressão do NF- $\kappa$ B suspende processos induzidos pelo TNF- $\alpha$  (inflamação / adesão de monócitos) (56).

Ao contrário de todas as outras adipocinas citadas, a adiponectina possui atividade antiinflamatória e antiaterogênica, age como protetor cardiovascular e melhora a sensibilidade à insulina. No entanto, níveis reduzidos são encontrados na maioria dos estados de obesidade e resistência à insulina (63). Estudos apontam que TNF- $\alpha$  e IL-6 são potentes inibidores da expressão e secreção de adiponectina em tecido adiposo humano e cultura de células (25).

A visfatina é uma outra adipocina com peso molecular de 52 kDa e é encontrada predominantemente no tecido adiposo visceral. É também conhecido como pré-células B de colônias factor de reforço (PBEF), é produzida principalmente pelos adipócitos, embora também pelos macrófagos do tecido adiposo visceral, e em pequenas quantidades, por tecido adiposo subcutâneo. Expressão de mRNA visfatina aumenta significativamente durante a diferenciação dos pré-adipócitos para adipócitos (64). Foi demonstrado que sua função principal está relacionada com o metabolismo energético e imunidade inata e é agora considerada como um adipocina pró-inflamatória. É capaz de induzir a ativação de leucócitos e de estimular a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 (65). Estudos recentes demonstraram que visfatina exerceu efeitos miméticos da insulina em adipócitos em cultura, miócitos e

hepatócitos e diminuiu os níveis de glicose no plasma em ratos por ligação e activação do receptor da insulina (43).

Diante desses relatos podemos observar que a metainflamação está diretamente envolvida no desenvolvimento da resistência à insulina, enfermidade que acomete a maioria dos obesos. Embora muitos progressos tenham sido feitos nessa área, futuros estudos são necessários para amenizar essa inflamação de uma maneira precoce para que possa retardar ou impedir o surgimento de comorbidades que conseqüentemente possam desencadear doenças cardiovasculares e outras complicações metabólicas.

## **Comentários**

A obesidade é atualmente um problema mundial e que pode acarretar diversas complicações. O tecido adiposo é o local principal para o armazenamento da energia em excesso o qual leva a obesidade, mas é também reconhecido como um órgão endócrino que pode influenciar e comunicar-se com muitos outros órgãos, incluindo o cérebro, coração, sistema vascular, o fígado e músculo, através da produção de vários fatores que são secretados ou adipocinas. Adipocinas têm ambas as atividades pró-inflamatórias e anti-inflamatória, e o equilíbrio entre os diferentes fatores é crucial para a determinação da homeostase em todo o corpo com base no estado nutricional. Quando a disfunção do adipócito ocorre como um resultado da expansão do tecido adiposo devido a sobrecarga nutricional, a desregulação da produção adipocinas acontece e pode ter efeitos locais ou sistêmicos principalmente nas respostas inflamatórias, contribuindo assim para a iniciação e progressão de

distúrbios metabólicos com a resistência à insulina. Assim, a elucidação das funções e mecanismos das principais adipocinas levará a uma melhor compreensão da patogênese de distúrbios ligados à obesidade. Além disso, as estratégias terapêuticas que neutralizem o desequilíbrio de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem ser um meio atraente e útil para a prevenção e / ou tratamento de obesidade metabólica relacionada.



## Referências

1. World Health Organization. Obesity and overweight [internet]. Geneva: WHO; 2011 [acesso 9 abr 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009 [internet]. Brasília: IBGE; 2009 [acesso 9 jul 2013]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/)
3. Coutinho W. Etiologia da obesidade [revisão]. In: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. São Paulo: ABESO; 2011 [acesso em 2 abr 2013]. Disponível em <http://www.abeso.org.br/pdf/Etiologia%20e%20Fisiopatologia%20-%20Walmir%20Coutinho.pdf>
4. Young LR, Nestle M. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. *American journal of public health*. 2002;92(2):246-9. Epub 2002/01/31.
5. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk--a review of the literature. *European journal of clinical nutrition*. 2010;64(1):16-22. Epub 2009/08/06.
6. Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, Marrero D, Florez JC, Bray GA, et al. The prevention of type 2 diabetes. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2008;4(7):382-93. Epub 2008/05/22.
7. Farhat T, Iannotti RJ, Simons-Morton BG. Overweight, obesity, youth, and health-risk behaviors. *American journal of preventive medicine*. 2010;38(3):258-67. Epub 2010/02/23.
8. Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *General and comparative endocrinology*. 2011;174(1):1-4. Epub 2011/07/26.
9. Saely C, Geiger K, Drexel H. Browns versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontol*. 2012;58:120–2.
10. Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Niedźwiedzka-Rystwej P, Deptuła W. Adipose tissue – component of the immune system. *Centr Eur J Immunol*. 2011;36:95–9.
11. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of medical science : AMS*. 2013;9(2):191-200. Epub 2013/05/15.
12. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutrition reviews*. 2007;65(6 Pt 2):S7-12. Epub 2007/07/04.
13. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;316(2):129-39. Epub 2009/09/03.
14. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847-53. Epub 2006/12/15.
15. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7. Epub 2008/05/06.

16. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2006;15(2):173-8. Epub 2006/02/17.
17. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS letters*. 2006;580(12):2917-21. Epub 2006/05/06.
18. Itoh M, Suganami T, Hachiya R, Ogawa Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *International journal of inflammation*. 2011;2011:720926. Epub 2011/07/15.
19. Stepien M, Rosniak-Bak K, Paradowski M, Misztal M, Kujawski K, Banach M, et al. Waist circumference, ghrelin and selected adipose tissue-derived adipokines as predictors of insulin resistance in obese patients: preliminary results. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(11):PR13-8. Epub 2011/11/01.
20. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7. Epub 2006/12/15.
21. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*. 2011;29:415-45. Epub 2011/01/12.
22. Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2011;158(6):369-84. Epub 2011/11/09.
23. Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in immunology*. 2007;28(9):393-9. Epub 2007/08/08.
24. Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2007;56(3):472-92. Epub 2007/02/24.
25. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(2):85-97. Epub 2011/01/22.
26. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(1):33-9. Epub 2010/04/03.
27. Schuster DP. Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2010;3:253-62. Epub 2010/01/01.
28. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007;21(12):1443-55. Epub 2007/06/19.
29. Poulain-Godefroy O, Le Bacquer O, Plancq P, Lecoœur C, Pattou F, Fruhbeck G, et al. Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:823486. Epub 2010/03/27.
30. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):2992-3002. Epub 2008/09/05.
31. da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA, et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *European journal of applied physiology*. 2011;111(9):2015-23. Epub 2011/01/21.

32. Erridge C, Samani NJ. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(11):1944-9. Epub 2009/08/08.
33. Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(14):2556-64. Epub 2001/12/01.
34. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine*. 2005;11(2):183-90. Epub 2005/02/03.
35. Kim JJ, Sears DD. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterology research and practice*. 2010;2010. Epub 2010/09/04.
36. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 1998;9(2-4):89-109. Epub 1999/04/23.
37. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(2):165-9. Epub 2000/07/21.
38. White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;182(1-2):3-11. Epub 1998/06/03.
39. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(11):3015-25. Epub 2006/10/21.
40. <http://www.ans.kobe-u.ac.jp/english/gakka/seibutsu/seibutu1.html>
41. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Seminars in nephrology*. 2013;33(1):2-13. Epub 2013/02/05.
42. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32. Epub 1994/12/01.
43. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*. 2007;18(3-4):313-25. Epub 2007/05/18.
44. Kimura M, Tanaka S, Isoda F, Sekigawa K, Yamakawa T, Sekihara H. T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent. *Life sciences*. 1998;62(14):1243-50. Epub 1998/05/07.
45. Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(8):1051-9. Epub 1999/10/19.
46. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):47-60. Epub 2006/04/04.
47. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual review of physiology*. 2008;70:537-56. Epub 2007/10/17.
48. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(10):1231-8. Epub 1999/07/01.

49. Beltowski J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *Journal of hypertension*. 2006;24(5):789-801. Epub 2006/04/14.
50. Singh P, Hoffmann M, Wolk R, Shamsuzzaman AS, Somers VK. Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(9):e302-7. Epub 2007/07/07.
51. Qi Q, Wang J, Li H, Yu Z, Ye X, Hu FB, et al. Associations of resistin with inflammatory and fibrinolytic markers, insulin resistance, and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2008;159(5):585-93. Epub 2008/08/30.
52. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;314(2):415-9. Epub 2004/01/22.
53. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*. 2004;53(7):1671-9. Epub 2004/06/29.
54. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension*. 2003;42(3):231-4. Epub 2003/07/16.
55. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry*. 1996;120(4):803-12. Epub 1996/10/01.
56. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 2005;26(3):439-51. Epub 2005/05/18.
57. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(28):10308-13. Epub 2004/06/24.
58. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(25):16309-13. Epub 2002/11/29.
59. Karmazyn M, Purdham DM, Rajapurohitam V, Zeidan A. Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart. *Cardiovascular research*. 2008;79(2):279-86. Epub 2008/05/14.
60. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2004;344(1-2):1-12. Epub 2004/05/20.
61. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999;100(25):2473-6. Epub 1999/12/22.
62. Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*. 2007;74(1):11-8. Epub 2006/12/05.
63. Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *Journal of animal science*. 2008;86(14 Suppl):E94-104. Epub 2007/10/18.

64. Olszanecka-Glinianowicz M, Kocelak P, Nylec M, Chudek J, Zahorska-Markiewicz B. Circulating visfatin level and visfatin/insulin ratio in obese women with metabolic syndrome. *Arch Med Sci.* 2012;8:214–21
65. Moschen A, Kaser A, Enrich B, Al E. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol.* 2007;178:1748–58.

***Capítulo 2***  
***Manuscrito***

---

**Exposição à dieta hiperlipídica altera parâmetros inflamatórios e metabólicos de uma forma tempo- dependente**

**Running title: Obesidade e inflamação**

**Autores:**

Fabiane Valentini Francisqueti<sup>1</sup>, André Ferreira do Nascimento<sup>2</sup>, Renata de Azevedo Melo Luvizotto<sup>2</sup>, Damiana Tortolero Pierine<sup>1</sup>, Maria Eugênia Lopes Navarro<sup>1</sup>, Ana Lucia A. Ferreira<sup>2</sup>, Camila Renata Correa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> **Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP- Univ Estadual Paulista, Departamento de Patologia**

<sup>2</sup> **Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP- Univ Estadual Paulista, Departamento de Clínica Médica**

**Autor correspondente:**

Camila Renata Correa

Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP

Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP, Brasil. CEP: 18618-000

Telefone: (55) 14 3880 1619

Fax: (55) 14 3881 6424

E-mail: ccorrea@fmb.unesp.br

## Resumo

É bem estabelecido que dietas hipercalóricas levam a condições de sobrepeso e obesidade, o que pode desencadear um estado de inflamação de baixo grau e como consequência, alterações metabólicas. No entanto, o tempo necessário para que essas mudanças ocorram ainda é desconhecido. Nesse estudo, investigamos a influência de um curto e longo períodos de dieta ocidental sobre os marcadores inflamatórios, bioquímicos e composição corporal. Ratos Wistar machos receberam dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica (HFD) mais açúcar na água de beber (300g/L) por 6 ou 24 semanas. HFD aumentou significativamente o índice de adiposidade para os grupos HFD de ambos os períodos experimentais quando comparados aos animais C. Exposição à HFD foi associada a maiores níveis plasmáticos de triglicerídeos, glicose, insulina, leptina e médias glicêmicas no teste oral de tolerância à glicose. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e de interleucina-6 (IL-6) entre os grupos. No entanto, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 estavam elevados no tecido adiposo epididimal dos animais HFD24 comparados a HFD6 e a C24. Somente ao final de 24 semanas foi observado aumento da expressão gênica do receptor toll-like 4 (TLR-4) nos animais HFD24 em comparação aos animais C24. Um curto período de tempo foi suficiente para induzir alterações metabólicas nos ratos. No entanto, uma resposta inflamatória no tecido adiposo é dependente de um maior tempo de exposição à dieta hiperlipídica.



## **Introdução**

O estado inflamatório induzido por fatores metabólicos, especificamente pelo excesso no consumo de nutrientes, é chamado de metainflamação, uma condição distinta da inflamação clássica (1). A prevalência da obesidade tem aumentado drasticamente nas últimas 3 décadas, especialmente entre as populações mais economicamente desfavorecidas em todo o mundo (2-4). Um excesso calórico, especialmente quando caracterizado pelo consumo aumentado de carboidratos e lipídios, aumenta a inflamação e pode levar à hipertensão, diabetes, além de doenças cardiovasculares e renais (5-7). O excesso de energia consumido é estocado no tecido adiposo, levando à hipertrofia celular e consequente produção de fatores inflamatórios e quimiotáticos, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina- 6 (IL-6) (8). Esses fatores interagem com a insulina, que aumenta a atividade da enzima lipogênica nos adipócitos. Dependendo da intensidade e duração desse processo, pode resultar em inflamação no tecido adiposo (9-11).

Evidências mostram que um dos gatilhos da inflamação na obesidade são os ácidos graxos saturados, especificamente pela sua afinidade em ligar-se ao receptor Toll-like 4 TLR-4 (12). O excesso de nutrientes e a obesidade estão associados com altos níveis circulantes de ácidos graxos, que podem vir a serem reconhecidos pelo TLR-4 e levar à ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (13-16), estimulando a produção de citocinas e quimiocinas pró- inflamatórias (17). Essas citocinas, especialmente as quimiocinas, atraem monócitos da circulação para o tecido adiposo, que se tornam macrófagos, aumentando a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6, um fator importante para o desenvolvimento de resistência tecidual à insulina (14).

Esse estado inflamatório juntamente com o desbalanço metabólico podem manifestar-se local ou sistemicamente, prejudicando a função de vários órgãos, incluindo rins, fígado e coração (4). No entanto, o limiar entre a ingestão de açúcar e gordura e as manifestações metabólicas e inflamatórias ainda não está estabelecido (1). Os estudos experimentais que enfatizam dieta, obesidade e inflamação avaliam as alterações ao final de um período estabelecido e não acompanham as mudanças progressivas em função do tempo (18-23)(24). Assim, mais estudos são necessários para caracterizar a resposta inflamatória no tecido adiposo em função do tempo. Nós hipotetizamos que uma sobrecarga energética leva a um acúmulo de gordura no tecido adiposo, o que pode desencadear a liberação de citocinas inflamatórias no tecido adiposo e também no plasma, juntamente com alterações metabólicas. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência tempo- dependente de uma rica em açúcar e gordura sobre os parâmetros metabólicos, marcadores inflamatórios séricos e no tecido adiposo de ratos machos.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e protocolo experimental**

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista (PE- 47/2011). Ratos Wistar Machos (10 semanas de idade,  $\pm$  350 g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP foram divididos para receber dieta controle (C, n= 8 animais/ grupo; 5% de energia de gordura) ou dieta hiperlipídica (HFD, n= 8 animais/grupo; 29% de energia de gordura) mais água com açúcar (300g/L) por um período de 6 ou 24 semanas (C6, HFD6, C24, HFD24).

A dieta hiperlipídica foi preparada no nosso laboratório e continha dieta controle (Nuvilab CR-1 Nuvital Q5), biscoito wafer, leite condensado, óleo de palma, vitaminas e minerais. A composição nutricional das dietas está apresentada na tabela 1.

Ratos foram alocados em gaiolas individuais no Laboratório Experimental da Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob temperatura (22–26°C) e luz controladas (12h claro-12h escuro). O consumo de ração foi medido diariamente e o peso corporal, semanalmente. Os animais foram sacrificados por decapitação após anestesia com pentobarbital sódico Q4 (50 mg/kg, injeção intraperitoneal), para evitar sofrimento do animal. O tecido adiposo epididimal foi escolhido para as análises devido ao seu padrão inflamatório semelhante à gordura visceral (25).

**Table 1.** Composição Nutricional das dietas controle e hiperlipídica

| Componentes                     | Dieta<br>Controle | Dieta<br>Hiperlipídica |
|---------------------------------|-------------------|------------------------|
| Proteína (%)                    | 25,0              | 21,0                   |
| Carboidrato (%)                 | 58,0              | 45,0                   |
| Gordura (%)                     | 5,0               | 29,0                   |
| % Energia da proteína           | 26,5              | 16,0                   |
| % Energia do carboidrato        | 61,5              | 34,3*                  |
| % Energia da gordura            | 12,0              | 49,7                   |
| % Energia de gordura saturada   | 2,1               | 24,7                   |
| % Energia de gordura insaturada | 9,9               | 25,0                   |
| Energia (kcal/g)                | 3,8               | 5,3                    |
| Energia (KJ/g)                  | 15,8              | 22,0                   |
| Composição de ácidos graxos (%) |                   |                        |
| Palmítico (16:0)                | 14,0              | 40,6                   |
| Esteárico (18:0)                | 2,7               | 6,2                    |
| Oléico (18: 1 <i>n</i> -9c)     | 23,4              | 36,5                   |
| Linoléico (18: 2 <i>n</i> -6)   | 53,1              | 11,3                   |
| Outros                          | 6,8               | 5,4                    |
| Mistura de vitaminas/ Minerais† | -                 | +                      |

\* Energia da água com açúcar (300 g/l) não foi incluída.

†Baseado nas quantidades de vitaminas/ minerais da dieta controle, para cada kg da HFD foram adicionados: Fe, 25,2 mg; K, 104,8 mg; Se, 73,1 µg; sulfato de molibdênio, 150,0 µg; vitamina B12, 34,5 µg; vitamina B6, 6 mg; biotina, 0,12 mg; vitamina E, 48,9 UI; vitamina D, 2447,0 UI; vitamina A, 15921,2 UI.

### **Índice de adiposidade**

O índice de adiposidade (IA) foi usado como indicador da obesidade, visto sua precisão em avaliar a porcentagem de gordura corporal. Depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral foram dissecados dos animais. A soma dos depósitos, normalizada pelo peso corporal [(epididimal + retroperitoneal + visceral)/peso corporal] x 100, foi calculado para obtenção do IA (8).

### **Medidas bioquímicas plasmáticas**

Kits enzimáticos colorimétricos foram usados para medir a glicemia (Bioclin<sup>®</sup>, Cat. #K082-3, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), triacilglicerol (Bioclin<sup>®</sup>, Cat. #K117-3, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e ácidos graxos livres (WAKO<sup>®</sup>, [HR Series NEFA-HR\(2\)](#), Osaka, Japan). A leitura foi realizada com o espectrofotômetro automático Chemistry Analyser BS 200 (Mindray Medical International Limited, China).

### **Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)**

Ao final de cada período de estudo, 6 e 24 semanas, os animais foram submetidos ao OGTT. Após 8h de jejum, cada animal recebeu, via gavagem, uma solução de glicose 30% (3g/glicose/kg) e posteriormente foi medida a taxa de glicose sanguínea por meio de um glicosímetro. Os valores de glicose foram medidos no momento zero e 30, 60, 90 e 150 minutos após administração da solução. Foram utilizados para classificar resistência à insulina quando dois pontos do OGTT atingiram acima de 140mg/dL e diabetes tipo 2 quando dois pontos atingiram valores acima de 200mg/dL (26).

### **Medidas hormonais e inflamatórias plasmáticas**

Concentrações plasmáticas de insulina (Millipore Corporation, Cat. #EZRL-13K, Billerica, MA, USA), leptina (Millipore Corporation, Cat. #EZRL-83K, Billerica, MA, USA), adiponectina (Millipore Corporation, Cat. #EZRADP-62K, Billerica, MA, USA), TNF- $\alpha$  (R&D System, Cat. # [RTA00](#), Minneapolis, MN, USA) e IL-6 (R&D System, Cat. # [R6000B](#), Minneapolis, MN, USA) foram feitas pelo método de ELISA. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro leitor de microplaca (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **Nível de adipocinas**

Tecido adiposo epididimal ( $\pm$  400 mg) foi triturado com 2 ml de tampão salina-fosfato (PBS; pH 7.4) e depois centrifugado a 3000 rpm e 4°C por 10 min. Sobrenadante foi coletado e as citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  (R&D System, Cat. # [RTA00](#), Minneapolis, MN, USA) e IL-6 (R&D System, Cat. # [R6000B](#), Minneapolis, MN, USA) foram medidas usando kits comerciais de ELISA, como descrito acima. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína total, medida por kit colorimétrico (Quimica Basica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brazil), usando um espectrofotômetro automático Chemistry Analyser BS 200 (Mindray Medical International Limited, China).

### **Expressão gênica**

RNA total foi extraído do tecido adiposo epididimal usando o reagent Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, São Paulo,

Brasil) foi utilizado para a síntese de 20  $\mu$ L de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000ng de RNA total. Os níveis de mRNA de TLR-4 (assay Rn 00569848\_m1 - Applied Biosystems) foram determinados por PCR em tempo real. A medida quantitativa foi feita com kit comercial TaqMan qPCR (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, para detecção no sistema Applied Biosystems StepOne Plus. As condições de amplificação foram: ativação da enzima a 50 ° C durante 2 min, desnaturação a 95 ° C durante 10 minutos, os produtos do DNA complementar foram amplificados por 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 15 s, e hibridação/ extensão a 60 ° C por 1min. A expressão de genes foi quantificada em relação aos valores do grupo C após a normalização de um controle interno (ciclofilina-ensaio Rn Biosystems 00690933\_m1-Aplicadas) pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , como descrito (27).

### **Western Blot**

A concentração protéica foi feita pelo método de Bradford. Amostras (25 $\mu$ g de proteína) foram aquecidas com Laemmli buffer a 100° por 5 minutos e pipetadas em gel de poliacrilamida 10%. A transferência para membrana de nitrocelulose foi feita a 4°C na presença de metanol. Posteriormente foram bloqueadas com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T pH 7,4. A incubação com os anticorpos primários Santa Cruz Biotechnology (Dallas,Texas, EUA) foi overnight a 4°C em TBS (0,14M de cloreto de sódio, 0,003M de cloreto de potássio, e 0,025M de Tris base) contendo 3% de leite desnatado (anti-TLR-4 1:200, anti- beta actina 1:200, anti NFkB fosforilado 1:100, anti NFkB total 1:200). Após incubação com anticorpos secundários em solução a 0,1% de leite desnatado, a imuno-detecção foi

realizada por meio do método de quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante (ECL SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate - Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, 34080). A intensidade das bandas foi avaliada usando Scion Image Software ( Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

### **Análise histológica**

Tecido adiposo epididimal embebido em parafina e fixado em formalina foi processado para hematoxilina- eosina. Análise morfométrica foi realizada na aumentativa de 40 vezes usando o programa Ipwin 32. As medidas foram feitas considerando a área de 100 adipócitos/ lâmina, excluindo as células parcialmente seccionadas. Área média dos adipócitos foi calculada.

### **Análise Estatística**

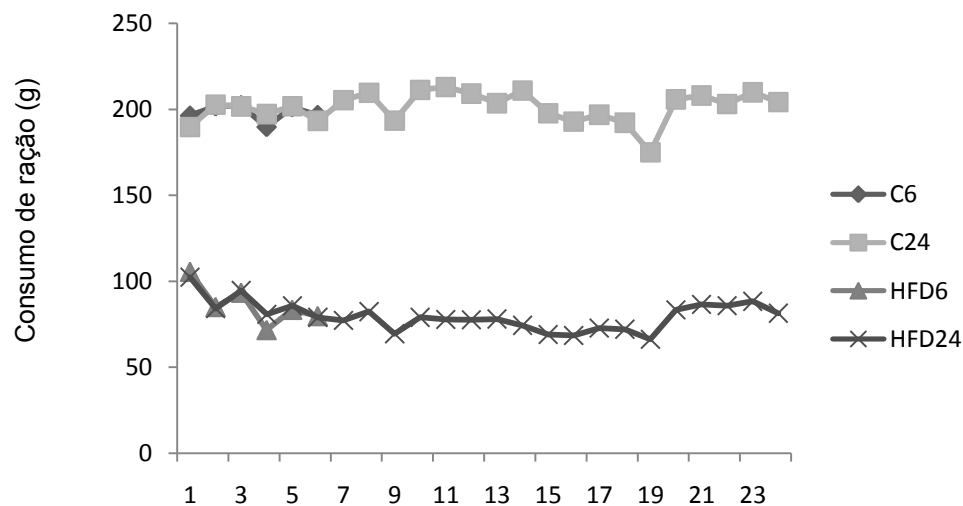
Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão (EP). As comparações entre os grupos foi feita por ANOVA de duas variáveis para grupos independentes e complementadas com teste Tukey's post hoc. O software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) foi usado para as análises estatísticas. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Peso e gordura corporais**

A figura 1 apresenta o consumo de ração (g) dos animais, a figura 2 demonstra a evolução do peso desses animais (g) e na figura 3 estão os valores de índice de adiposidade (%) dos grupos C e HFD ao final de cada período. Os animais

HFD6 e HFD24 consumiram maior quantidade de ração comparados a C6 e C24, respectivamente. A dieta hiperlipídica foi responsável por causar um maior peso final somente no grupo HFD24 em comparação a HFD6 e a C24. No entanto, o IA já se apresentou maior ao final de 6 semanas, com diferença entre os grupos HFD6 em relação a C6. Também foi maior nos animais HFD24 em comparação a HFD6 e também a C24.



**Figura 1.** Média do consumo semanal de ração (g) dos animais C e HFD ao longo de 6 e 24 semanas.

Comparação entre os grupos:

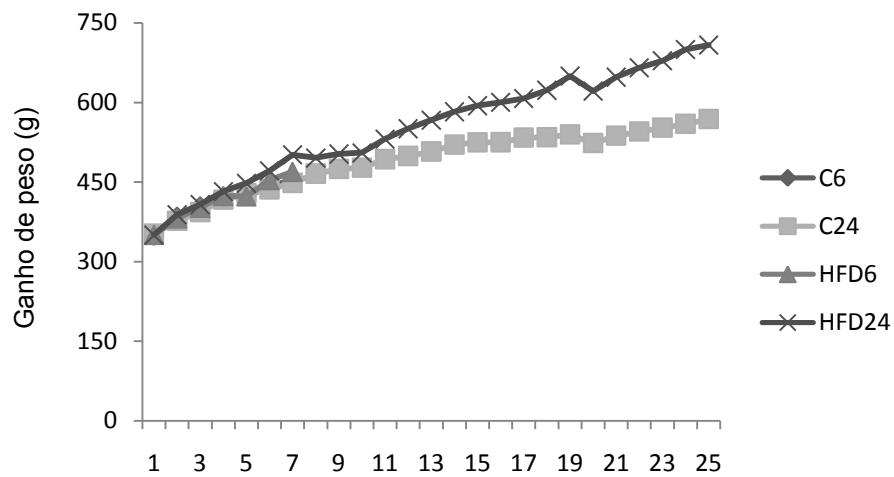
C6 x HFD6:  $p < 0,001$

C24 x HFD24:  $p < 0,001$

C6 x C24:  $p = 0,732$

HFD6 x HFD24:  $p = 0,100$





**Figura 2.** Evolução de peso semanal dos animais C e HFD ao longo de 6 e 24 semanas.

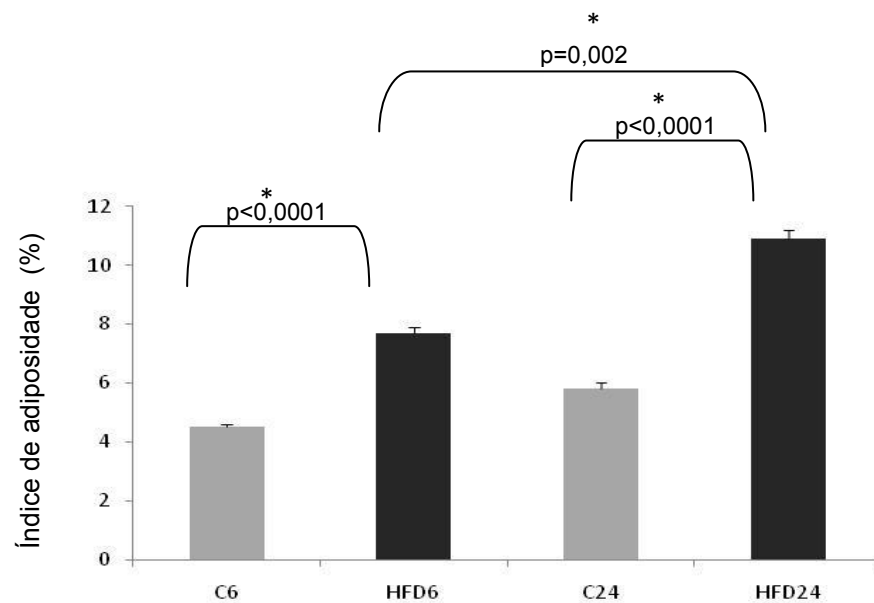
Comparação entre os pesos finais dos grupos:

C6 x HFD6:  $p=0,996$

C24 x HFD24:  $p<0,001$

C6 x C24:  $p=0,017$

HFD6 x HFD24:  $p<0,001$



**Figura 3.** Índice de adiposidade dos animais C e HFD ao final de 6 e 24 semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  EP. \* $p<0,05$

## Medidas bioquímicas plasmáticas

Nos animais HFD tratados por 6 semanas, houve um aumento nos níveis de TG, glicose, insulina e leptina em comparação ao grupo C. Essas mudanças foram também observadas no grupo HFD24 comparado a C24. No entanto, quando comparamos animais submetidos à mesma dieta por tempos diferentes, somente a leptina aumentou no grupo C24 em comparação a C6 e em HFD24 comparado a HFD6.

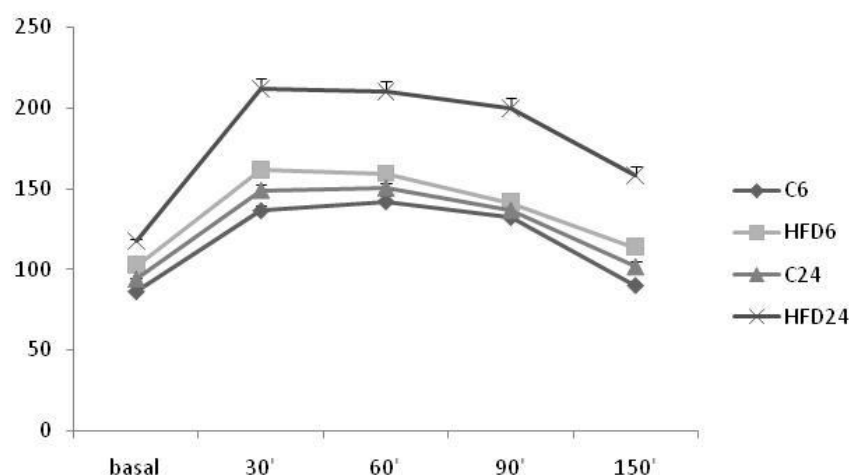
**Tabela 2.** Valores plasmáticos de TG, FFA, glicose, insulina, leptina e adiponectina dos grupos C e HFD ao final de 6 e 24 semanas.

| Variáveis            | Grupos                    |                            |                           |                            |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                      | C6                        | HFD6                       | C24                       | HFD24                      |
| TG (md/dL)           | 41,9 ± 1,4 <sup>A,a</sup> | 91,1 ± 3,5 <sup>A,b</sup>  | 51,6 ± 1,9 <sup>A,a</sup> | 100,7 ± 2,8 <sup>A,b</sup> |
| FFA (mmol/L)         | 0,4 ± 0,01 <sup>A,a</sup> | 0,4 ± 0,01 <sup>A,a</sup>  | 0,4 ± 0,01 <sup>A,a</sup> | 0,5 ± 0,01 <sup>A,a</sup>  |
| Glicose (mg/dL)      | 85,9 ± 1,3 <sup>A,a</sup> | 102,3 ± 0,9 <sup>A,b</sup> | 96,9 ± 0,1 <sup>A,a</sup> | 117,3 ± 1,6 <sup>A,b</sup> |
| Insulina (ng/mL)     | 1,9 ± 0,1 <sup>A,a</sup>  | 3,9 ± 0,2 <sup>A,b</sup>   | 2,4 ± 0,1 <sup>A,a</sup>  | 5,4 ± 0,2 <sup>A,b</sup>   |
| Leptina (ng/mL)      | 2,5 ± 0,1 <sup>A,a</sup>  | 6,2 ± 0,1 <sup>A,b</sup>   | 3,7 ± 0,3 <sup>B,a</sup>  | 13,9 ± 0,4 <sup>B,b</sup>  |
| Adiponectina (ng/mL) | 19,4 ± 0,9 <sup>A,a</sup> | 11,4 ± 0,2 <sup>A,b</sup>  | 19,0 ± 0,5 <sup>A,a</sup> | 13,1 ± 0,2 <sup>B,b</sup>  |

Dados expressos em média ± EP. Letras maiúsculas comparam duração de tratamento (6 vs. 24 semanas); letras minúsculas comparam tipo de dieta (C vs. HFD). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)

A figura abaixo mostra os valores de glicose sanguínea obtidos de cada grupo no OGTT. Houve diferença entre C24 comparado a HFD24 e entre HFD24 e HFD6. Com 6 semanas os animais apresentavam um quadro de resistência a insulina e com 24 semanas um quadro de diabetes tipo 2.



**Figura 4.** Teste oral de tolerância à glicose (n=8 animais/grupo)

C6: dieta controle por 6 semanas; HFD6: dieta hiperlipídica por 6 semanas; C24: dieta controle por 24 semanas; HFD24: dieta hiperlipídica por 24 semanas

Área abaixo da curva (média  $\pm$  EP): C6:  $9934,6 \pm 151,9$ ; HFD6:  $11069,6 \pm 227,0$ ; C24:  $12172,4 \pm 236,1$ ; HFD24:  $16081,4 \pm 384,6$ .

Comparação entre os grupos (método Holm-Sidak):

C6 x HFD6:  $p=0,346$

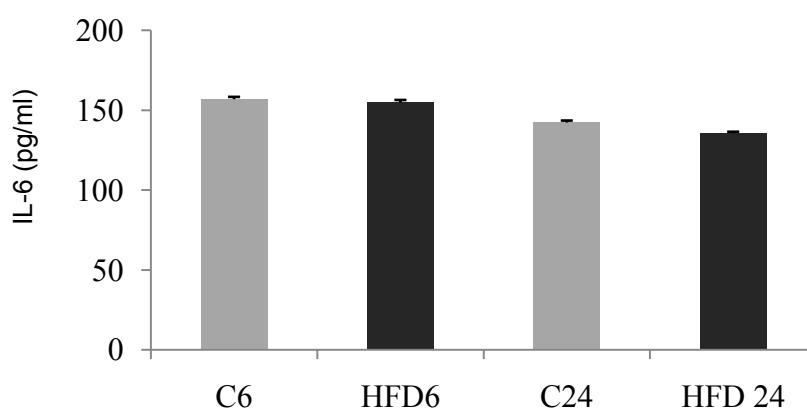
C24 x HFD24:  $p=0,002$

C6 x C24:  $p=0,067$

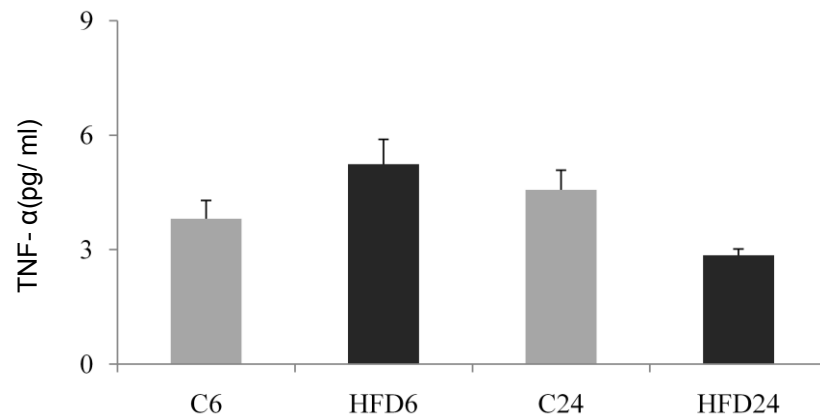
HFD6 x HFD24:  $p=0,000$

### Adipocinas plasmáticas e no tecido adiposo

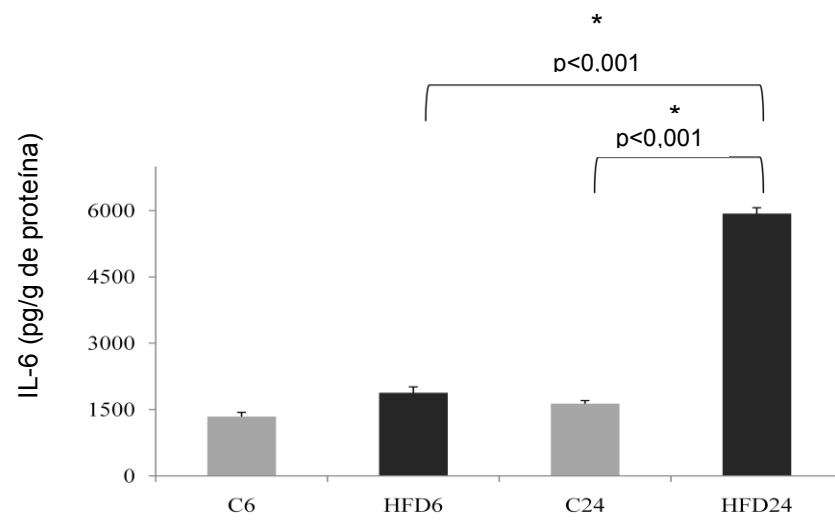
Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 no plasma e tecido adiposo estão mostrados nas figuras 5 e 6. Não foram encontradas diferenças nos níveis plasmáticos dessas citocinas quando comparamos tempo de tratamento ou tipo de dieta consumida. No entanto, no tecido adiposo, os animais HFD24 apresentaram níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparados aos grupos C24 e HFD6.



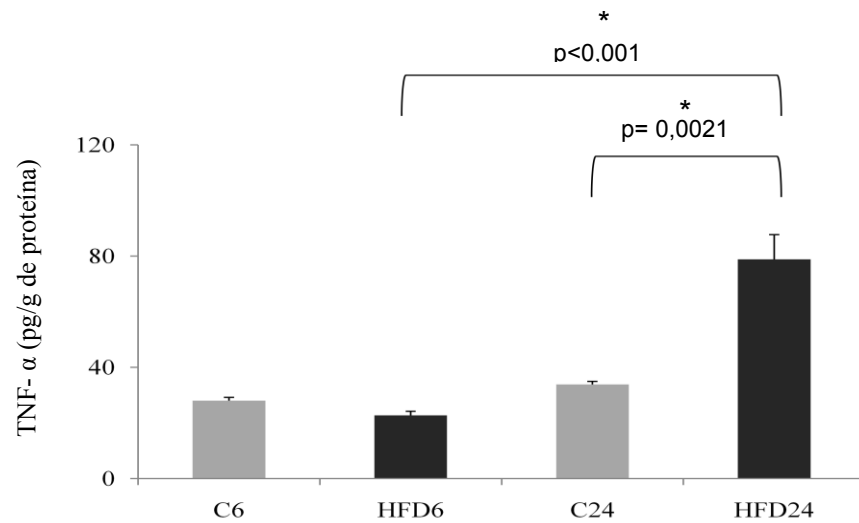
**Figura 5.** Níveis plasmáticos de IL-6 nos animais C e HFD ao final da 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$



**Figura 6.** Níveis plasmáticos de TNF-α nos animais C e HFD ao final da 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$



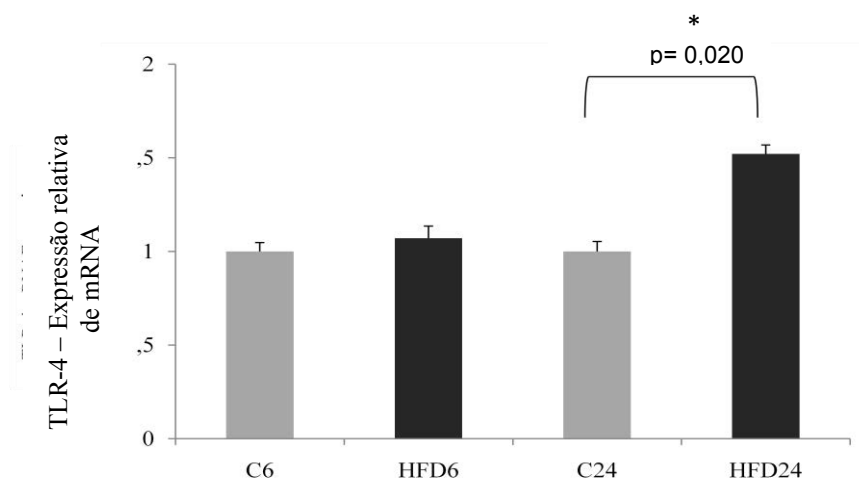
**Figura 7.** Níveis de IL-6 no tecido adiposo epididimal nos animais C e HFD após 6 e 24 semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$



**Figura 8.** Níveis de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo epididimal nos animais C e HFD após 6 e 24 semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$

### Expressão gênica do TLR-4

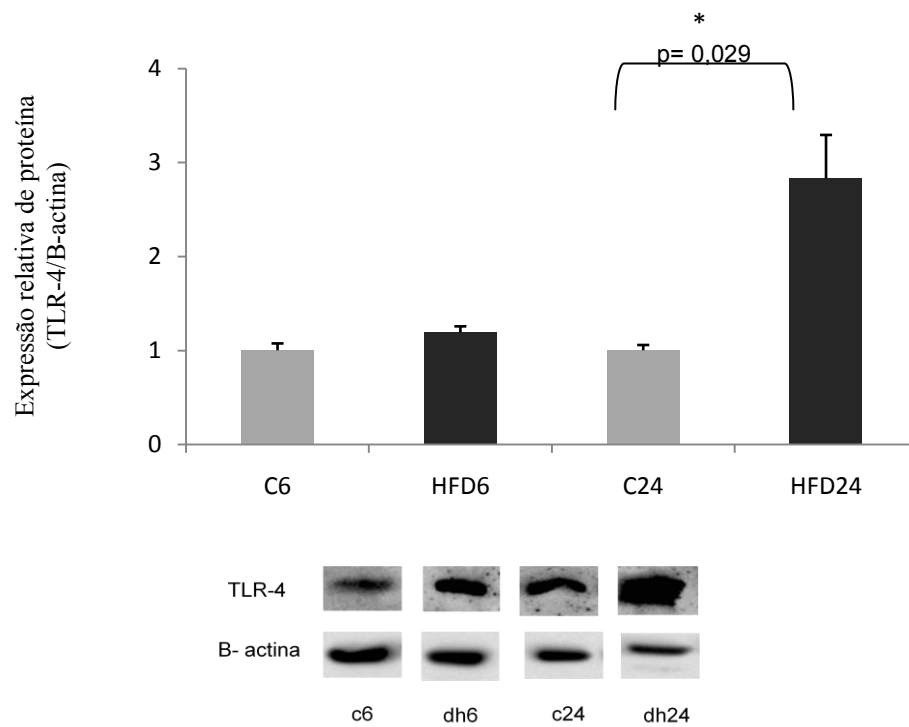
O consumo da dieta hiperlipídica aumentou a expressão gênica do TLR-4 no grupo HFD24 comparado ao C24. Essa diferença não foi observada nos animais tratados durante 6 semanas (figura 9).



**Figura 9.** Efeito da dieta hiperlipídica na expressão do TLR-4 no tecido adiposo epididimal nos animais C e HFD após 6 e 24 semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$

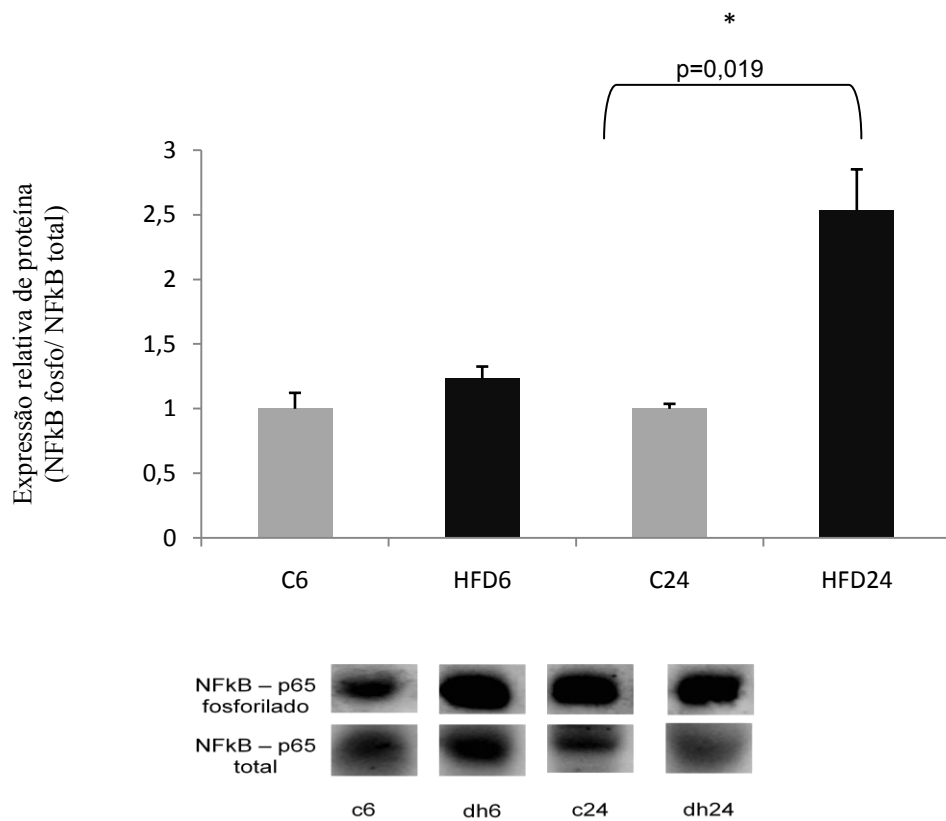
## Western Blot

A figura abaixo mostra a expressão protéica do TLR-4 no tecido adiposo epididimal. Notamos que ao final de 24 semanas, os animais HFD24 apresentaram maior expressão do receptor quando comparado a C24.



**Figura 10.** Expressão do TLR-4 no tecido adiposo epididimal nos animais C e HFD após 6 e 24 semanas. Resultados apresentados em média  $\pm$  erro padrão (EP). \* $p < 0,05$

Na figura 11 temos a expressão protéica do fator transcricional NFkB no tecido adiposo epididimal dos animais. Notamos que assim como o TLR-4, a expressão do NFkB aumentou ao final de 24 semanas no grupo HFD comparado a C24.



**Figura 11.** Expressão do NFκB no tecido adiposo epididimal nos animais C e HFD após 6 e 24 semanas. Resultados apresentados em média ± erro padrão (EP). \*p<0,05

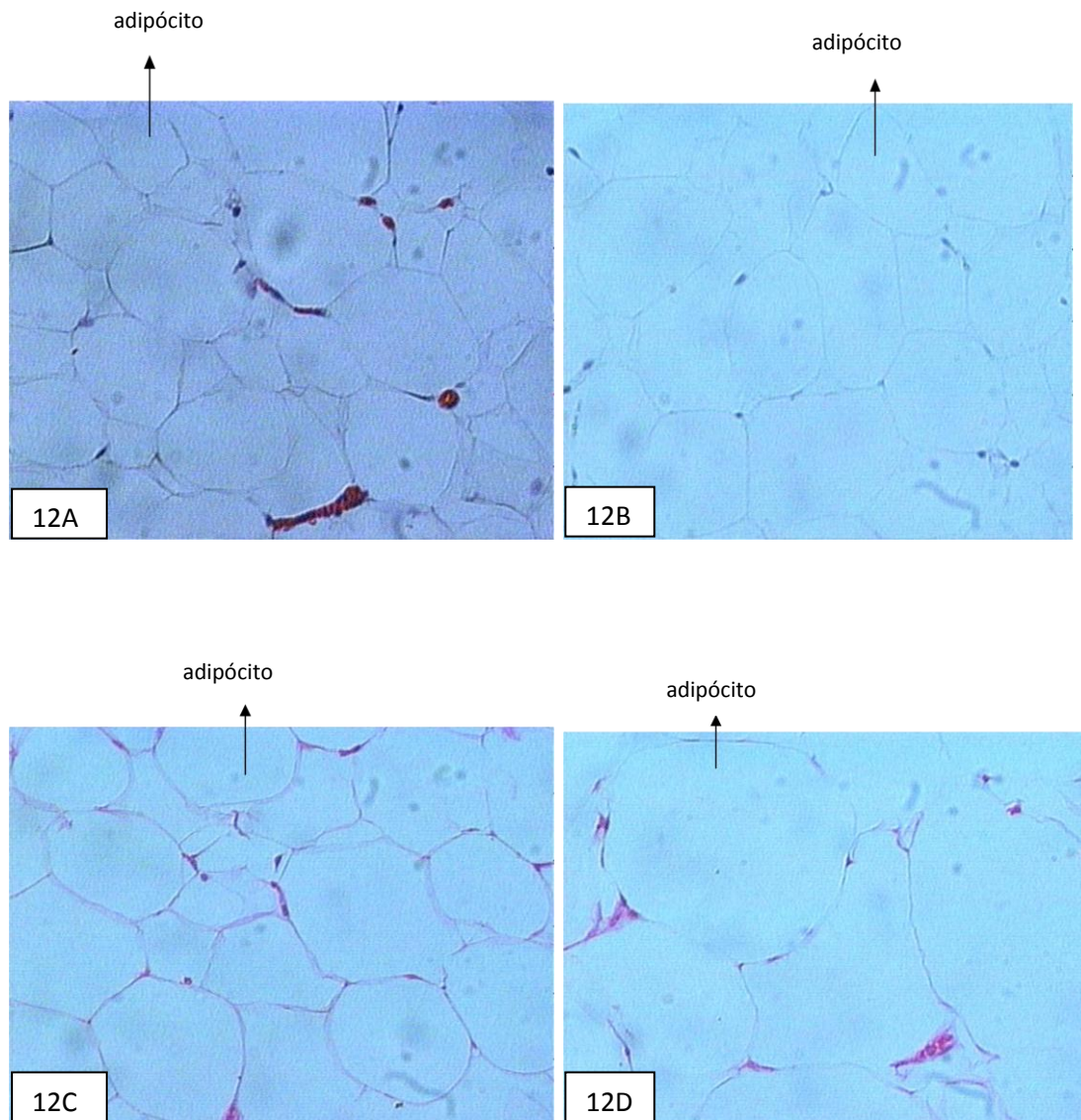
### Análise histológica

A tabela 3 apresenta a área média dos adipócitos de cada grupo, assim, como as figuras mostram os cortes histológicos do tecido adiposo. Os animais HFD24 apresentaram maior média comparados a C24 e a HFD6.

**Tabela 3.** Área média dos adipócitos dos grupos C e HFD após 6 e 24 semanas de tratamento.

|     |                                |        |                                |
|-----|--------------------------------|--------|--------------------------------|
| C6  | 1004.39 ± 30.5 <sup>A,a</sup>  | HFD 6  | 1425.57 ± 28.1 <sup>A,a</sup>  |
| C24 | 2866.39 ± 154.9 <sup>A,b</sup> | HFD 24 | 5080.31 ± 122. <sup>B, b</sup> |

Dados expressos em média ± EP. Letras maiúsculas comparam duração de tratamento (6 vs. 24 semanas); letras minúsculas comparam tipo de dieta (C vs. HFD). Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05).



**Figura 12.** Imagem dos adipócitos na aumentativa de 40x. 12A - grupo C6; 12B- grupo HFD6; 12C- grupo C24 e 12D- grupo HFD24.

## Discussão

Esse estudo avaliou os parâmetros metabólicos, marcadores inflamatórios séricos e no tecido adiposo de ratos expostos à dieta rica em açúcar e gordura. A dieta causou alterações nos parâmetros inflamatórios, metabólicos, e também na composição corporal, em uma resposta dependente do tempo de exposição.



Dietas hiperlipídicas estão associadas com aumento de peso corporal e obesidade (10, 11). O excesso de gordura corporal pode desencadear hipertensão arterial, bem como diversas alterações bioquímicas e hormonais: aumento de glicemia, triglicerídeos, ácidos graxos livres, leptina e uma diminuição da adiponectina, juntamente com aumento da secreção da insulina (28, 29), que juntas caracterizam um quadro de síndrome metabólica (SM). Outros achados laboratoriais associados à SM que se encontram alterados são os marcadores inflamatórios (30). Na primeira avaliação do estudo, ao final de 6 semanas, observamos que os animais HFD6 apresentaram maior índice de adiposidade, aumento de glicemia de jejum, TG, insulina e leptina, além de adiponectina reduzida. Esses resultados estão de acordo com Vincent e colaboradores (2012), que reportou alterações metabólicas após 20 semanas de dieta hipercalórica, incluindo aumento de perfil lipídico, glicemia plasmática e alterações hormonais (31). Esse quadro reflete que um curto período de consumo da dieta foi capaz de desenvolver SM, caracterizada pela alteração em três parâmetros: aumento de TG, índice de adiposidade, e resistência à insulina (RI). Embora no OGTT os animais não tenham apresentado diferença nas médias de glicemia em comparação aos C6, os valores de insulina estão maiores, mostrando um aumento na produção desse hormônio pelos animais a fim de manter os valores normais de glicemia. Outro parâmetro que confirma a RI são os valores reduzidos de adiponectina, que se correlacionam negativamente com a sensibilidade à insulina (32, 33).

Com relação ao tempo prolongado de exposição a essa dieta, o que podemos observar foi um aumento expressivo do índice de adiposidade, juntamente com aumento dos valores de leptina comparado ao período de 6 semanas. Somado a

isso, ao final de 24 semanas, os animais HFD24 apresentaram além de um agravamento no quadro metabólico, maiores médias de glicemia no OGTT, o que representa uma condição de diabetes tipo 2.

Obesidade não é caracterizada apenas pelo aumento dos níveis bioquímicos e hormonais, sabe-se que uma dieta hiperlipídica também induz a um estado inflamatório (34), especialmente uma inflamação crônica de baixo grau (35, 36). Esse estado inflamatório induzido pela obesidade é distinto da inflamação clássica, caracterizada pelos sinais de calor, rubor, tumor e dor (1). Essa resposta clássica está uniformemente associada com aumento da taxa metabólica basal e representa uma resposta rápida do sistema immune a uma injúria ou infecção (37). Normalmente, quando o insulto é removido ou neutralizado, a inflamação é resolvida. Por outro lado, o gatilho inflamatório na obesidade é a disfunção metabólica, causada pelo consumo excessivo de nutrientes, resultando numa condição chamada de metainflamação (1).

Um dos fatores responsáveis pela inflamação é a ativação dos receptores TLR-4, tanto pelos macrófagos quanto pelos adipócitos (12). Porém, poucos trabalhos acompanham a evolução da resposta inflamatória por meio dessa via, ao longo do tempo (9, 12, 34). Nós podemos observar que a dieta proposta nesse estudo foi capaz de promover aumento na expressão do TLR-4 no tecido adiposo ao final de 24 semanas. Podemos assim, afirmar que o TLR4 é um dos mecanismos envolvidos na inflamação decorrente da obesidade e que sua ativação depende de um período prolongado de consumo de uma dieta desequilibrada.

A ativação do TLR-4 acarreta em aumento na ativação do fator transcricional NFkB por meio da sua fosforilação, que culmina com a produção das citocinas, como

TNF- $\alpha$  e IL-6 (1). Nossos resultados confirmam a ativação dessa cascata inflamatória, visto que observamos um aumento do TLR-4, ativando NFkB, o que resultou em níveis elevados de citocinas no tecido adiposo do grupo HFD24 e que essa resposta foi dependente do tempo de consumo da dieta. Esse aumento de citocinas não atingiu níveis plasmáticos, em oposição a estudos em humanos e ratos geneticamente obesos, que mostram um aumento a nível sistêmico (38, 39). No entanto, a literatura relata estudos com obesidade induzida por dieta que não encontraram aumento plasmático de TNF- $\alpha$  em camundongos que receberam uma dieta com 35% das calorias provenientes de gordura durante 10 semanas (40) ou 41.7% das calorias provenientes de gordura durante 16 semanas (39). De acordo com esses dados, sugere-se que para a inflamação atingir níveis sistêmicos, é necessária uma produção constante e prolongada de citocinas pelo tecido adiposo.

Com uma sobrecarga nutricional, ocorre hipertrofia do adipócito, o que leva a um aumento da secreção de citocinas (41-43). Em nosso estudo, os animais HFD24 apresentaram adipócitos hipertrofiados e aumento de citocinas no tecido. O consumo energético excessivo induz o tecido adiposo a expandir rapidamente, pelo maior acúmulo de triacilglicerol, e assim, aumenta também o índice de adiposidade (44-47). Esses resultados são consistentes com nosso trabalho visto que os animais expostos a HFD tiveram aumento do índice de adiposidade em 6 e 24 semanas. No entanto, nós observamos hipertrofia apenas na 24<sup>a</sup> semana. Em contraste, Kwon e colaboradores (2012) reportaram hipertrofia já na segunda semana em camundongos recebendo dieta hipercalórica (48).

Assim, podemos concluir que a dieta hiperlipídica usada nesse estudo foi capaz de alterar os parâmetros metabólicos e gordura corporal num curto período de

tempo, causando um quadro de síndrome metabólica. No entanto, para a ativação do TLR-4 e subsequente inflamação do tecido adiposo foi necessário de um tempo maior de exposição à dieta, que foi também responsável por agravar o quadro de síndrome metabólica que já estava presente num primeiro momento.

## **Agradecimentos**

Agrademos a Mario B. Bruno, José Carlos Georgette e Renata Capela pelo suporte técnico. Agradecemos a FAPESP (nº 2011/14132-0; 2011/14593-8) pelo suporte financeiro.

## **Referências**

1. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annual review of immunology. 2011;29:415-45. Epub 2011/01/12.
2. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2010;303(3):235-41. Epub 2010/01/15.
3. Sowers JR. Obesity as a cardiovascular risk factor. The American journal of medicine. 2003;115 Suppl 8A:37S-41S. Epub 2003/12/18.
4. Whaley-Connell A, Pulakat L, Demarco VG, Hayden MR, Habibi J, Henriksen EJ, et al. Overnutrition and the Cardiorenal Syndrome: Use of a Rodent Model to Examine Mechanisms. Cardiorenal medicine. 2011;1(1):23-30. Epub 2012/01/20.
5. Govindarajan G, Hayden MR, Cooper SA, Figueroa SD, Ma L, Hoffman TJ, et al. Metabolic derangements in the insulin-resistant heart. Journal of the cardiometabolic syndrome. 2006;1(2):102-6. Epub 2007/08/08.
6. Carnevali JB, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz W, Jr., Guimaraes RB, Ribeiro EB, et al. The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance. Endocrinology. 2003;144(12):5604-14. Epub 2003/09/10.
7. Ren J, Sowers JR, Walsh MF, Brown RA. Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2000;279(4):H1708-14. Epub 2000/09/29.
8. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2004;287(4):R943-9. Epub 2004/06/12.

9. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007;21(12):1443-55. Epub 2007/06/19.
10. Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, Jones KE, et al. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes*. 2009;58(11):2536-46. Epub 2009/08/20.
11. Choi KD, Vodyanik M, Slukvin, II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nature protocols*. 2011;6(3):296-313. Epub 2011/03/05.
12. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(11):3015-25. Epub 2006/10/21.
13. Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(14):2556-64. Epub 2001/12/01.
14. Kim JJ, Sears DD. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterology research and practice*. 2010;2010. Epub 2010/09/04.
15. Silver AC, Kikuchi Y, Fadl AA, Sha J, Chopra AK, Graf J. Interaction between innate immune cells and a bacterial type III secretion system in mutualistic and pathogenic associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(22):9481-6. Epub 2007/05/23.
16. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-86. Epub 2009/04/15.
17. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine*. 2005;11(2):183-90. Epub 2005/02/03.
18. Maric T, Woodside B, Luheshi GN. The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. *Brain, behavior, and immunity*. 2013. Epub 2013/10/01.
19. Kim SJ, Choi Y, Choi YH, Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(2):113-22. Epub 2011/03/19.
20. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research*. 2007;100(11):1589-96. Epub 2007/05/05.
21. Jacob PS, de Meneses Fujii TM, Yamada M, Borges MC, Pantaleao LC, Borelli P, et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell biochemistry and function*. 2013;31(3):244-53. Epub 2012/09/26.
22. Lai YH, Chen LJ, Cheng JT. Role of TNF-alpha in renal damage in mice showing hepatic steatosis induced by high fat diet. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2013;45(1):38-42. Epub 2012/09/08.
23. Park HJ, Lee JY, Chung MY, Park YK, Bower AM, Koo SI, et al. Green tea extract suppresses NFkappaB activation and inflammatory responses in diet-induced

- obese rats with nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of nutrition*. 2012;142(1):57-63. Epub 2011/12/14.
24. Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, Borelli P, Fock RA. A High-Fat Diet Increases IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  Production by Increasing NF- $\kappa$ B and Attenuating PPAR- $\gamma$  Expression in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Inflammation*. 2013; 36(2): 379-86. Epub 2012/10/19.
  25. Gea-Sorli S, Bonjoch L, Closa D. Differences in the inflammatory response induced by acute pancreatitis in different white adipose tissue sites in the rat. *PloS one*. 2012;7(8):e41933. Epub 2012/08/08.
  26. American Diabetes Association. Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes. [internet]. ADA; 2014 [acesso 9 jan 2014]. Disponível em: <http://www.diabetes.org/are-you-at-risk/prediabetes/?loc=atrisk-slabnav>
  27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.
  28. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of medicine*. 2013;7(1):14-24. Epub 2013/03/09.
  29. Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;771:240-51. Epub 2013/02/09.
  30. Olufadi R, Byrne CD. Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *Journal of clinical pathology*. 2008;61(6):697-706. Epub 2008/05/29.
  31. Vincent M, Philippe E, Everard A, Kassis N, Rouch C, Denom J, et al. Dietary Supplementation With Agaricus Blazei Murill Extract Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2012. Epub 2012/07/07.
  32. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(6):1595-9. Epub 2000/06/10.
  33. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(5):1930-5. Epub 2001/05/10.
  34. Konner AC, Bruning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22(1):16-23. Epub 2010/10/05.
  35. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1796-808. Epub 2003/12/18.
  36. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1821-30. Epub 2003/12/18.
  37. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*. 2010;2010. Epub 2010/08/14.
  38. Glowinska B, Urban M. [Selected cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-alpha) in children and adolescents with atherosclerosis risk factors: obesity, hypertension, diabetes]. *Wiad Lek*. 2003;56(3-4):109-16. Epub 2003/08/20. Wybrane cytokiny (IL-6,

IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$ ) u dzieci i młodzieży obarczonych tradycyjnymi czynnikami ryzyka miażdżycy: otyłością, nadciśnieniem, cukrzycą.

39. Frye M, McMurtry I, Orton EC, Fagan K. Use of fat-fed rats to study the metabolic and vascular sequelae of obesity and beta-adrenergic antagonism. *Comparative medicine*. 2009;59(3):242-8. Epub 2009/07/22.

40. Bedoui S, Velkoska E, Bozinovski S, Jones JE, Anderson GP, Morris MJ. Unaltered TNF- $\alpha$  production by macrophages and monocytes in diet-induced obesity in the rat. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2(1):2. Epub 2005/04/09.

41. van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27(8):889-95. Epub 2003/07/16.

42. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004;28 Suppl 4:S12-21. Epub 2004/12/14.

43. Van Gaal L. Body fat mass distribution. Influence on metabolic and atherosclerotic parameters in non-insulin dependent diabetics and obese subjects with and without impaired glucose tolerance. Influence of weight reduction. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*. 1989;51(1):47-80. Epub 1989/01/01.

44. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca<sup>2+</sup> handling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2008;41(7):615-20. Epub 2008/08/23.

45. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2008;52(6):968-74. Epub 2008/09/30.

46. Park S, Park NY, Valacchi G, Lim Y. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:984643. Epub 2012/07/11.

47. Luvizotto RA, Conde SJ, Sibio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Administration of physiologic levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism: clinical and experimental*. 2010;59(1):1-6. Epub 2009/10/23.

48. Kwon EY, Shin SK, Cho YY, Jung UJ, Kim E, Park T, et al. Time-course microarrays reveal early activation of the immune transcriptome and adipokine dysregulation leads to fibrosis in visceral adipose depots during diet-induced obesity. *BMC genomics*. 2012;13:450. Epub 2012/09/06.

