

LÍLIAN GONÇALVES TEIXEIRA

**Interação entre obesidade induzida por
dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação
no tecido adiposo e no cólon**

Belo Horizonte – MG

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2012

LÍLIAN GONÇALVES TEIXEIRA

**Interação entre obesidade induzida por
dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação
no tecido adiposo e no cólon**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

Belo Horizonte – MG
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2012

Teixeira, Lílian Gonçalves

Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon. [manuscrito] / Lílian Gonçalves Teixeira. – 2012.

168 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez-Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Colite – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Intestinos - Doenças inflamatórias - Teses. 4. Bioquímica – Teses. 5. Dieta hiperlipídica. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1:61



Universidade Federal de Minas Gerais -
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LILIAN GONÇALVES TEIXEIRA. Aos dezenove dias do mês de outubro de 2012 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e cólon" requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Helen Hermana Miranda Hermsdoff da Universidade Federal de Viçosa, aprovada; Dra. Vera Lúcia Flor Silveira da Universidade Federal de São Paulo, aprovada; Dra. Lirlândia Pires de Sousa da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Flaviano dos Santos Martins da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de outubro de 2012.

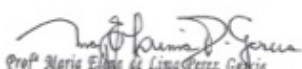

Dra. Helen Hermana Miranda Hermsdoff - UFV


Dra. Vera Lúcia Flor Silveira - UNIFESP


Dra. Lirlândia Pires de Sousa - UFMG


Dr. Flaviano dos Santos Martins - UFMG


Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - orientadora - UFMG


Prof. Maria Elma de Lima Perez Garcia
Coordenadora do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais, Cláudio e Balbina, meus maiores incentivadores e batalhadores pela realização de meus sonhos. E ao Guilherme, presente em todos os momentos, com seu amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À professora Jacqueline, que me orientou, direcionou e proporcionou grande conhecimento e crescimento ao longo do mestrado e doutorado.

Aos professores Denise Cara, Ana Caetano Faria, Cândido Coimbra e Adaliene Ferreira, pela colaboração e tempo dispensado ao trabalho.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia, pelos ensinamentos compartilhados.

Aos funcionários desse departamento, pelo serviço prestado, principalmente à Celise e Eneida.

À Maria Helena, essencial no nosso trabalho.

À Nathalia Batista, pela ajuda nos experimentos de microscopia intravital e à Andrea Alves e ao Rafael Pires, pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo e ELISA.

Ao Ed e à Aldinha, mais que colaboradores nesse projeto, amigos pra toda a vida.

À Carol, aluna de iniciação científica, sempre eficiente e que me ajudou muito nos experimentos.

Aos amigos do LABiN, que se tornaram uma segunda família, ajudando em momentos de trabalho e discussões científicas, em momentos de estresse e nervosismo e em momentos de alegria e diversão.

Aos outros laboratórios desse e de outros departamentos, pelo socorro em momentos inesperados.

As instituições financiadoras, CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo incentivo financeiro.

A todos os meus amigos, que, longe ou perto, são essenciais. Muito obrigada pela amizade e apoio.

Aos meus pais, Balbina e Cláudio, meu irmão Vítor, e ao meu marido Guilherme, pelo constante incentivo, amor e paciência nos momentos mais instáveis.

A toda minha família, pelo amor e companheirismo.

A Nossa Senhora, por sua eterna proteção.

E a Deus, por todas as vitórias conseguidas.

*“O que sabemos é uma gota, o que
ignoramos é um oceano.”
Isaac Newton*

Sumário

Índice de Tabelas.....	X
Índice de Figuras.....	XI
Lista de siglas e abreviaturas.....	XIII
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XIX
Introdução.....	21
Revisão Bibliográfica.....	25
Sistema digestório.....	26
Sistema imune intestinal.....	29
Microbiota intestinal.....	31
Doenças Inflamatórias Intestinais.....	32
Retocolite ulcerativa.....	35
Modelos experimentais de colite.....	40
Fatores de risco ambientais – Dieta hiperlipídica.....	42
Tecido adiposo.....	44
Obesidade.....	49
Obesidade e inflamação no tecido adiposo.....	52
Obesidade e células imunes.....	52
Obesidade, microbiota e permeabilidade intestinal.....	55
Modelos experimentais de obesidade.....	57
Obesidade e colite.....	58
Justificativa.....	62
Objetivos.....	64
Metodologia.....	67
Animais.....	68
Delineamento experimental – Indução da obesidade e da colite crônica.....	68
Evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico.....	70
Amostras de sangue e tecido.....	71
Avaliação do perfil lipídico.....	72
Determinação da concentração de colesterol total.....	72

Sumário (Continuação)

Determinação da concentração de HDL colesterol.....	72
Determinação do colesterol não-HDL.....	73
Determinação da concentração de triglicerídeos séricos.....	73
Avaliação da homeostase da glicose.....	74
Determinação da glicemia de jejum.....	74
Teste de tolerância oral à glicose.....	75
Teste de sensibilidade à insulina.....	75
Determinação da insulina de jejum.....	76
Cálculo da resistência insulínica pelo Índice de HOMA (modelo de avaliação da homeostase).....	76
Contagem Total de Leucócitos no Sangue.....	77
Contagem Diferencial de Leucócitos no Sangue.....	77
Análise Histológica do Cólon e do Tecido Adiposo Epididimal.....	78
Análise de Eosinófilo, Neutrófilo e Macrófago por Ensaio Enzimático.	79
Análise do Perfil de Células Imunes por Citometria de Fluxo.....	81
Análise de Citocinas, Quimiocina e Ovalbumina por ELISA.....	85
Análise da expressão de RNA em tecido adiposo epididimal, cólon e linfonodos cecal e mesentéricos.....	87
Extração do RNA.....	87
Produção do cDNA.....	88
Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).....	89
Microscopia intravital no tecido adiposo epididimal e cólon.....	90
Avaliação da permeabilidade intestinal por ovalbumina.....	90
Análise Estatística.....	91
Resultados.....	92
Evolução ponderal e ingestão calórica e líquida.....	93
Avaliação do perfil lipídico no sangue.....	95
Avaliação da homeostase da glicose.....	95
Avaliação do leucograma.....	97
Avaliação do cólon.....	98
Análise do perfil inflamatório.....	100

Sumário (Continuação)

Avaliação da translocação bacteriana e permeabilidade intestinal.	108
Avaliação do linfonodo cecal e do baço.....	110
Avaliação do tecido adiposo epididimal (TAE).....	113
Análise do perfil inflamatório.....	116
Discussão.....	123
Considerações finais.....	134
Referências.....	136
Anexos.....	146
ANEXO 1: Certificado de aprovação no CETEA.....	147
ANEXO 2: Quadro Two-way ANOVA das análises.....	148
ANEXO 3: Artigo publicado.....	151

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição Energética das Dietas.....	70
Tabela 2: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.....	89
Tabela 3: Perfil lipídico no sangue.....	95
Tabela 4: Homeostase da glicose.....	96
Tabela 5: Leucograma no sangue.....	98
Tabela 6: Perfil de células imunes do linfonodo cecal.....	111
Tabela 7: Avaliação do baço.....	112

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura morfológica do tubo digestório.....	26
Figura 2: Mucosa intestinal.....	28
Figura 3: Sistema imune intestinal em indivíduo saudável.....	30
Figura 4: Sistema imune nas doenças inflamatórias intestinais.....	33
Figura 5: Conceitos atuais relacionados à retocolite ulcerativa.....	40
Figura 6: Células do tecido adiposo.....	44
Figura 7: Via de sinalização da leptina.....	47
Figura 8: Via de sinalização do TLR4.....	51
Figura 9: Mudanças na população de células imune no tecido adiposo durante a obesidade.....	54
Figura 10: Modelo de envolvimento da microbiota intestinal nas desordens metabólicas associadas à obesidade.....	56
Figura 11: Desenho experimental.....	69
Figura 12: Populações de linfócitos e de células granulares e agranulares.....	83
Figura 13: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores MOMA e CD80.....	84
Figura 14: Delimitação do quadrante para análise do marcador GR1.....	84
Figura 15: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD25 e LAP.....	84
Figura 16: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD4 e CD69.....	85
Figura 17: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD8 e CD69.....	85
Figura 18: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD19 e CD21.....	85
Figura 19: Consumo calórico e líquido.....	93
Figura 20: Variação ponderal.....	94
Figura 21: Teste de sensibilidade à insulina.....	96
Figura 22: Teste de tolerância oral à glicose.....	97
Figura 23: Aspecto morfológico do cólon.....	99

Lista de figuras (Continuação)

Figura 24: Escore histopatológico do cólon e seus componentes.....	100
Figura 25: Porcentagem de monócitos e macrófagos totais, macrófagos ativados e neutrófilos na lâmina própria.....	101
Figura 26: Ensaio enzimático no cólon.....	102
Figura 27: Porcentagem de linfócito T na lâmina própria.....	103
Figura 28: Porcentagem de linfócito B total e ativado na lâmina própria..	104
Figura 29: Concentração de citocinas e quimiocina inflamatórias no cólon.....	105
Figura 30: Concentração de citocinas da resposta Th2 no cólon.....	106
Figura 31: Expressão de TLR4 e receptor de leptina (Ob-Rb) no cólon....	107
Figura 32: Microscopia intravital no cólon.....	107
Figura 33: Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana.....	108
Figura 34: Avaliação da expressão de proteínas das junções firmes.....	109
Figura 35: Aspecto morfológico do TAE.....	113
Figura 36: Adiposidade, área dos adipócitos e estruturas em forma de coroa.....	114
Figura 37: Concentração sérica e expressão no tecido adiposo, de leptina, resistina e adiponectina.....	115
Figura 38: Porcentagem de macrófagos e monócitos totais, macrófagos ativados e neutrófilos no tecido adiposo.....	117
Figura 39: Porcentagem de linfócitos T no tecido adiposo.....	118
Figura 40: Porcentagem de linfócito B total e ativado no tecido adiposo..	119
Figura 41: Concentração de citocinas e quimiocina inflamatórias no tecido adiposo.....	120
Figura 42: Expressão de TNF, IL-6, MCP1 e TLR4 no tecido adiposo.....	121
Figura 43: Adesão e rolamento de leucócitos, expressão de ICAM1 e VCAM1, em tecido adiposo.....	122

Lista de siglas e abreviaturas

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

AdipoR: receptor de adiponectina

Akt/PKB: proteína quinase B

AMPK: proteína quinase dependente de AMP

APC: célula apresentadora de antígeno

ATP: adenosina trifosfato

BHT: hidroxitolueno butilado

BSA: albumina de soro bovino

CCL: ligante de quimiocinas *C-C-motif*

CCR: receptores de quimiocinas *C-C-motif*

CD: grupamento de diferenciação

CETEA: Comitê de Ética de Experimentação Animal

cm: centímetro

Co-A: coenzima A

db/db: camundongo nocaute para o gene do receptor de leptina

DII: doenças inflamatórias intestinais

DIO: dieta indutora de obesidade

DMEM: meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DVD: disco digital versátil

DSS: sulfato de sódio dextrano

EFC: estruturas em forma de coroa

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ENA: ativador de neutrófilos epiteliais

EUA: Estados Unidos da América

FSC: distribuição puntual de tamanho

g: grama

GR1: marcador de neutrófilos

Lista de siglas e abreviaturas (Continuação)

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HBSS: meio de cultura (Hank's Balanced Salt Solution)

HCl: ácido clorídrico

HDL: lipoproteína de alta densidade

HETAB: brometo de hexadeciltrimetilamonio

HFD: *high-fat diet*

HOMA: modelo de avaliação da homeostase

HOMA-BETA: índice de capacidade funcional das células β -pancreáticas

HOMA-IR: índice de resistência insulínica

ICAM: molécula de adesão intracelular

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IDL: lipoproteína de densidade intermediária

IEL: linfócitos intra-epiteliais

IFN: interferon

Ig: Imunoglobulina

IL: interleucina

IL10^{-/-}: camundongo nocaute para o gene da IL-10

IMC: índice de massa corporal

JAK: proteína da família Janus

kcal: quilocalorias

kg: quilograma

L: litro

LAP: peptídeo associado à latência

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPS: lipopolissacarídeos

m: metro

M: molar (mol/L)

Macrófagos M1: macrófagos classicamente ativados

Macrófagos M2: macrófagos alternativamente ativados

MALT: tecido linfoide associado à mucosa

MAPK/ERK: proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular

Lista de siglas e abreviaturas (Continuação)

MCP1/CCL2: proteína quimioatrativa de monócitos
mg: miligramas
MHC: complexo de histocompatibilidade principal
MIP: proteína inflamatória de macrófagos
mL: mililitro
MLC: cadeia leve de miosina
MLCK: quinase de cadeia leve de miosina
mM: milimolar
mmol: milimol
MOMA: anticorpo anti monócitos e macrófagos
mTOR: alvo de rapamicina em mamíferos
mU: miliunidades
MyD88: gene de diferenciação mielóide primária
NFκB: fator nuclear kappa B
NK: células *natural killer*
NKT: células T *natural killer*
nm: nanômetro
NOD: receptor NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)
ob: gene *obese*
ob/ob: camundongo nocaute para o gene da leptina
Ob-R: receptor de leptina
Ob-Rb ou Ob-RL: receptor de leptina b ou receptor longo de leptina
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPD: diaminobenzeno fenilenodiamina
pANCA: anticorpos citoplasmáticos anti-neutrofílico perinuclear
PBS: salina tamponada com fosfato
PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase
pM: pico molar
PPAR: receptor ativado de proliferação de peroxissomo
PRR: receptores de reconhecimento padrão
p/v: peso por volume
RANTES: *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*

Lista de siglas e abreviaturas (Continuação)

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RPMI: meio de cultura RPMI 1640

RT-PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

SSC: distribuição puntual de granulidade

STAT: transdutores de sinais e ativadores de transcrição

Th: linfócitos T auxiliares

TLR: receptor tipo toll

TMB: tetrametilbenzidina

TNBS: ácido sulfônico trinitrobenzeno

TNF: fator de necrose tumoral

Treg/Tr: célula T regulatória

U: unidades

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

v/v: volume por volume

VCAM: molécula de adesão celular vascular

VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa

ZO: zônulas de oclusão

RESUMO

A retocolite ulcerativa é uma doença de etiologia não completamente compreendida e é caracterizada por uma inflamação da mucosa do cólon. A epidemiologia das doenças inflamatórias intestinais sugere que fatores ambientais, tais como higiene pessoal, fumo e dieta contribuem para o início da doença. Marcadores pró-inflamatórios, incluindo interleucina (IL)6, IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) estão aumentados na colite. A obesidade também cursa com importante componente inflamatório que contribui diretamente para a inflamação sistêmica. Dados da literatura sugerem que as adipocinas leptina, resistina e adiponectina estão intimamente associados com as doenças inflamatórias intestinais tais como a retocolite ulcerativa. Além disso, alguns estudos demonstraram um aumento de citocinas pró-inflamatórias no intestino de animais obesos, bem como no tecido adiposo de animais com colite.

O objetivo deste estudo foi elucidar a relação entre a obesidade induzida por uma dieta hipercalórica e hiperlipídica e a colite crônica induzida pela administração de sulfato de sódio dextrano (DSS). Para isso, os camundongos foram divididos em 4 grupos (controle, colite, DIO e colite+DIO) e alimentados com ração comercial ou dieta indutora de obesidade por 8 semanas, com oferecimento de dois ciclos de sulfato de sódio dextrano (DSS) para indução da colite crônica. Após as 8 semanas totais de experimentos, os animais foram eutanasiados, e soro, cólon, tecido adiposo, baço e linfonodos cecal e mesentéricos foram coletados para avaliação histológica, análise de citocinas, de células imunes, de receptores relacionados à inflamação e avaliação da permeabilidade intestinal.

Os resultados mostram que a obesidade por si só não altera o escore histopatológico do cólon, mas quando associada à colite piora o escore quando comparado aos animais não obesos com colite. Quando comparados aos animais do grupo DIO, os animais do grupo colite+DIO apresentaram redução na adiposidade, mas se observou aumento do infiltrado inflamatório no cólon e no tecido adiposo visceral dos animais desse grupo devido ao aumento da infiltração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Microscopia intravital da microvasculatura do tecido adiposo mostrou um aumento na adesão e rolamento de leucócitos e o pcr em tempo real mostrou superexpressão de moléculas de adesão no grupo colite+DIO em comparação com outros grupos. Além disso, observou-se aumento da permeabilidade intestinal e aumento da expressão do receptor tipo toll (TLR)4 e receptor de leptina b (Ob-Rb) no cólon desses animais. A leptina sérica, entretanto, estava aumentada apenas no grupo DIO. Nossa hipótese é que a ligação leptina-Ob-Rb esteja relacionada ao aumento da inflamação do cólon dos animais do grupo colite+DIO. Ainda, linfócitos e monócitos circulantes e neutrófilos no baço e linfonodos cecais estavam aumentados nesse grupo.

Nossos resultados demonstraram a relação entre colite crônica e obesidade como fatores agravantes para cada doença, com aumento da inflamação no tecido adiposo e no cólon e alterações sistêmicas observadas no baço, linfonodo cecal e na corrente sanguínea.

Palavras chave: colite, obesidade, dieta hiperlipídica indutora de obesidade e inflamação

ABSTRACT

Ulcerative colitis is a disease of incompletely understood etiology and is characterized by inflammation of the colonic mucosa. The epidemiology of inflammatory bowel diseases suggests that environmental factors such as personal hygiene, smoking and diet contribute to disease onset. Pro-inflammatory markers including IL- 6, IL-1 and TNF are increased in colitis. These markers are also increased in obesity that have an important inflammatory component too. Obesity is a multifactorial disease involving endocrine factors, genetics and behavior and directly contributes to systemic inflammation. Studies have suggested that adipokines secreted by adipose tissue (leptin, resistin and adiponectin) are closely associated with inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis. In addition, some studies have shown increased pro-inflammatory cytokines in the intestine of obese animals as well as in the adipose tissue of animals with colitis.

The objective of this study was to elucidate the relationship between obesity induced by a hypercaloric, high-fat diet (HFD) and chronic colitis induced by intermittent administration of dextran sodium sulfate (DSS). To this, the animals were divided into 4 groups (control, colitis, HFD and colitis + HFD). Mice with chronic colitis induced by 2 cycles of dextran sodium sulfate (DSS) in the first and fourth week of the experiment were fed a high-fat diet (HFD) to induce obesity by 8 weeks. After 8 weeks of experiment, the animals were euthanized, and serum, colon, adipose tissue, spleen and cecal and mesenteric lymph nodes were analysed.

Obesity alone did not raise histopathology scores, but the combination of

obesity and colitis worsened the scores in the colon compared to colitis group. Despite the reduction in weight gain, there was increased inflammatory infiltrate in both the colon and visceral adipose tissue of colitis + HFD mice due to increased infiltration of macrophages, neutrophils and lymphocytes. Intravital microscopy of VAT microvasculature showed an increase in leukocyte adhesion and rolling and the real time pcr showed overexpression of adhesion molecules compared to other groups. Moreover, we observed increased intestinal permeability and toll like receptor (TLR)4 and leptin receptor expression in the colon of the Colitis+HFD group. The serum leptin were increased only in HFD group. We hypothesized that leptin-receptor (Ob-Rb) binding increasing the inflammation of the colon of Colitis+HFD.

Still, circulating lymphocytes, monocytes and neutrophils in the spleen and cecal lymph nodes were increased in the colitis + HFD group.

Our results demonstrated the relationship between cronic colitis and obesity as aggravating factors for each disease, with increased inflammation in the colon and adipose tissue and systemic alterations observed in the spleen, lymph nodes and bloodstream.

Keywords: colitis, obesity, high-fat diet-induced obesity and inflammation.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do trato gastrointestinal, como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. A doença de Crohn pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus e afeta a parede intestinal inteira, enquanto a retocolite ulcerativa é tipicamente restrita ao cólon e afeta a mucosa e submucosa colônica. Sintomas e sinais clínicos incluem perda de peso, diarreia sanguinolenta e dores abdominais.

As DII são doenças multifatoriais e, apesar de sua etiologia ainda ser desconhecida, existe um consenso de que elas são caracterizadas por resposta inflamatória crônica a microbiota intestinal em hospedeiros geneticamente susceptíveis, resultando em um desequilíbrio na microbiota intestinal e sistema imunológico.

A retocolite ulcerativa é a forma mais comum de doença inflamatória intestinal no mundo, com incidência variando entre 1,5 a 24,5 indivíduos por mil. É uma doença multifatorial e envolve aspectos genéticos e ambientais, (como, estilo de vida e dieta) e sistema imune.

A retocolite ulcerativa apresenta importante componente inflamatório, com grande infiltrado de células imunes para o cólon, como linfócitos, neutrófilos e macrófagos e liberação de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-6, IL-1, IL-5 e interferon (IFN) γ .

A dieta pode afetar a retocolite ulcerativa de forma protetora ou deletéria. Dietas ricas em frutas, vegetais, peixe e fibras dietéticas parecem ter efeito protetor sobre as DII. Alguns nutrientes, como os ácidos graxos de cadeia curta também apresentam efeitos benéficos na evolução da colite experimental. Já dietas ricas em sacarose, carboidratos refinados, e gordura saturada podem levar ao aumento do risco de desenvolvimento da retocolite ulcerativa. As

dietas ricas em gordura também são fatores de risco para outras doenças, como a obesidade.

A obesidade e o sobrepeso são definidos como o acúmulo excessivo de gordura que apresenta um risco para a saúde, e é uma doença de distribuição mundial. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, cerca de 1,4 bilhões de pessoas adultas apresentavam sobrepeso e 500 milhões apresentavam obesidade. No Brasil, quase metade da população apresenta sobrepeso, e 16% está obesa.

Além de ser, por si só, um problema de saúde pública mundial, a obesidade é fator de risco para diversas doenças como: diabetes melitos tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão pulmonar, apnéia obstrutiva do sono e variados tipos de câncer.

De forma geral, o consumo calórico excessivo ocasiona um aumento do acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos (hipertrofia) e aumento em seu número (hiperplasia). Os adipócitos hipertrofiados secretam agentes pró-inflamatórios promovendo uma inflamação sistêmica de baixo grau.

Assim como a retocolite ulcerativa, a obesidade apresenta importante componente inflamatório, com produção aumentada pelo tecido adiposo de citocinas inflamatórias como, TNF, IL-6 e adipocinas, como leptina e resistina. Além disso, é observado alteração do perfil de células imunológicas no tecido adiposo, sendo caracterizado por células de perfil mais inflamatório como macrófagos M1 e linfócitos T auxiliares (Th)1.

Estudos relacionando ambas as doenças, obesidade e retocolite ulcerativa, começam a ser realizados. Sabe-se que dietas hiperlipídicas são fatores de risco para ambas doenças e que elas apresentam importante

componente inflamatório envolvido em sua patogênese. Alguns estudos têm sugerido que adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, como leptina e adiponectina, estão intimamente associados à retocolite ulcerativa. Em adição, outros estudos mostram o aumento de citocinas pró-inflamatórias no intestino de animais obesos, bem como no tecido adiposo de animais com colite. Entretanto, estudos que demonstrem o perfil inflamatório em animais afetados por ambas doenças ainda não existem, sendo importante que se elucide a influência da inflamação do tecido adiposo derivado da obesidade induzida por dieta nas doenças inflamatórias intestinais e o perfil do tecido adiposo em indivíduos com colite crônica, avaliando a possibilidade de uma inflamação sistêmica.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sistema digestório

O sistema digestório inicia-se na cavidade bucal, continuando na faringe, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, terminando no reto, que se abre para o meio externo por meio do ânus^{1, 2}. O intestino grosso constitui a porção terminal do canal alimentar e se divide em cécum, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide e reto¹.

Ao longo de sua extensão, o tubo digestório é organizado morfológicamente de forma semelhante, sendo dividido em camadas serosa ou adventícia, muscular, submucosa e mucosa especializada³ (figura 1).

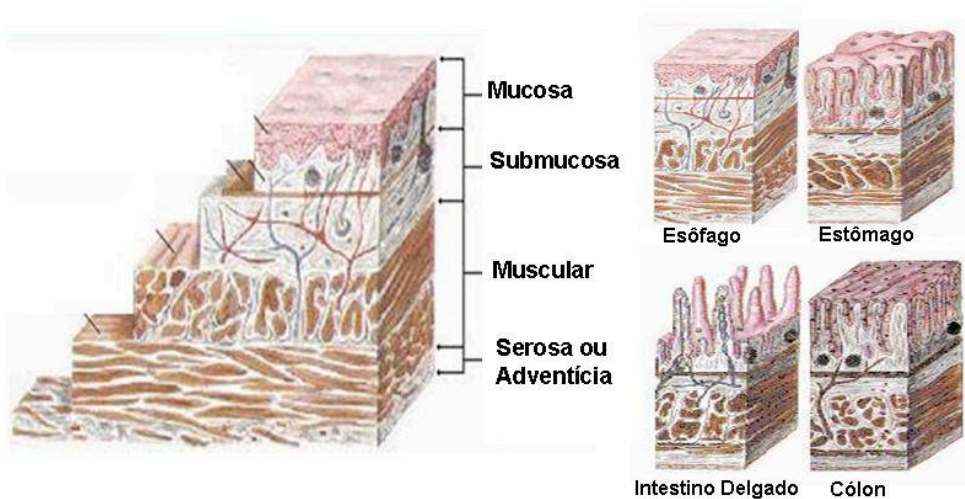


Figura 1: Estrutura morfológica do tubo digestivo: camadas serosa ou adventícia, camada muscular, camada submucosa e camada mucosa⁴.

A camada serosa ou adventícia é a mais externa das quatro camadas e recebe este nome de acordo com a presença ou ausência de um tecido epitelial de revestimento simples que circunda o tecido conjuntivo frouxo que forma essa camada. A camada muscular é formada por duas camadas de músculos lisos: a mais interna, longitudinal e a mais externa, circular. A camada submucosa é composta por tecido conjuntivo frouxo. Encontra-se

nessa camada, uma delgada camada muscular denominada *muscularis mucosae*³, que é uma parte importante e ativa da barreira de mucosa, possuindo mecanismos de controle de corrente entre mucosa e submucosa⁵.

A mucosa (figura 2) é a camada mais especializada e complexa do trato gastrointestinal. É formada por tecido epitelial de revestimento, glândulas e pela lâmina própria. As células epiteliais presentes nessa camada são distintas de acordo com o órgão em que estão localizadas e têm diversas funções: revestimento de vilosidades e criptas intestinais, absorção seletiva do material encontrado na luz intestinal, secreção de produtos de maneira diferenciada como muco (células caliciformes) e imunoglobulinas, e expressão de diversos marcadores celulares. Intrínseco ao tecido epitelial, encontram-se células especializadas na defesa do organismo, como os linfócitos intraepiteliais e as células M³.

As células M funcionam como captadoras seletivas de macromoléculas, sendo também porta de entrada de microrganismos, uma vez que são desprovidas de glicocálix, permitindo a adesão de microrganismos. Essas células também recobrem as placas de Peyer, que são aglomerados de nódulos linfóides na interface entre a camada mucosa e submucosa³.

A lâmina própria da camada mucosa, por sua vez, é rica em células do sistema imunológico, como mastócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos. Os componentes da imunidade presentes nesta camada formam o tecido linfóide associado à mucosa – MALT (Mucosal - Associated Lymphoid Tissue). A grande maioria das interações que ocorrem entre o meio ambiente intestinal e o organismo acontece na camada mucosa³.

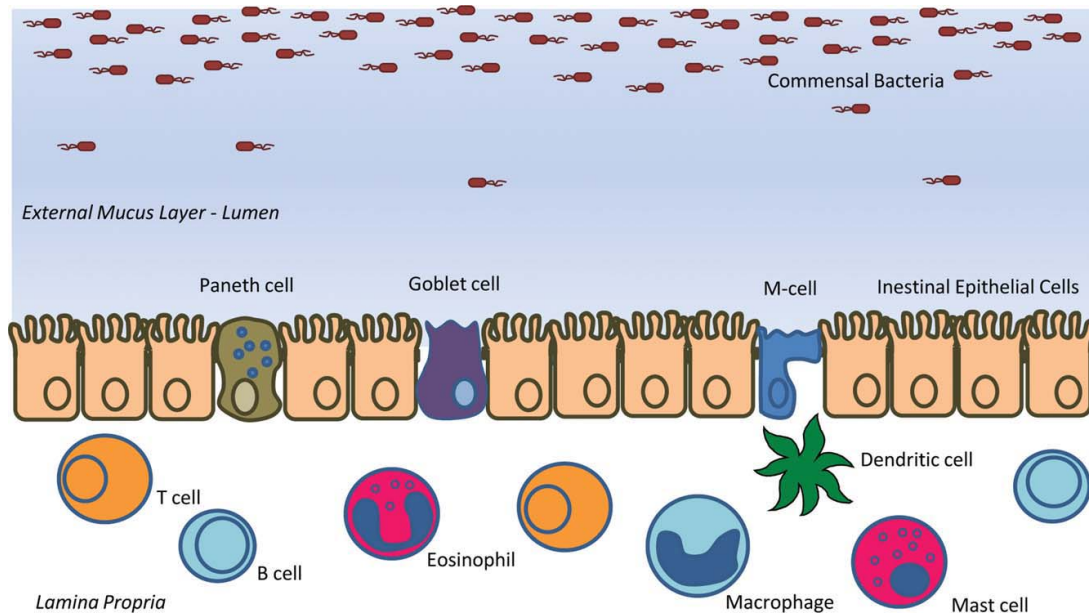


Figura 2: Mucosa intestinal. Diversos componentes se juntam para formar uma barreira de mucosa intestinal funcional: a camada espessa de muco, onde as bactérias comensais formam uma área de proteção; a camada de células epiteliais intercaladas com muco, que produzem células caliciformes e células Paneth produtora de peptídeo antimicrobiano; e enterócitos luminiais especializados, chamados células M, formando a principal barreira entre o interior do corpo e o mundo exterior. Na lâmina própria, células da imunidade inata e adaptativa como células T, B, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos, compreendem o sistema imune de mucosa que responde com erradicação ativa ou reação tolerigênica para antígenos estranhos⁶.

As células epiteliais estão unidas em sua parte apical pelas junções firmes (*tight junction* – figura 3). O complexo das junções firmes mantém uma distância estreita entre as membranas plasmáticas de duas células, excluindo o influxo de antígenos por meio de rotas paracelulares. As proteínas das junções firmes incluem claudinas e ocludinas e estão ligadas às zônulas de oclusão (ZO) que são pontes para o citoesqueleto de actina e filamentos de miosina. A organização das proteínas das junções firmes e da junção actina-miosina é regulada por uma complexa rede de vias de sinalização. A contração de filamentos de actina-miosina que abrem a junção paracelular é mediada pela fosforilação da cadeia leve de miosina (*myosin light chain* – MLC) via ativação

da quinase de cadeia leve de miosina (*myosin light chain kinase* – MLCK). A passagem anormal de bactérias pela camada epitelial devido ao aumento da translocação paracelular e alteração das junções firmes, está associada a diversos estados de doença⁷.

Sistema imune intestinal

O sistema imune é composto de uma rede complexa de células linfoides e fatores humorais. Mesmo em estado saudável, o sistema imune está atuando, mantendo uma inflamação fisiológica (figura 3).

Antígenos luminais, como comensais, patógenos e nutrientes, são recolhidos por meio de células apresentadoras de antígenos (APC – *antigen-presenting cells*) profissionais ou não profissionais. Embora as APCs não profissionais, como células epiteliais intestinais, possam interagir com células T imaturas (Th0) via receptores do complexo de histocompatibilidade principal (MHC - *major histocompatibility complex*) da classe 2, elas não produzem sinais co-estimulatórios na ausência de inflamação, suprimindo a indução de células T efetoras na mucosa. Células B de mucosa se diferenciam em células plasmáticas e secretam imunoglobulina (Ig) A, que cobrem o epitélio da mucosa. APCs profissionais, como células dendríticas, expressam grande variedade de receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) e moléculas co-estimulatórias. Elas controlam ambas as respostas imune inata, como ativação de células *natural killer*, e adaptativa, como o equilíbrio na diferenciação de células Th0 em células efetoras (Th1, Th2 e Th17) requeridas para combater organismos patogênicos, e células T

regulatórias (Treg e Th3). Na presença de comensais e na ausência de inflamação, o equilíbrio entre subpopulações imune efetoras e regulatórias é mantido por meio de uma rede de citocinas bem controlada⁸.

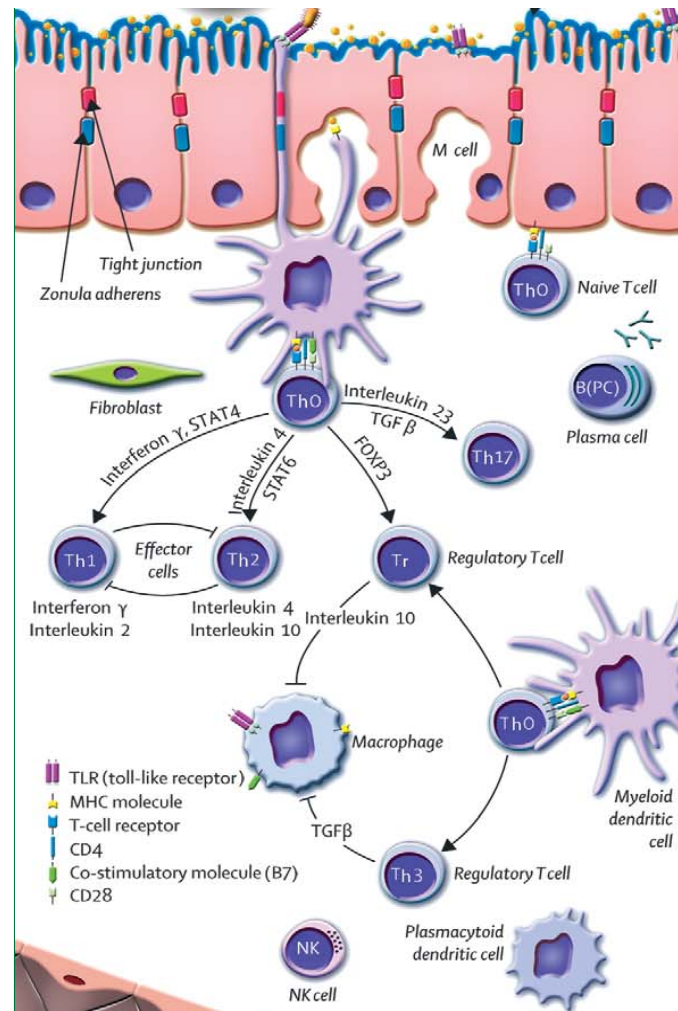


Figura 3: Sistema imune intestinal em indivíduo saudável. Equilíbrio entre resposta T efetora e regulatória e células da imunidade inata (macrófagos e granulócitos) mantém inflamação fisiológica na mucosa intestinal (adaptado de Baumgart e Carding, 2007⁸). Mcell: células M (célula epitelial especializada), Th: célula T auxiliary, Th0: célula T auxiliary imatura, Th1, Th2 e Th17: células T efetoras, Tr e Th3: células T regulatórias, B: células B, B(PC)cells: células B plasmáticas, NK: células *natural killer*, NKT: células T *natural killer*.

Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal é o maior reservatório de bactérias comensais do corpo humano. Ingestão alimentar por via oral serve como uma porta para o ambiente exterior e permite a entrada de organismos exógenos e nutrientes no trato gastrointestinal que fornecem suporte para o crescimento e sobrevivência tanto do hospedeiro como dos comensais⁷.

As bactérias comensais modulam a expressão de genes envolvidos em diversas funções intestinais importantes, incluindo absorção de nutrientes, fortificação da barreira de mucosa, angiogênese e maturação intestinal pós-natal. Essa relação simbiótica se estabelece durante os primeiros 2-3 anos de vida, sendo os bebês estéreis antes do nascimento⁸. A densidade bacteriana aumenta gradualmente do segmento proximal para o distal do trato gastrointestinal e atinge uma quantidade estimada de 10^{11} - 10^{12} bactérias por grama de conteúdo colônico. A população entérica bacteriana total consiste de até 10^{14} células, que é dez vezes o número de células do corpo humano. A microbiota intestinal é altamente diversificada e apresenta uma composição específica individual, determinada pelo genótipo do hospedeiro e fatores ambientais. Ao redor de 15.000 a 36.000 espécies de bactérias já foram identificadas no trato gastrointestinal humano, sendo os filos mais comumente encontrados, o Firmicutes (espécies como *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*), o Bacteroidetes (espécie como *Bacteroides*), o Proteobactérias (espécie como *Escherichia coli*) e Actinobactéria (espécie como *Bifidobacterium*)⁷.

Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do trato gastrointestinal, como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. Inflamação transmural caracterizada por hiperplasia linfoide, edema submucosal, lesões ulcerativas e fibrose são tipicamente observadas em áreas afetadas^{9, 10}. A doença de Crohn pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus e afeta a parede intestinal inteira, enquanto a retocolite ulcerativa é tipicamente restrita ao cólon e afeta a mucosa e submucosa colônica¹¹. Sintomas e sinais clínicos incluem perda de peso, diarreia sanguinolenta e dores abdominais⁹.

As DII são doenças multifatoriais e sua etiologia ainda é desconhecida^{9, 11-14}. Diversos fatores estão envolvidos na origem dessas doenças: fatores genéticos, sistema imune do hospedeiro e fatores ambientais como, microbiota, envolvimento de agente infeccioso e fatores dietéticos^{9, 12, 13, 15}. Existe um consenso de que as DII são caracterizadas por resposta inflamatória crônica a microbiota intestinal em hospedeiros geneticamente susceptíveis, resultando em um desequilíbrio na microbiota intestinal e sistema imunológico^{9, 10, 12-16}.

As DII afetam tanto crianças quanto adultos¹⁰. Estima-se que 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 2,2 milhões de pessoas na Europa apresentem a doença⁹. A incidência mundial de doença de Crohn varia entre 0,7 a 14,6 indivíduos por 100.000 habitantes, enquanto a incidência de retocolite ulcerativa varia entre 1,5 a 24,5 indivíduos por mil. Nos Estados Unidos, acredita-se que a doença de Crohn afete 0,20% da população e a retocolite ulcerativa 0,24%.

Apesar da baixa prevalência em gêmeos homocigotos, estudo mostrou incidência significativamente maior da doença de Crohn neste grupo de indivíduos do que poderia ter sido previsto ao acaso¹⁰.

Nas doenças inflamatórias intestinais, o sistema imune intestinal, tão bem controlado em estados de normalidade, apresenta distúrbios em todos os níveis (figura 4)⁸.

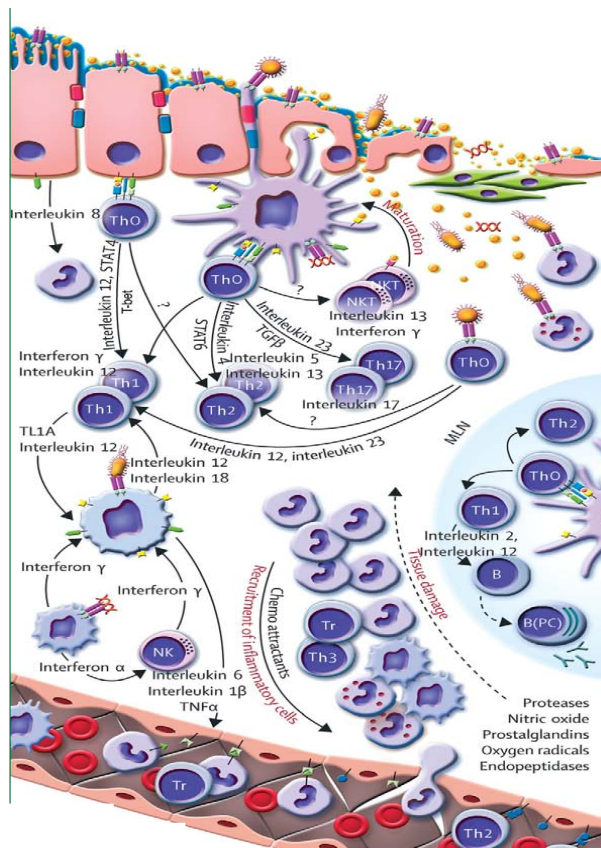


Figura 4: Sistema imune nas doenças inflamatórias intestinais. Desequilíbrio entre resposta T regulatória e T efetora, aumento de produção de citocinas inflamatórias, levando ao dano tecidual. (adaptado de Baumgart e Carding, 2007⁸). Mcell: células M (célula epitelial especializada), Th: célula T auxiliar, Th0: célula T auxiliar imatura, Th1, Th2 e Th17: células T efetoras, Tr e Th3: células T regulatórias, B: células B, B(PC)cells: células B plasmáticas, NK: células *natural killer*, NKT: células T *natural killer*, MLN: linfonodo mesentérico.

Antígenos luminais ganham acesso à mucosa devido às lesões na barreira epitelial. Nas células do sistema imune há aumento da expressão de

receptores de reconhecimento padrão (PRR) que se ligam aos patógenos e desencadeiam vias inflamatórias. Células dendríticas mieloides começam a reconhecer comensais como patógenos, entram em maturação e aumentam sua expressão de PRR, receptores de histocompatibilidade e de moléculas co-estimuladoras e param a migração. Juntamente a isso ocorre alteração do estado funcional das células para ativadas e promove diferenciação de células T imaturas (Th0) em células T efetoras (Th1, Th2 e Th17) e células T *natural killer*. As células epiteliais do intestino também passam a expressar moléculas co-estimuladoras. Essa expressão aumentada de co-estimuladoras aumenta a função de apresentadoras de antígenos das células epiteliais e contribuem para a resposta efetora das células T. Ativação de células T e B também ocorre em centros germinativos dos linfonodos, onde células dendríticas carregando antígenos encontram células Th0 e células B. Além da função de apresentadoras de antígenos, células T efetoras e T *natural killer*, granulócitos e macrófagos expressam seus próprios PRR no estado inflamatório e podem se tornar ativados por essa via alternativa. Em geral, a resposta T efetora predomina sobre a resposta T reguladora. Na doença de Crohn, as células Th0 se diferenciam predominantemente em células Th1, com produção principalmente de interferon gama (IFN γ) e interleucina (IL) 12. Na retocolite ulcerativa, as células Th0 se diferenciam preferencialmente em células Th2 aberrantes, com produção de IL-5 e IL-4, enquanto células *natural killer* produzem IL-13. As citocinas secretadas pelas células T efetoras estimulam macrófagos a secretarem grandes quantidades de outras citocinas inflamatórias, como TNF, IL-1 e IL-6. Finalmente, leucócitos em rolamento e em adesão da vasculatura da mucosa passam para a mucosa, liberam mais

citocinas inflamatórias e amplificam e perpetuam esse ciclo inflamatório. O dano tecidual leva à liberação de diversos mediadores nocivos como óxido nítrico, proteases, endopeptidases e radicais livres^{8, 16}.

Retocolite Ulcerativa

A retocolite ulcerativa é a forma mais comum de doença inflamatória intestinal no mundo¹⁷. É uma doença multifatorial e envolve aspectos genéticos e ambientais, como, estilo de vida e dieta e sistema imune, e apresenta fase aguda (sintomática) e fase remissiva^{13, 14, 18}.

A retocolite ulcerativa é uma doença inflamatória restrita ao cólon, que se inicia no reto. Dependendo da extensão anatômica, os pacientes podem ser classificados como tendo proctite, colite do lado esquerdo (envolvendo o cólon sigmóide com ou sem envolvimento do cólon descendente), ou pancolite. Alguns doentes também desenvolvem inflamação ileal, que, ocasionalmente, complica a diferenciação de ileocolite de Crohn¹³. É caracterizada por diarreia grave com perda de sangue, perda progressiva da função peristáltica e enrijecimento do cólon^{13, 16, 19}.

Histologicamente, a inflamação afeta a mucosa com infiltração de linfócitos e granulócitos e perda de células caliciformes, presença de ulcerações e abscessos nas criptas. O processo inflamatório tem início na profundidade das criptas e, com a evolução crônica da doença, ocorre a ruptura das criptas para dentro da lâmina própria e da submucosa permitindo a extensão lateral deste processo, ficando a mucosa descolada e descamada, produzindo ulcerações. Nessas ulcerações é possível perceber apoptose

aumentada das células epiteliais, e a razão de apoptose celular está correlacionada positivamente com a gravidade da doença^{16, 19}.

Na retocolite ulcerativa também ocorre alteração da barreira intestinal, com significantes alterações na estrutura e função das junções firmes epiteliais, incluindo uma elevada expressão da proteína claudina 2. Também foi encontrado um aumento da taxa apoptótica no epitélio durante a retocolite ulcerativa, o que contribui para o defeito na barreira. A IL-13, uma citocina chave na resposta efetora durante a retocolite ulcerativa, é um potente indutor da apoptose²⁰.

Em relação à susceptibilidade genética, diversos genes específicos ou não específicos parecem estar envolvidos no aparecimento e desenvolvimento da retocolite ulcerativa, podendo implicar em disfunção da barreira epitelial, apoptose, defeitos na regulação transcricional e na sinalização de IL-23, e envolvimento da resposta Th1 e Th17. Além disso, redução do receptor ativado de proliferação de peroxisomo (PPAR)- γ pelos colonócitos, anormalidades no muco e nas células T regulatórias podem contribuir para auto-imunidade seletiva e eventos imunes na patogênese da retocolite ulcerativa (figura 5)¹⁷.

O tratamento medicamentoso para retocolite ulcerativa, nos diferentes estágios inclui: sulfasalazina via oral, medicação intravenosa a base de corticóides, agentes antiespasmódicos, e até mesmo terapia imunossupressora, composta por ciclosporina, tacrolimus e azatioprina. Como prognóstico da retocolite ulcerativa, aproximadamente 25 a 40% dos pacientes com a forma grave da doença, são submetidos à colectomia. Também é recomendado uma vigilância colonoscópica para detecção de possíveis displasias, no período superior a 8 anos após o diagnóstico²¹.

A retocolite ulcerativa está associada com uma desregulação da resposta imune contra a microbiota intestinal. A microbiota intestinal comensal leva a uma inflamação crônica causada pela desregulação da resposta das células da imunidade inata e células T²².

Resposta imune humoral anormal pode ser observada na retocolite ulcerativa. Aumento de IgM, IgA e IgG é comum. Auto-imunidade pode levar ao aumento de IgG1 contra antígenos do epitélio colônico, levando ao dano tecidual¹⁷.

Na resposta imune inata, macrófagos e células dendríticas estão aumentados na lâmina própria em decorrência da retocolite ulcerativa. Ocorre aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF) derivadas dessas células. Moléculas pró-inflamatórias são preferencialmente produzidas por monócitos e células polimorfonucleares que migraram para o sítio inflamatório pela presença de moléculas de adesão, e não pelos macrófagos residentes¹⁶. Moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, são necessárias para que células circulantes sejam capazes de se ligar ao endotélio ativado, que é um dos passos para a migração de células mono e polimorfonucleares para o sítio inflamatório¹⁶.

Receptores do tipo toll (*toll like receptors* – TLR) são expressos na superfície de várias células efetoras da resposta imune inata. Antígenos microbianos se ligam seletivamente a esses receptores que iniciam a sinalização via fator nuclear κ B (NF κ B). Embora cada tipo de TLR se ligue a um adjuvante microbiano específico (por exemplo, TLR4 se liga a lipopolissacarídeos – LPS), esses sinais convergem na resposta via MyD88,

que ativa o NFκB. A ativação do NFκB leva a ativação de diversos fatores pró-inflamatórios que atuarão na patogênese da retocolite ulcerativa¹⁶.

Além dos TLR, os receptores NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), outro tipo de receptor de reconhecimento padrão, estão envolvidos na retocolite ulcerativa. Os NOD são receptores intracelulares que podem desencadear vias semelhantes às dependentes de NF-κB. O dipeptídeo microbiano muramil, o menor componente bioativo do peptídeoglicano, componente de todas bactérias, tem sido identificado como ligante específico para o NOD2. Mutações no gene de NOD2, localizado no cromossomo 16q12, tem sido associadas com a retocolite ulcerativa. Especificamente, acredita-se que mutações no NOD2 são capazes de alterar a susceptibilidade e localização da doença²³.

O papel da resposta imune adaptativa na retocolite ulcerativa é mais controverso. Alguns estudos demonstram que o perfil de citocinas apresentados pelos pacientes com retocolite ulcerativa é o da resposta imunológica do tipo Th2^{8, 16, 24}, sustentado pelos baixos níveis de transcrição da citocina IL-12 na mucosa intestinal²⁴. Contudo, na lâmina própria dos pacientes com retocolite ulcerativa, encontra-se uma maior produção de IL-5, mas não de IL-4, o que seria esperado para uma resposta de perfil Th2^{24, 25}. Outros estudos, também atribuem à retocolite ulcerativa um perfil inflamatório do tipo Th1, sugerindo que a retocolite ulcerativa seja resultante do desenvolvimento e manutenção desta resposta, com a presença de células Th1 nas lesões intestinais, e que a doença pode ser prevenida pelo tratamento com anticorpos anti-IFNγ e anti-TNF^{26, 27}.

Danese e Fiocchi publicaram uma revisão em 2011 na qual exploram conceitos atuais relacionados à patogênese da retocolite ulcerativa¹⁷ (figura 5). Glicolípídeos de células epiteliais e bactérias induzem regulação positiva do receptor $\alpha 2$ de IL-13 nas células T *natural killer* da mucosa. A IL-13 atua de forma autócrina ativando essas células, que se expandem e aumentam a citotoxicidade das células *natural killer* mediadas por IL-13, criando um ciclo, e levando à disfunção da barreira epitelial. Isso leva ao aumento da absorção de produtos bacterianos e geração de anticorpos antibacterianos. O dano às células epiteliais induz a produção de anticorpos anti-tropomiosina pelas células B enquanto proteínas nucleares dos neutrófilos induzem a produção de anticorpos citoplasmáticos anti-neutrofílico perinuclear (*perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies* - pANCA).

Em adição às células Th1 e Th17, ocorre um aumento no número de células Th2 produtoras de IL-13 que continuam a gerar disfunção da barreira epitelial, resultando em um aumento de permeabilidade intestinal e produção de IL-5, que pode contribuir para o recrutamento e ativação de eosinófilos. O aumento da absorção de produtos bacterianos também estimula células dendríticas e macrófagos, resultando em produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Células ativadas por IL-1 secretam peptídeo ativador de neutrófilos epiteliais (ENA) e IL-8, que recrutam neutrófilos, bem como proteína quimioatrativa de monócitos (MCP1/CCL2), que atraem macrófagos ativados e RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*), que atraem e recrutam células T auxiliares¹⁷.

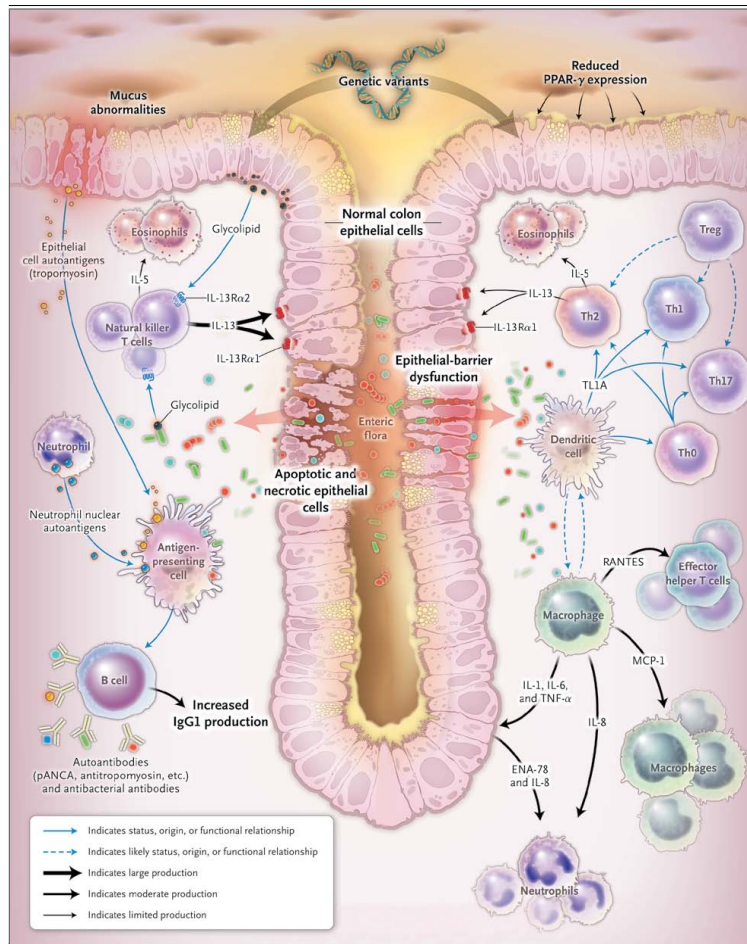


Figura 5: Conceitos atuais relacionados à colite ulcerativa, com envolvimento de células natural killer, macrófagos e neutrófilos, da citocina IL-13, da ativação de células T em Th1, Th2 e Th17, bem como a disfunção da barreira epitelial¹⁷.

Modelos experimentais de colite

Modelos experimentais são importantes para melhor compreensão da patogênese e mecanismos inflamatórios da retocolite ulcerativa. Esses modelos são divididos em dois grandes grupos: modelos que levam ao desenvolvimento espontâneo da doença e os que necessitam de indução. A colite pode ser induzida em camundongos por meio de: modificação genética, como os animais deficientes para o gene IL-10; tratamento com agentes farmacológicos, como o sulfato de sódio dextrano (DSS) ou o ácido sulfônico

trinitrobenzeno (TNBS); ou pela transferência de células regulatórias em hospedeiro gravemente linfopênico em populações de células T¹⁶.

A colite induzida por DSS causa uma mudança na população da microbiota intestinal, notando-se um aumento de bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas^{28, 29}. Nessa, as lesões predominam no lado esquerdo do intestino grosso (cólon descendente e sigmoide) e no cólon transversal e são observados cólons menores, baço aumentado, infiltração grave de células inflamatórias incluindo linfócitos T e macrófagos^{28, 29}. O mecanismo pelo qual o DSS induz colite ainda não é completamente conhecido, mas acredita-se que seja devido à função inapropriada de macrófagos pela captação do DSS, a alterações da população de bactérias luminiais e a efeitos tóxicos no epitélio do intestino, afetando a estabilidade da barreira intestinal como um todo e diminuindo a produção de muco²⁹. A colite induzida por DSS apresenta manifestações clínicas semelhantes às aquelas apresentadas por pacientes com retocolite ulcerativa, tais como perda de peso, diarreia com sangue e encurtamento do cólon^{19, 30}. Histopatologicamente, é observado infiltrado inflamatório, aumento da apoptose celular e ulcerações na mucosa colônica²⁹.

A colite crônica experimental pode ser induzida pela administração intermitente de DSS, em 2-3 ciclos de oferecimento do fármaco, com intervalos com administração apenas de água²⁸. A inflamação crônica é marcada por aumento de leucócitos e citocinas no plasma, um infiltrado celular rico em macrófagos, linfócitos e agregados linfóides na lâmina própria e serosa^{31, 32}, bem como aumento da produção de citocinas inflamatórias tanto da resposta Th1 quanto Th2 no cólon³³.

Fatores de risco ambientais - Dieta hiperlipídica

Estudos têm associado fatores ambientais com a retocolite ulcerativa. Esses fatores incluem tabagismo (fator protetor no caso da retocolite ulcerativa, mas prejudicial no caso de doença de Cronh), uso de antibióticos e drogas anti-inflamatórias não esteroides, estresse, infecção e dieta^{8, 10, 34, 35}. Os mecanismos pelos quais esses fatores desencadeiam o aparecimento da doença ou a reativam não são bem compreendidos. De forma geral, acredita-se que esses fatores alteram a integridade da barreira da mucosa, as respostas imunes ou o ambiente luminal, tendo cada um deles um impacto sobre a susceptibilidade à inflamação³⁴.

Infecções podem iniciar uma inflamação inespecífica por quebrar a barreira de mucosa e ativar a resposta imune inata, levando a uma maior captação de antígenos bacterianos que estimulam resposta por células T prolongada em hospedeiros geneticamente susceptíveis³⁴, além de aumentar a produção de citocinas inflamatórias e o tráfego de células para o sítio de inflamação intestinal¹⁰.

Acredita-se que drogas anti-inflamatórias não esteroides agem por inibição de prostaglandinas protetoras e por desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial nos enterócitos no intestino delgado. A depleção intracelular de adenosina trifosfato (ATP) pode levar a perda do controle do citoesqueleto sobre as junções firmes e aumentar a permeabilidade intestinal e levar à quebra na barreira de mucosa¹⁰.

O estresse psicológico leva à sinalização através do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal e do sistema nervoso autônomo que culmina em resposta

imune e inflamação¹⁰. Além de levar ao aumento de mediadores pró-inflamatórios, o estresse pode aumentar a permeabilidade intestinal^{10, 34}. Entretanto, é difícil definir estresse. Ativação de resposta ao estresse é altamente dependente da percepção do paciente desse estresse¹⁰.

O tabagismo é talvez o fator ambiental mais amplamente documentado nas DII, mas seu efeito oposto na retocolite ulcerativa e doença de Crohn não é bem compreendido. A nicotina, o monóxido de carbono e a hipóxia já foram sugeridos como mediadores dos efeitos do fumo³⁴.

A dieta é particularmente importante no desenvolvimento e progressão da doença. Certos tipos de nutrientes têm se mostrado benéficos ou prejudiciais para os pacientes de DII, levando à necessidade do desenvolvimento de dietas individualizadas. Por exemplo, dietas ricas em sacarose, carboidratos refinados e ácidos graxos poli-insaturados ω -6 podem levar ao aumento do risco para DII¹⁰. O ácido linoléico (ácido graxo poli-insaturado ω -6) pode ser metabolizado em ácido araquidônico e seus metabólitos eicosanoides que são naturalmente pró-inflamatórios e estão aumentados na mucosa de pacientes com retocolite ulcerativa³⁶. Por outro lado, suplementação com ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, tem se mostrado benéfica na prevenção da colite em modelos experimentais³⁷. Além disso, dietas ricas em frutas, vegetais, peixe e fibras dietéticas também parecem ter efeito protetor sobre as DII³⁸.

Estudos mostram que dietas hiperlipídicas aumentam o risco de desenvolvimento de retocolite ulcerativa^{39, 40}. Ambos estudos experimentais e clínicos levantam a interessante questão se é o consumo aumentado de gorduras em geral ou certo tipo específico de gordura que induzem reação

inflamatória intestinal⁴⁰, mas esses estudos diferenciando os tipos de gordura, ainda são escassos. Em adição, a dieta hiperlipídica pode também alterar o metabolismo de outros tecidos, como o tecido adiposo, levando ao desenvolvimento de obesidade⁴¹.

Tecido adiposo

O tecido adiposo é dividido em dois tipos: o tecido adiposo marrom, que é utilizado para geração de calor, e o tecido adiposo branco (chamado de amarelo em humanos), que é usado como armazenamento de energia⁴². É composto por adipócitos e por uma fração estromavascular de células, que consiste de diversa população de leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e estromais e pré-adipócitos⁴³.

Em relação às células imunes presentes no estromavascular, é observada a presença de macrófagos, que são ativados pela via alternativa e apresentam fenótipo anti-inflamatório, e linfócitos T auxiliares do tipo Th2⁴⁴⁻⁴⁶ (figura 6).

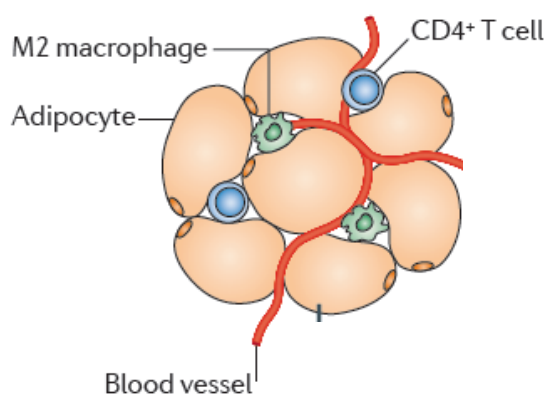


Figura 6: Células do tecido adiposo. Tecido adiposo composto de adipócitos, células do sistema imune: macrófagos M2 e linfócitos T auxiliares (CD4+) do tipo Th2 e vasos sanguíneos; adaptado de Ouchi et al⁴⁷.

O tecido adiposo é o maior órgão de estoque energético do corpo. Mais de 95% dos lipídeos do corpo são encontrados no tecido adiposo armazenado sob a forma de triacilgliceróis, com menores quantidades armazenadas em outros tecidos como músculo e fígado. Menos de 0,1% dos lipídeos do corpo estão no plasma⁴⁸.

A maioria da energia armazenada é derivada de triglicerídeos ingeridos que aparecem na circulação incorporados aos quilomícrons e dos ácidos graxos sintetizados no fígado e no tecido adiposo via lipogênese a partir de substratos não lipídicos, como carboidratos. Entre as refeições, para satisfazer as necessidades energéticas de outros órgãos, os estoques de triacilgliceróis são mobilizados do tecido adiposo pela lipólise, no qual esses são transformados em ácidos graxos e glicerol. Assim que deixam os adipócitos, os ácidos graxos livres circulam no plasma ligados à albumina plasmática para serem utilizados principalmente como energia pelos tecidos corporais^{48, 49}.

Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo não é apenas um órgão de armazenamento de energia, e estudos mais detalhados desse tecido descobriram diversas funções como seu envolvimento na resposta imune, inflamação e metabolismo⁴².

O tecido adiposo é considerado como estrutura endócrina, com secreção de diversos fatores, como leptina, adiponectina, resistina, TNF e IL-6, e quimiocinas, como MCP-1/CCL2⁴².

A leptina foi descrita primeiramente em 1994, é produzida pela transcrição do gene *obese (Ob)*⁵⁰ e apresenta um papel chave na homeostase energética pela regulação do apetite em níveis hipotalâmicos^{42, 50, 51}. É responsável por enviar sinais para o hipotálamo sobre a quantidade de

reservas energéticas no tecido adiposo no organismo. Se há um balanço energético positivo com aumento da massa adiposa, o hipotálamo atua inibindo o apetite e aumentando o gasto energético via indução de uma maior taxa de oxidação lipídica. No passado, considerava-se que a leptina atuava principalmente por meio do seu receptor no hipotálamo⁵². Entretanto, estudos mais recentes demonstram que o receptor de leptina também está presente em muitos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo⁵² e intestino⁵³.

Além de exercer um papel metabólico importante, a leptina também interfere no sistema imune. Várias células envolvidas com as respostas imunológicas, dentre elas os neutrófilos, monócitos e linfócitos apresentam receptores para esse hormônio. Os efeitos imunológicos da leptina são pró-inflamatórios, promovendo respostas específicas de células Th1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, a IL-2 e a IL-6. Em contrapartida, a leptina é regulada por estes sinais pró-inflamatórios⁵⁴.

A sinalização da leptina ocorre pela ligação com seu receptor (Ob-R). O gene para o Ob-R codifica 5 formas diferentes do receptor de leptina: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd e Ob-Re. O Ob-Rb é a forma longa do receptor de leptina (também conhecido como Ob-RL) e tem uma longa parte citoplasmática que contém diversas regiões requeridas para a transdução de sinais. É encontrado principalmente no hipotálamo, mas também em órgãos periféricos como tecido adiposo, intestino e células sanguíneas mononucleares. Em comparação à forma longa do receptor de leptina (Ob-Rb), as outras quatro formas do receptor aparecem em menores concentrações⁵⁵. O Ob-R é membro dos receptores de citocinas classe 1, e, assim como eles, não apresenta atividade tirosina quinase intrínseca, sendo necessário o recrutamento das

quinases associadas à ativação de receptor da família Janus (JAK)^{51, 55} (figura 7).

Quando a JAK2 se liga ao Ob-R, ela é ativada e se autofosforila, fosforilando, em seguida, o Ob-R, que então recruta transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT) ⁵¹. A STAT3 se torna fosforilada, dimeriza e transloca do citoplasma para o núcleo, onde se liga a genes específicos^{51, 55}. A sinalização da leptina também estimula o sinal de supressão de citocinas 3 (SOCS3), que age como um controlador negativo da via JAK2-STAT3⁵¹.

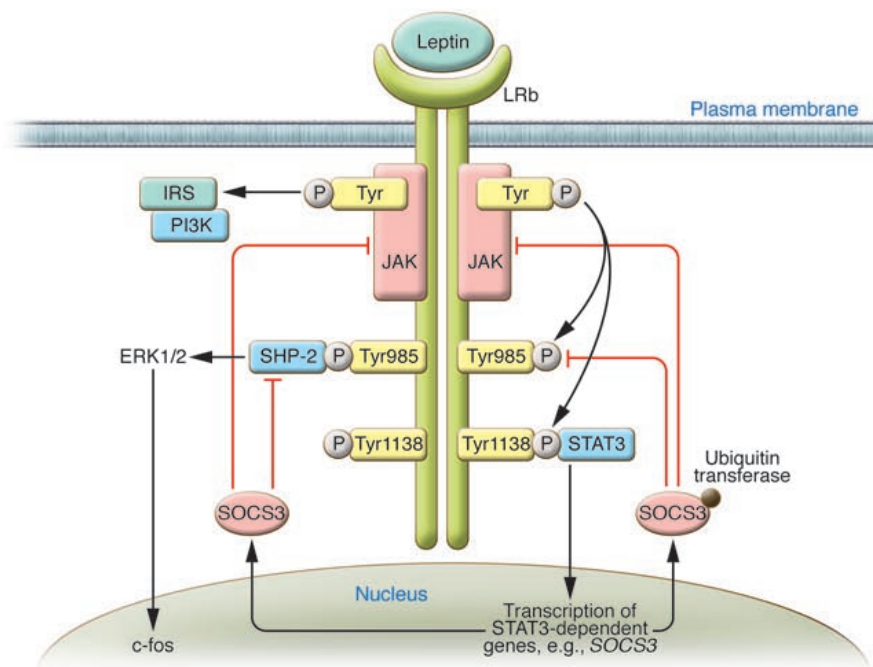


Figura 7: Via de sinalização da leptina. A leptina se liga ao seu receptor Ob-Rb e ativa a via JAK2-STAT3, principalmente. Outras vias, como a da PI3K e ERK/MAPK também podem ser ativadas. LRb: receptor de leptina B; JAK: receptor da família Janus 2; STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; SOCS3: sinal de supressão de citocinas 3; PI3K: fosfatidil-inositol 3 quinase; IRS: substrato do receptor de insulina; SHIP: inositol fosfatase contendo domínio SH; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; Tyr: tirosina⁵⁶.

Apesar da via JAK2-STAT3 ser a mais descrita, a leptina também pode ativar outras vias como a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinases/Extracellular signal-regulated kinases*)

(figura 7), AMPK (*AMP-activated protein kinase*) e mTOR (*mammalian target of rapamycin*)⁵¹.

Além da leptina, outras adipocinas importantes são produzidas pelo tecido adiposo, como a adiponectina e a resistina⁵⁵. A adiponectina foi descrita primeiramente em 1995, é considerada como a proteína mais abundante produzida pelo tecido adiposo⁵⁷. Ela é capaz de interagir com células imunes, como macrófagos, onde suprime a produção e secreção de TNF e IL-6 e com monócitos, aumentando sua produção de citocinas anti-inflamatórias⁵⁸. Os níveis de adiponectina relacionam-se inversamente com o diabetes melitos tipo 2. Ela melhora a sensibilidade à insulina, oxidação da gordura muscular e dissipação energética^{59, 60}. A ação sobre a sensibilidade à insulina da adiponectina pode envolver a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), conhecida por regular a concentração celular de malonil-CoA e também por regular a produção de glicose no fígado, pela diminuição da expressão de enzimas da neoglicogênese^{55, 57, 61}. Os receptores da adiponectina se dividem em AdipoR1 e AdipoR2 e são expressos no hipotálamo, bem como em órgãos periféricos como fígado e músculo esquelético⁵⁵.

Já a resistina é expressa em adipócitos de roedores e macrófagos de humanos e apresenta efeito contrário à adiponectina, apresentando um significativo papel na resistência insulínica relacionada à obesidade. Pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelulares pelos quais a resistina induz seus efeitos metabólicos, embora seu papel na regulação metabólica em vários órgãos e tecidos, como hipotálamo, adipócitos e fígado já tenham sido mostrados⁵⁵. Acredita-se que, assim como a adiponectina, a resistina age via

AMPK⁵⁵.

De forma geral, o metabolismo do tecido adiposo é altamente regulado por hormônios e outros fatores como a alimentação e o exercício. A integridade do processo de regulação do metabolismo do tecido adiposo é essencial para a manutenção da homeostase do peso corporal e a desregulação desse processo provavelmente tem um papel importante na obesidade, resistência insulínica e diabetes melitos tipo 2⁴⁸.

Obesidade

A obesidade e o sobrepeso são definidos como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura que apresenta um risco para a saúde. É diagnosticada pelo do Índice de Massa Corporal (IMC), que é o peso (em quilogramas) do indivíduo dividido pelo quadrado da sua altura (em metros). Pessoas com IMC entre 25-29,9kg/m² são geralmente consideradas com sobrepeso e pessoas com IMC igual ou superior a 30kg/m² são consideradas obesas⁶².

A obesidade é uma doença de distribuição mundial. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, cerca de 1,4 bilhões de pessoas adultas apresentavam sobrepeso, sendo que desses, mais de 200 milhões de homens e próximo de 300 milhões de mulheres apresentavam obesidade. Em 2010, mais de 40 milhões de crianças menores de 5 anos estavam com sobrepeso⁶³.

No Brasil, pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em 2011, mostrou que 49% da população brasileira apresenta sobrepeso e 16%, obesidade. A situação é ainda mais preocupante quando avalia-se a evolução

do sobrepeso e obesidade ao longo dos anos (2006 – sobrepeso: 43% e obesidade: 11%), sendo observado aumento dessas no decorrer do tempo⁶⁴.

Além de ser, por si só, um problema de saúde pública mundial, a obesidade é fator de risco para diversas doenças como: diabetes melitos tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, apneia obstrutiva do sono, refluxo gastroesofágico, desordens músculo-esqueléticas e variados tipos de câncer⁶⁵.

A obesidade é uma doença multifatorial, com baixo grau de inflamação, que envolve fatores genéticos, endócrinos e comportamentais. Dentre os comportamentais, destacam-se a ingestão excessiva de dietas ricas em gorduras e açúcares e o baixo nível de atividade física⁶⁶.

O consumo de ácidos graxos pode afetar o processo inflamatório via modulação da atividade de fatores de transcrição envolvidos na inflamação, como NFκB e PPARγ⁶⁷. Existe uma interação entre esses fatores de transcrição, visto que o PPARγ inibe a ativação do NFκB. Entre os ácidos graxos incluem-se os saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e trans, cada um apresentando seu papel na inflamação derivada da obesidade⁶⁷.

Estudos *in vitro* mostraram que os ácidos graxos saturados promovem processo inflamatório⁶⁷, com aumento da expressão de IL-6 e TNF⁶⁸, de TLR-4⁶⁹ e conseqüente aumento da ativação de NFκB^{68, 69} (figura 8). Em humanos, a ingestão de ácidos graxos saturados também foi associada à concentração de IL-6, em indivíduos obesos⁷⁰. Em estudos experimentais, a dieta hiperlipídica rica em gordura saturada causa obesidade, com aumento de peso corporal, adiposidade e marcadores inflamatórios⁷¹.

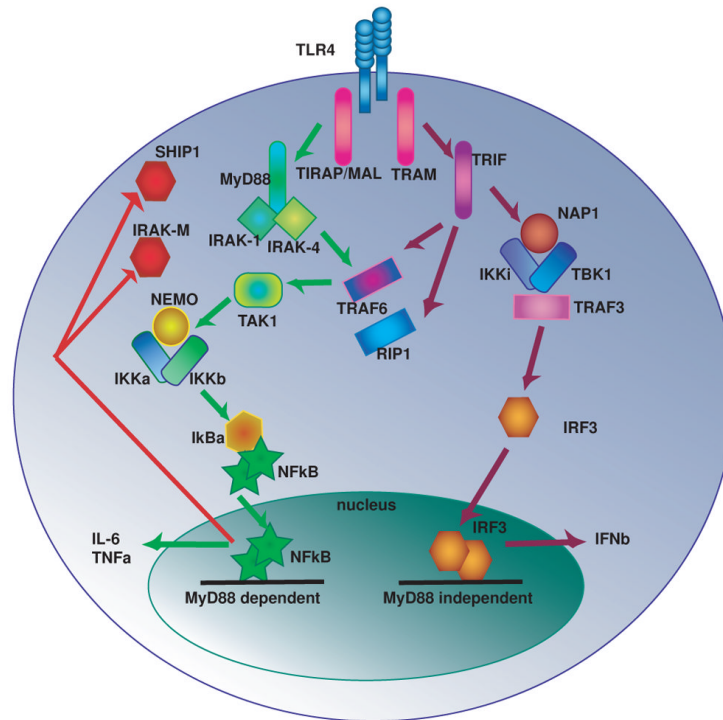


Figura 8: Via de sinalização do TLR4. O TLR4 pode ser ativado por lipossacarídeos (LPS) e ácidos graxos. Sua via pode ser dependente ou independente de MyD88, culminando na ativação do fator de transcrição NFκB, que ativa vias inflamatórias⁷².

O consumo excessivo de ácidos graxos saturados também é altamente associado com a síndrome metabólica⁴¹, que é um conjunto de risco para doenças cardiovasculares e resistência insulínica (que culmina no diabetes melitos tipo 2) relacionado à obesidade, dislipidemias e hipertensão⁷³. Além disso, obesidade abdominal, acúmulo ectópico de gordura e esteatose são incluídas nas complicações metabólicas da obesidade⁷⁴.

De forma geral, o consumo calórico excessivo ocasiona um aumento do acúmulo de triglicédeos nos adipócitos (hipertrofia) e, em algumas situações, em número (hiperplasia) dos adipócitos, gerando uma disfunção nestes. Os adipócitos hipertrofiados secretam agentes pró-inflamatórios promovendo uma inflamação sistêmica de baixo grau⁴¹.

Obesidade e inflamação no tecido adiposo

Como dito anteriormente, o tecido adiposo não é composto somente por adipócitos, mas também por uma fração estromovascular de células (linfócitos, fibroblastos, células endoteliais e estromais e pré-adipócitos) que, juntamente com os adipócitos, servem como uma grande fonte de citocinas, adipocinas e moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1)⁴³.

Os adipócitos possuem propriedades inflamatórias significativas e são sensíveis a sinais inflamatórios mediados por citocinas, como IL-1 β , IL-4, IL-6 e IFN γ e por receptores, como o receptor tipo *toll* 4 (TLR4). Na obesidade, ocorre a estimulação desses receptores que ativam inúmeros sinais de transdução da cascata inflamatória, como a via do NF κ B, levando a uma alteração do perfil inflamatório do tecido adiposo. Ocorre aumento da expressão e secreção de diversas proteínas de fase aguda e mediadores da inflamação, incluindo TNF, IL-1 β , IL-6, MCP-1/CCL2, leptina e resistina. Por outro lado, ocorre diminuição de adipocinas e citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina e a IL-10⁷⁵. Dessa forma, o aumento do tecido adiposo na obesidade contribui diretamente para o aumento da inflamação sistêmica⁷⁶.

Obesidade e células imunes

Diversos tipos de células do sistema imune inato estão envolvidas no desenvolvimento da inflamação no tecido adiposo. O tipo celular mais estudado é o macrófago. De fato, a inflamação do tecido adiposo na obesidade é

caracterizada pela infiltração de macrófagos. Os macrófagos do tecido adiposo são classificados em dois tipos principais, baseado em marcadores de superfície e seu perfil de citocinas. Os macrófagos M1, ou classicamente ativados, apresentam um perfil de citocinas pró-inflamatórias que incluem TNF, IL-1 e IL-6, e são estimulados por IFN γ . Os macrófagos do tipo M2, ou alternativamente ativados, expressam fatores anti-inflamatórios, como IL-10, IL-4, antagonista do receptor de IL-1 e TGF β , e são ativados por IL-4 e IL-13. A obesidade induz uma alteração da população de macrófagos M2 para M1 (figura 9), caracterizada por diminuição na produção de IL-10 e aumento de TNF. Essa alteração de M2 para M1 é mediada por ligantes de TLR4, como ácidos graxos saturados, que ativam a via do NF- κ B, levando ao aumento da produção de citocinas inflamatórias como TNF e IL-6, direcionando para o fenótipo M1. Além disso, macrófagos M1 também são recrutados dos vasos sanguíneos. Esse recrutamento ocorre porque o tecido adiposo obeso expressa altos níveis de quimiocinas como MCP-1/CCL2, proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1, receptores de quimiocinas *C-C-motif* (CCR) como CCR2 e CCR5 e moléculas de adesão, como VCAM1⁴⁴.

Enquanto o papel dos macrófagos é bem estudado na obesidade, o papel de outras células ainda precisa ser elucidado. Por exemplo, sabe-se que na obesidade ocorre infiltração de neutrófilos⁷⁷ e mastócitos⁷⁸ para o tecido adiposo, mas a exata função dessas células na modulação da inflamação adiposa ainda não é esclarecida⁴⁴.

Células da resposta imune adaptativa também estão envolvidas na inflamação do tecido adiposo vista na obesidade⁴⁴. No tecido adiposo de animais com obesidade induzida por dieta é observado infiltração de linfócitos

T para o tecido adiposo visceral, coincidindo com desenvolvimento de resistência insulínica⁷⁹. Ocorre ainda aumento de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) em detrimento dos do tipo Th2, promovendo secreção de IFN γ pelo tecido adiposo⁸⁰. Além disso, é observado aumento de linfócitos T citotóxicos CD8+⁸¹ e diminuição de linfócitos T reguladores⁸² (figura 9). Interessantemente, essas alterações no perfil de linfócitos precedem à infiltração de macrófagos para o tecido adiposo⁴⁴.

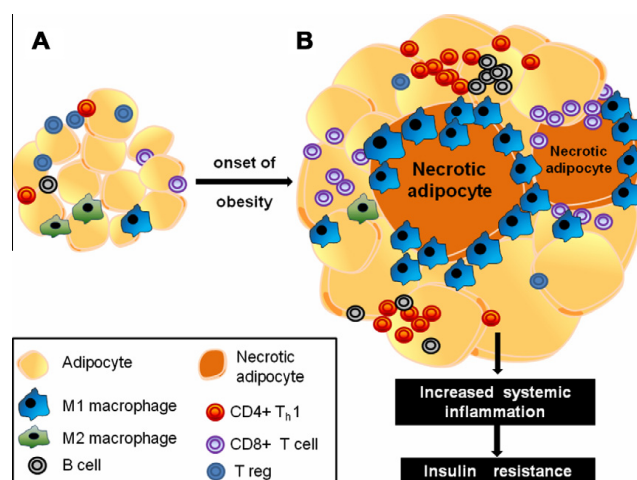


Figura 9: Mudanças na população de células imunes no tecido adiposo durante a obesidade. O tecido adiposo magro contém maiores quantidades de macrófagos M2, em relação aos M1. Também contém um grande número de células T regulatórias. A hipertrofia dos adipócitos e a obesidade leva à morte dos adipócitos e aumento do número de macrófagos pró-inflamatórios M1. Também ocorre aumento de células B, células T auxiliares CD4+ e células T citotóxicas CD8+. Essa mudança no perfil imune aumenta a secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo e aumenta a inflamação sistêmica, o que pode levar à resistência insulínica⁴⁴.

Resumindo, no tecido adiposo de indivíduos obesos ocorre uma alteração do perfil imunológico⁴⁴⁻⁴⁶. Em relação à imunidade inata ocorre aumento da expressão e ativação de TLR4, levando à ativação da via do NF κ B e da produção de citocinas inflamatórias⁴⁶. Ocorre também influxo de células da resposta imune adaptativa, como linfócito T citotóxicos CD8+ e linfócitos Th1. Esses produzem citocinas e quimiocinas que atraem os macrófagos do

tipo M1, levando ao influxo desses para o tecido adiposo. Os macrófagos M1 passam, então, a também secretar citocinas inflamatórias, como TNF e IL-6^{45, 46, 83}. O aumento na secreção de TNF pode estimular os pré-adipócitos a produzirem MCP-1/CCL2 e então, atrair mais macrófagos para o tecido⁸⁴. O aumento da infiltração de macrófagos, linfócitos, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 ativam vias inflamatórias intracelulares nas células vizinhas, gerando uma inflamação generalizada de de baixo grau. Essa situação pode culminar na morte dos adipócitos e, em torno desses, acumulam-se macrófagos M1, formando estruturas tipo coroa (figura 9).

Obesidade, microbiota e permeabilidade intestinal

Evidências recentes sugerem que trilhões de bactérias que normalmente residem no trato gastrointestinal (microbiota intestinal) afetam a aquisição de nutrientes e a regulação energética; também é sugerido que pessoas magras e obesas possuem microbiotas intestinais diferentes. Isso possibilita uma hipótese de que a microbiota intestinal apresente um papel importante na regulação do peso corporal e tenha algum efeito no desenvolvimento da obesidade^{65, 85}. Essa hipótese foi pesquisada em animais sem germes (sem microbiota intestinal), e foi verificado que esses animais apresentavam peso corporal 40% menores comparados aos animais que apresentavam microbiota normal⁸⁶. Diversos mecanismos foram propostos para essa observação⁸⁵. Uma hipótese é o aumento da extração energética de compostos não digeríveis (fibras alimentares), que são diretamente fermentados em ácidos graxos de cadeia curta e eventualmente participam da lipogênese de novo no fígado⁸⁷.

Outra hipótese é que os camundongos sem microbiota são resistentes à obesidade induzida por dieta hiperlipídica pois a microbiota intestinal suprime a oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo esquelético direcionada pela quinase dependente de AMP (AMPK)⁸⁸.

Uma outra hipótese aponta para o papel de fatores pró-inflamatórios levando a uma endotoxemia metabólica⁸⁵. Experimentos sugerem que bactérias intestinais podem iniciar o processo inflamatório associado à obesidade por modulação dos níveis de LPS plasmáticos⁸⁹ (figura 10). Segundo essa hipótese, alterações genéticas e nutricionais (como uma dieta rica em lipídeos), levam a mudanças na composição da microbiota intestinal (disbiose), que gera uma alteração da barreira de mucosa e consequente aumento da permeabilidade intestinal por alterar a distribuição das proteínas das junções firmes, como ZO-1 e ocludina. Isso leva ao aumento de LPS circulante, gerando uma endotoxemia metabólica e culminando no aumento de sinais pró-inflamatórios⁸⁵.

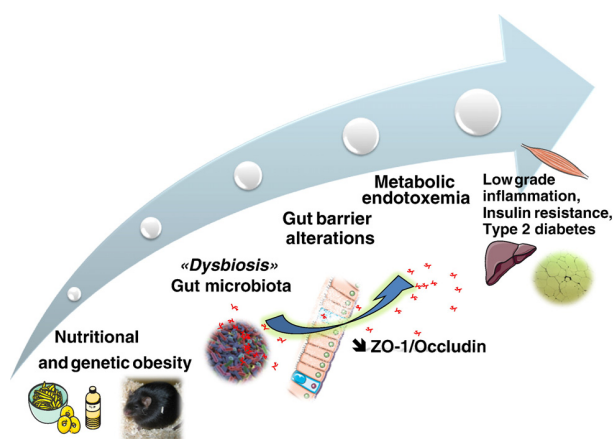


Figura 10: Modelo de envolvimento da microbiota intestinal nas desordens metabólicas associadas à obesidade. Fatores nutricionais e genéticos levam a uma alteração da composição da microbiota intestinal, que leva à alterações na permeabilidade intestinal. Isso leva a endotoxemia metabólica e consequentemente aumento da inflamação⁸⁵.

Modelos experimentais de obesidade

Modelos experimentais são usados na tentativa de melhor compreender os elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e suas complicações. De forma geral, podemos dividir os modelos experimentais de obesidade em genéticos e induzidos.

Diversos são os modelos com modificação genética para a indução de distúrbios relacionados à obesidade. Os camundongos com mutação no gene para leptina, *ob/ob*⁹⁰, e no gene para o receptor de leptina, *db/db*⁹¹, apresentam obesidade precoce, com gasto energético e crescimento linear diminuído, além de apresentar infertilidade. Os camundongos da espécie *Tubby*⁹² se caracterizam pela resistência insulínica e obesidade enquanto os *Agouti*⁹³ apresentam excesso de peso, diabetes tipo 2 e hiperleptinemia. Os camundongos *KK/Ta*, já reconhecidos como modelo de obesidade e hiperinsulinemia, apresentam aumento na adiposidade visceral, inflamação e resistência insulínica, quando alimentados com dieta hiperlipídica⁹⁴. Em relação aos ratos, a espécie *Zucker (fa/fa)*⁹⁵, apresenta hiperfagia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia. Porém, embora mutações genéticas acarretem desenvolvimento de obesidade em animais, elas são raras em humanos^{96, 97}.

Uma dieta hiperlipídica pode induzir obesidade e distúrbios metabólicos em roedores que lembram a síndrome metabólica humana. O modelo de obesidade induzida por dieta é preferível em detrimento dos modelos com alterações genéticas, visto que é necessário que o modelo animal apresente não apenas o fenótipo, como também a patogênese semelhante à doença humana⁹⁸. Buettner e colaboradores mostram em uma revisão sobre modelos

animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica que camundongos C57BL/6 são susceptíveis a esse tipo de indução e que a banha pode ser utilizada como fonte de lipídeos de forma eficiente⁹⁸.

Obesidade e colite

Tanto a retocolite ulcerativa quanto a obesidade apresentam importante papel inflamatório, com ação de células imunes e secreção de citocinas inflamatórias^{17, 75}.

Um estudo realizado em crianças com sobrepeso e obesidade mostrou que 30,1% dessas apresentavam retocolite ulcerativa ou colite indeterminada⁹⁹. Alguns estudos começam a serem feitos com o objetivo de relacionar a fisiopatologia dessas duas doenças^{28, 100, 101}.

Siegmund e colaboradores avaliaram a ação da leptina na colite experimental¹⁰¹. Nesse trabalho, foi observado que a leptina é capaz de estimular, *in vitro*, linfócitos intraepiteliais e células mononucleares da lâmina própria do cólon de animais saudáveis, com aumento de IL-18 e ativação da STAT3 nessas células (importante na via da leptina visto que a ligação da leptina ao Ob-Rb ativa a fosforilação da STAT3 – figura 7). Também foi avaliada a colite induzida por DSS em animais com ausência de leptina (*Ob/Ob*), e foi observada melhora no escore histopatológico do cólon desses animais, quando comparado aos animais selvagens com colite. Quando a leptina era repostada nos animais *ob/ob* com colite induzida por DSS, foi observada piora no escore histopatológico no cólon, ficando equivalente aos animais selvagens com colite, sugerindo o papel da leptina na inflamação no

cólon. Resultados semelhantes foram observados quando foi induzida a colite crônica em animais selvagens e animais *ob/ob*¹⁰¹.

Esses mesmos pesquisadores, usando camundongos nocaute para o gene da leptina (*ob/ob*) e da IL-10 (IL10^{-/-}), que desenvolvem obesidade e colite, respectivamente, observaram piora no escore histológico do cólon, com aumento na produção da citocina inflamatória IFN γ e apoptose no cólon dos animais duplo nocaute, quando comparados com os animais IL10^{-/-}, sugerindo que a leptina modula a sobrevivência de leucócitos intestinais¹⁰⁰. Considerando esses dois trabalhos do mesmo grupo, observamos um papel controverso da leptina em diferentes modelos experimentais de colite.

Em estudo *in vitro*, foi observado que a leptina diminui a proliferação de células Th2, entretanto modula a sobrevivência de células Th1. Assim como no trabalho de Siegmund e colaboradores¹⁰¹, esses autores observaram melhora no escore histopatológico do cólon dos animais *ob/ob* com colite, quando comparados aos animais selvagens e equivalência na gravidade da colite quando a leptina foi repostada, mesmo tendo usado outro indutor de colite (oxasolona/etanol), indicando, novamente, o papel pró-inflamatório da leptina na inflamação colônica¹⁰².

Li e colaboradores mostraram em seu estudo, no qual foi avaliado o tecido adiposo de animais com colite e o cólon de animais com obesidade, que houve aumento da concentração de IL-12 e IL-1 β no tecido adiposo de animais com colite e aumento da concentração dessas mesmas citocinas no cólon de animais obesos²⁸, sugerindo que ambas as doenças causam inflamação em outros órgãos, além dos diretamente envolvidos.

Em outro trabalho, foi avaliado o metabolismo do tecido adiposo mesentérico perigonadal em animais com colite induzida por TNBS. Foi observado aumento de leptina e TNF nesse tecido, com diminuição da expressão protéica de PPAR γ 2 e aumento da taxa de lipólise, mostrando a influência da colite no tecido adiposo mesentérico¹⁰³.

Em um estudo utilizando animais resistentes ou susceptíveis à dieta indutora de obesidade, com colite ulcerativa induzida por TNBS, foi observado aumento de leptina e adiponectina plasmática nos animais susceptíveis, bem como diminuição do dano macroscópico do tecido colônico quando comparados aos animais resistentes, sugerindo um efeito benéfico da leptina e da adiponectina na inflamação intestinal¹⁰⁴.

Em animais nocaute para o gene da adiponectina, os resultados também são controversos. Em dois trabalhos com esses animais (nocaute para adiponectina), ambos com colite induzida por DSS, os resultados encontrados foram opostos^{105, 106}. No primeiro, foi observado efeito protetor da adiponectina, visto que os animais nocaute apresentaram colite mais severa¹⁰⁵. Já no segundo trabalho, foi visto efeito deletério da adiponectina, sendo que os animais nocaute apresentaram melhora no escore histopatológico do cólon derivado da colite¹⁰⁶.

Outro trabalho mostrou o envolvimento do tecido adiposo na carcinogênese do cólon derivada da colite ulcerativa¹⁰⁷. Nesse estudo, foi observado aumento da leptina sérica e do mRNA para leptina e da proteína leptina no tecido adiposo epididimal nos animais que apresentavam carcinogênese derivada da colite, comparado aos animais normais, sugerindo um papel importante do tecido adiposo na inflamação no cólon¹⁰⁷.

Em mais um estudo sobre carcinogênese derivada da colite ulcerativa, foi observado que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica levou ao aumento da expressão proteica da via de sinalização insulínica e da quantidade de tumores no cólon, reforçando o papel da dieta hiperlipídica na inflamação no cólon¹⁰⁸.

Em estudos clínicos, têm sido observado a concentração sanguínea de adipocinas, como resistina, adiponectina e leptina, em pacientes com retocolite ulcerativa. Foi observado o aumento de resistina no plasma de indivíduos com retocolite ulcerativa e doença de Crohn¹⁰⁹. Em relação à adiponectina, assim como nos estudos experimentais^{105, 106} os resultados nos estudos clínicos também são controversos, sendo observado aumento^{110, 111} ou diminuição¹¹² de adiponectina sérica em indivíduos com retocolite ulcerativa. Já para a leptina, foi observado diminuição no soro de pacientes com retocolite ulcerativa¹¹⁰.

Tendo observado o papel da inflamação intestinal no desenvolvimento da obesidade, bem como o papel do tecido adiposo e seus produtos na colite e ainda o papel controverso das adipocinas leptina e adiponectina nas inflamações intestinais, é importante que se elucide o envolvimento desses tecidos quando ambas as doenças estão presentes, visto que a interação entre a colite e a obesidade induzida por dieta ainda não foi avaliada. Dessa forma, nossa pergunta nesse trabalho é se existe relação entre a inflamação decorrente da obesidade e da colite, e se elas, em conjunto, vão refletir de uma forma sistêmica.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

3. JUSTIFICATIVA

Como é sabido, as DII afetam cerca de dois milhões de pessoas no Estados Unidos. A retocolite ulcerativa está ligada ao aumento da produção de marcadores inflamatórios, incluindo interleucina (IL)-1, IL-6 e TNF. Esses marcadores também estão aumentados na obesidade, outra doença de distribuição mundial e que apresenta importante componente inflamatório. Ambas doenças são afetadas por fatores ambientais, como a dieta rica em lipídeos. Apesar disso, estudos que definem se é o consumo aumentado de gorduras em geral ou certo tipo específico de gorduras que induzem reação inflamatória intestinal ainda são escassos.

Diversos estudos estabeleceram a relação entre o ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica e marcadores inflamatórios como TNF, IL-6, IL-1 e leptina. Além disso, alguns estudos têm sugerido que adipocinas secretadas pelo tecido adiposo (leptina, resistina e adiponectina) estão intimamente associados à retocolite ulcerativa. Em adição, outros estudos mostram o aumento de citocinas pró-inflamatórias no intestino de animais obesos, bem como no tecido adiposo de animais com colite. Entretanto, estudos que demonstrem o perfil inflamatório em animais afetados por ambas doenças ainda não existem.

Sendo assim, é importante que se elucide a influência da inflamação do tecido adiposo derivado da obesidade induzida por dieta nas doenças inflamatórias intestinais e o perfil do tecido adiposo em indivíduos com colite crônica, avaliando as características inflamatórias de cada tecido envolvido, e se ocorrerá repercussão sistêmica.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a relação entre a colite crônica e a obesidade, levando em consideração os parâmetros inflamatórios de cada doença, utilizando animais C57BL/6 eutróficos ou com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, saudáveis ou portadores de colite crônica induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS).

Objetivos Específicos

- Comparar a evolução da obesidade pela evolução ponderal, percentual de adiposidade, consumo alimentar e análise histológica do tecido adiposo visceral em animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.
- Comparar a intensidade da colite crônica por meio de sinais clínico-histológicos como acompanhamento da evolução ponderal, consumo alimentar, presença de sangue nas fezes, peso relativo do baço, comprimento do cólon e morfometria do cólon em animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.
- Comparar o perfil lipídico e glicêmico dos animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.
- Avaliar o perfil de células do sistema imune no baço, linfonodo cecal, cólon e tecido adiposo epididimal dos animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.

Revisão Bibliográfica

- Comparar a expressão e concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória no tecido adiposo epididimal e colón dos animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.
- Avaliar a influência da obesidade na permeabilidade na mucosa intestinal e translocação bacteriana em animais com colite crônica.
- Avaliar o rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura *in vivo*, no tecido adiposo epididimal e no cólon dos animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.
- Avaliar a expressão de moléculas de adesão no tecido adiposo epididimal e de receptores relacionados à inflamação no tecido adiposo epididimal e no cólon dos animais obesos e não obesos portadores de colite crônica ou saudáveis.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de seis a oito semanas de idade, obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira, da mesma instituição. Os animais de todos os grupos tiveram livre acesso à dieta e água e foram mantidos em gaiolas coletivas (4-5 animais por gaiola), em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00) e temperatura controlada (24 a 26°C). Os animais foram mantidos em gaiolas de dimensões de 30x20x13cm para até 6 animais.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): protocolo de número 110/2010 (anexo 1).

5.2 Delineamento Experimental - Indução da Obesidade e da Colite Crônica

Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle: sem indução de colite crônica e com dieta comercial Labina®; Colite: com indução de colite crônica e com dieta comercial Labina®; DIO: sem indução de colite crônica e com dieta hiperlipídica indutora de obesidade; e Colite+DIO: com indução de colite crônica e com dieta hiperlipídica indutora de obesidade (figura 11).

Para indução da obesidade, os animais dos grupos DIO e Colite+DIO foram alimentados com dieta hiperlipídica indutora de obesidade (DIO), com 61% do fornecimento calórico em forma de gordura, durante 8 semanas⁹⁴. Os animais dos grupos Controle e Colite foram alimentados com dieta comercial padrão para roedores Labina®.

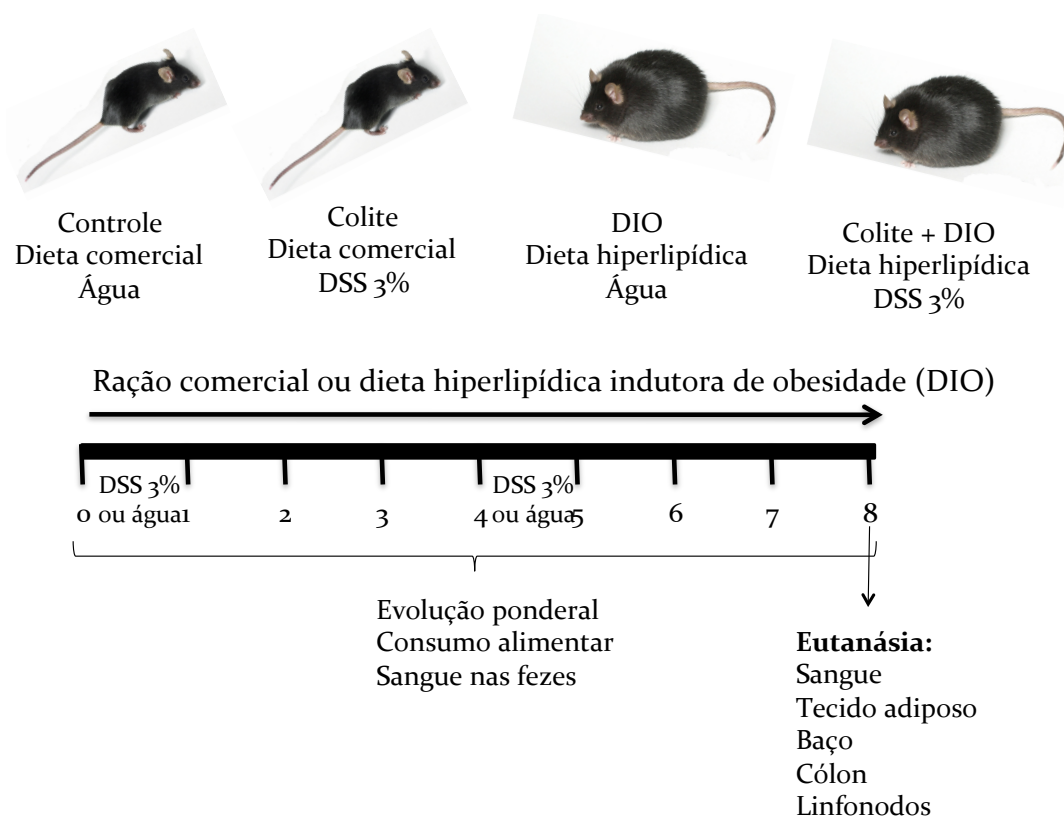


Figura 11: Desenho experimental

A dieta comercial para roedores Labina®, segundo o fornecedor, é composta de: milho integral moído, cloreto de sódio, aditivo antifúngico fungistático, cloreto de colina, premix vitamínico mineral, feno de alfafa, fosfato bicálcico, soja integral moída, calcário calcítico, farelo de soja, farelo de peixe, farelo de trigo, remoído de trigo e pode apresentar eventuais substitutivos.

A dieta indutora de obesidade é composta de, em percentual de gramas: amido de milho (5,9%), caseína (19,1%), óleo de soja (1,9%), celulose (4,8%), mistura de minerais (3,3%), mistura de vitaminas (1%), Metionina (0,3%), Bitartarato de colina (0,2%), hidroxitolueno butilado - BHT (0,0001%), banha de porco (33,9%), Groselha (29,6%).

A composição energética das dietas está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Composição Energética das Dietas

	Comercial^a	DIO
Carboidrato	50,3%	24,5%
Proteína	41,9%	14,5%
Gordura total	7,8%	61,0%
Calorias / g dieta	2,18kcal/g	5,21 kcal/g

^a Composição fornecida pelo fabricante da ração comercial Labina®

A indução da colite crônica foi realizada de forma concomitante com a indução da obesidade, baseada na metodologia de Okayasu e col.^{28, 29}. Para tal, dissolveu-se o sulfato de sódio dextrano (DSS, peso molecular 36,000-50,000, MP Biomedicals, Aurora, OH) na água a ser administrada aos animais na concentração de 3,0% (peso/volume). O DSS foi oferecido aos animais durante 5 dias, por 2 vezes, com intervalo de 21 dias. A indução da colite foi realizada na 1^a e na 5^a semana de experimento. Os animais sem indução de colite receberam água durante todo o período experimental. Após 8 semanas de experimento foi realizada a eutanásia, na qual os animais foram anestesiados intraperitonealmente para retirada de sangue, tecido adiposo, baço, linfonodos cecal e mesentéricos e cólon.

5.3 Evolução Ponderal, Consumo Alimentar e Hídrico

Para acompanhamento da evolução da colite, foram avaliados peso dos animais e consumo alimentar e hídrico no primeiro e quinto dia (último dia) do oferecimento do DSS. A presença de sangue nas fezes foi avaliada

diariamente, durante o oferecimento do DSS. Para acompanhamento da evolução da obesidade, foram avaliados semanalmente evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico.

5.4 Amostras de sangue e tecido

As amostras de sangue, para posterior dosagens bioquímicas, foram retiradas após jejum de 8 a 12 horas. Ao término do experimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina e xilazina (70mg/kg e 12mg/kg, respectivamente, preconizado pelo CETEA/UFMG) e foram sacrificados por exanguinação pela artéria femoral, seguido de deslocamento cervical. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 6.000rpm durante 5 minutos em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243) para separação do plasma ou do soro. As amostras de soro ou plasma foram armazenadas à -75°C para posteriores análises. O cólon e o tecido adiposo epididimal dos animais foram retirados, perfundidos com salina tamponada com fosfato (PBS) e acondicionados a -75°C para as análises posteriores. Antes de ser perfundido, o tecido adiposo foi pesado para cálculo da porcentagem de adiposidade epididimal. O baço e os linfonodos cecal e mesentéricos também foram retirados e armazenados a -75°C para as análises posteriores.

5.5 Avaliação do perfil lipídico

5.5.1 Determinação da concentração de colesterol total

As concentrações de colesterol foram medidas de acordo com o método da colesterol oxidase¹¹³ utilizando kit comercial Labtest, Brasil. O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 500nm.

As concentrações de colesterol no soro dos animais foram determinadas por ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com Fazio e colaboradores¹¹⁴. 5 μ L das amostras de soro foram diluídas em água deionizada (1:200), afim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. 100 μ L de reagente de colesterol total foram adicionados a 100 μ L do soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37° C a absorbância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

5.5.2 Determinação da concentração de HDL colesterol

As concentrações de HDL-colesterol no soro foram obtidas por meio do kit enzimático Labtest, Brasil, cujo princípio se baseia na precipitação das lipoproteínas LDL e VLDL pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após

centrifugação (12.000rpm por 4 minutos), o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante.

O sobrenadante foi plaqueado (10µL) em duplicata em uma microplaca de 96 poços, em seguida, adicionado 200µL do reagente de cor Colesterol Liquiform - Labtest (Brasil). Após incubação de 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm.

Para a determinação do padrão, foram substituídos 10µL de sobrenadante de amostra por 10µL de padrão de HDLc. Para o cálculo das concentrações de HDLc foi feita a determinação do Fator de Calibração por meio da seguinte equação: F (Fator de Calibração) = $40/\text{média da Absorbância do Padrão}$; $\text{HDLc (mg/dL)} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{Fator de Calibração}$.

5.5.3 Determinação do colesterol não-HDL

O colesterol não-HDL (LDL colesterol, VLDL colesterol e IDL colesterol) foi calculado pela diferença entre o colesterol total e HDL colesterol.

5.5.4 Determinação da concentração de triglicerídeos séricos

As concentrações de triglicerídeos séricos foram medidas de acordo com o método enzimático colorimétrico¹¹⁵, utilizando kit comercial Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre. Esse é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol fosfato, o qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da peroxidase em presença de

um reagente fenólico (4-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com máximo de absorção a 510nm. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas. A diluição utilizada foi de 5 μ L de soro em 245 μ L de água deionizada.

5.6 Avaliação da homeostase da glicose

5.6.1 Determinação da glicemia de jejum

As concentrações de glicose no plasma foram dosadas por meio do kit enzimático Labtest, Brasil. O princípio se baseia na oxidação da glicose a ácido glucônico, pela ação da glicose oxidase, com liberação de peróxido de hidrogênio. Este, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 520nm.

O sangue foi coletado em tubo com anticoagulante contendo antiglicolítico (Glistab, Labtest, composto de EDTA 6g/L e fluoreto de potássio 12g/L) e separado a 6.000rpm durante 5 minutos em centrífuga de mesa Fanem Centrimicro 243. A seguir, 2 μ L de plasma foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e foram adicionados 200 μ L do reagente de cor, em duplicata. Após incubação de 15 minutos a 37° C, a absorbância foi lida a 492nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

Para a determinação do padrão foram substituídos 2 μ L da amostra por 2 μ L de padrão. Para o cálculo das concentrações de glicose em mg/dL foi

utilizada a fórmula, indicada pelo Kit Labtest: (Média da absorbância da amostra / média da absorbância do padrão) x 100.

5.6.2 Teste de tolerância oral à glicose

O teste de tolerância oral à glicose, juntamente com o teste de sensibilidade à insulina, é usado para estimar a resistência insulínica, e foi realizado conforme descrito anteriormente por Santos e colaboradores¹¹⁶. Os animais, deixados em jejum por 6 horas, receberam solução de D-glicose, 2g/kg de peso corporal, por gavagem. Foi feita a leitura da glicemia, com auxílio de um glicosímetro (Advantage), nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem. Para tal, foi retirada uma gota de sangue caudal. A glicemia foi dada em mg/mL.

5.6.3 Teste de sensibilidade à insulina

O teste de sensibilidade à insulina, juntamente com o teste de tolerância oral à glicose, é usado para estimar a resistência insulínica, e foi realizado conforme descrito anteriormente por Santos e colaboradores¹¹⁶. Com os animais em estado alimentado, foi injetado intraperitonealmente 0,75 unidades de insulina por kg de peso do animal. Foi feita a leitura da glicemia, com auxílio de um glicosímetro (Advantage), nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos após a injeção. Para tal, foi retirada uma gota de sangue caudal. A glicemia foi dada em mg/mL.

5.6.4 Determinação da insulina de jejum

A dosagem de insulina foi feita usando a técnica de radioimuno ensaio, conforme instruções do kit RAT INSULIN RIA (cat. #RI-13K) da marca Millipore. Brevemente, primeiramente foram pipetados 50µL de tampão para ligações não específicas. Logo após, foram pipetados 25µL de controle de qualidade, os padrões e as amostras em cada poço, em duplicata. Foram pipetados também, 25µL de insulina I¹²⁵ e em seguida, 25µL de anticorpo anti-insulina. A placa foi incubada a 4°C, por 24 horas. Foram acrescentados 250µL de reagente precipitante gelado e incubado a 4°C, por 20 minutos e em seguida, centrifugado a 4°C, a 3000 giros, por 20 minutos. A radioatividade foi contada em um contador gama por um minuto. Os dados foram fornecidos em ng/mL.

5.5.5 Cálculo da resistência insulínica pelo Índice de HOMA (modelo de avaliação da homeostase)

O índice de HOMA permite determinar a resistência insulínica (HOMA-IR) e a capacidade funcional das células β-pancreáticas (HOMA-BETA)¹¹⁷. Foi calculado pelas seguintes fórmulas:

$$HOMA-IR = (Glicemia\ de\ jejum(mmol/L) \times Insulina\ de\ jejum(mU/L)) / 22,5$$

$$HOMA-BETA = (20 \times Insulina\ de\ jejum(mU/L))/(Glicemia\ de\ jejum(mmol/L)-3,5)$$

5.6 Contagem Total de Leucócitos no Sangue

No dia anterior ao sacrifício foi retirado sangue caudal para contagem de leucócitos totais no sangue. O sangue retirado foi adicionado ao corante Turk, responsável pela lise de eritrócitos, numa diluição de 1:10 e a contagem foi feita em câmara de Neubauer, sendo contadas as células presentes nos quatro quadrantes externos¹¹⁸. Após a contagem, o número total de leucócitos foi dado pela fórmula:

n° total de leucócitos = somatório do n° de células nos quadrantes x 2,5 x 10

(10: fator de diluição; 2,5: fator relacionado ao volume da câmara)

5.7 Contagem Diferencial de Leucócitos no Sangue

Para a contagem diferencial de leucócitos no sangue, foi feito esfregaço de boa qualidade corado pelo kit Panótico Rápido (LaborClin, Pinhais, PR), e levado ao microscópio para observação. A avaliação da lâmina foi feita com uma objetiva com aumento de 100x. A contagem de células foi realizada da metade para o fim da borda do esfregaço, em zigue-zague, totalizando a contagem de 100 células, entre neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos¹¹⁸.

5.8 Análise Histológica do Cólon e do Tecido Adiposo Epididimal

O cólon usado para análise das condições histológicas foi retirado, medido com régua milimetrada e colocado imediatamente em solução de formol 10% por aproximadamente 4 horas. O órgão foi então enrolado da porção proximal para a distal formando um rocambole. Parte do tecido adiposo epididimal foi retirada, lavada em salina e colocada em solução de formol 10%. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina para cortes histológicos de 10µm e coloração com hematoxilina e eosina. A observação dos cortes foi feita em microscópio óptico acoplado a uma câmera para captação de imagens, com aumento de 100x, que foram analisadas no programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, MD, EUA)^{4, 71}.

Para análise do cólon, o sistema de escore semi-quantitativo foi baseado no descrito por McCafferty e colaboradores¹¹⁹ no qual são classificadas as seguintes características: extensão da destruição da arquitetura da mucosa (0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: dano extensivo), presença e grau de infiltração celular (0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: infiltração transmural), extensão do espessamento do músculo (0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: espessamento extensivo), e a presença ou ausência de depleção das células caliciformes (0: ausente; 1: presente). Os escores para cada característica são somados, e o escore máximo possível é de 10.

Para análise do tecido adiposo, a área do adipócito foi obtida pela análise de 100 adipócitos por lâmina e a pesquisa de estruturas em forma de coroa foi determinada pela média da contagem das estruturas em 10 campos⁷¹.

5.9 Análise de Eosinófilo, Neutrófilo e Macrófago por Ensaio Enzimático

Foram medidas as atividades das enzimas mieloperoxidase, N-acetilglicosaminidase e peroxidase de eosinófilos, presentes em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, respectivamente. Para isso, o cólon foi limpo com PBS1x e pesado em balança semi-analítica.

Para quantificação da enzima mieloperoxidase, as amostras foram pesadas, homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em salina 0,2% e salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e centrifugado novamente a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado foi ressuscitado em HETAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio) 0,5%/PBS1x. As amostras foram então congeladas e descongeladas, por 3 vezes, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, adicionam-se as amostras diluídas (1:2) a uma placa de 96 poços e acrescenta-se o substrato para a mieloperoxidase, TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina – Sigma) solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma) e procede-se com a incubação a 37°C por 5 minutos. Após o tempo, adiciona-se peróxido de hidrogênio a 0,002% e novamente incuba-se a 37°C por 5 minutos. Para interromper a reação acrescenta-se ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Metodologia

Para quantificação da enzima N-acetilglicosaminidase, as amostras foram pesadas, homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em salina 0,2% e salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e centrifugado novamente a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em solução salina 0,9%/Triton x-100 (Sigma) 0,1% v/v. As amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático. Para isso, adicionam-se as amostras diluídas (1:2) a uma placa de 96 poços e acrescenta-se o substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D glicosaminida (Sigma) solubilizado em tampão citrato/fosfato e incuba-se a 37°C por 5 minutos. Para interromper a reação acrescenta-se tampão glicina 0,2M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Para quantificação da enzima peroxidase de eosinófilos, as amostras foram pesadas, homogeneizadas em PBS1x e centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. Foi adicionado solução salina 0,2% e solução salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e as amostras foram novamente centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em HETAB 0,5%/PBS1x. Em seguida as amostras foram congeladas e descongeladas, por 3 vezes, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, adicionam-se as amostras a uma placa de 96 poços e acrescenta-se o cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma) solubilizado em tampão Tris-

HCl 0,075mM acrescido de peróxido de hidrogênio a 6,6 mM e procede-se incubação a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Então, interrompe-se a reação com adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

5.10 Análise do Perfil de Células Imunes por Citometria de Fluxo

Baço, linfonodo cecal e tecido adiposo foram tratados para retirada de células para citometria de fluxo. O cólon foi tratado para retirada de leucócitos presentes na lâmina própria e então estas células foram utilizadas na análise.

As suspensões celulares foram preparadas como descrito previamente¹²⁰. Brevemente, linfonodo cecal foi colocado em meio RPMI completo, macerado, centrifugado a 1200rpm por 7 minutos a 4°C,. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em meio RPMI completo. Baço foi colocado em meio RPMI completo, macerado, centrifugado a 1200rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e então foram adicionados água destilada e PBS 10x, a suspensão foi centrifugada a 1200rpm por 7 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em meio RPMI completo. As suspensões celulares foram contadas em câmara de Neubauer para determinação da quantidade de células utilizando-se o corante eritrosina.

Para retirada de células da lâmina própria, o cólon foi removido, lavado com solução de HBSS1x e incubado em meio IEL sob agitação por 30 minutos a 37°C. A solução contendo o tecido foi então agitada vigorosamente por 25-30

segundos, filtrada e o sobrenadante descartado. O tecido foi incubado com colagenase tipo 2 (Sigma) sob agitação por 30-40 minutos a 37°C, macerado, filtrado e centrifugado a 1400rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em meio IEL, centrifugado novamente a 1400rpm por 10 minutos a 4°C; o sobrenadante foi mais uma vez descartado e o precipitado ressuspensionado em meio IEL.

Para retirada das células estromais do tecido adiposo epididimal, aproximadamente 500mg de tecido foram incubados em meio DMEM acrescidos de 2mg de colagenase tipo 2 (Sigma) a 37°C, por 1 hora, sob agitação constante. A solução foi filtrada e centrifugada a 500rpm por 1 minuto para separação da camada de gordura (adipócitos). O infranadante foi retirado e centrifugado a 1200rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e as células (pellet) foram ressuspensionadas em 200µL de PBS-WASH (PBS 1x) contendo 0,5% de BSA+0,01% de azida.

As suspensões celulares foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo U juntamente com os anticorpos; as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro, lavadas duas vezes com PBS1x adicionado de azida sódica 0,01% e centrifugadas a 1300rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as amostras foram fixadas com solução fixadora contendo 10g/L de paraformaldeído e transferidas para tubos de contagem. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, EUA) e a aquisição dos dados foi feita com o programa CELLQuest™ (EUA). Para cada imunofenotipagem, foram coletadas informações relativas aos aspectos morfométricos de tamanho e granulosidade, bem como aspectos imunofenotípicos de 30.000 eventos para linfonodo cecal e baço e de 10.000

eventos para lâmina própria do cólon e tecido adiposo. A análise dos dados foi feita com o programa FlowJo 7.6 (EUA).

Nos quatro tecidos analisados, foram feitas marcações para determinação da presença e ativação de:

- linfócito T regulador: CD4 CD25 LAP;
- linfócito T auxiliar: CD4 CD69;
- linfócito T citotóxico: CD8 CD69;
- linfócito B: CD19 CD21;
- monócito e macrófago: MOMA CD80;
- neutrófilo: GR1.

As análises foram realizadas utilizando-se da estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, por meio de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição puntual de fluorescência, como mostrado nas figuras a seguir (Fig. 12-18)

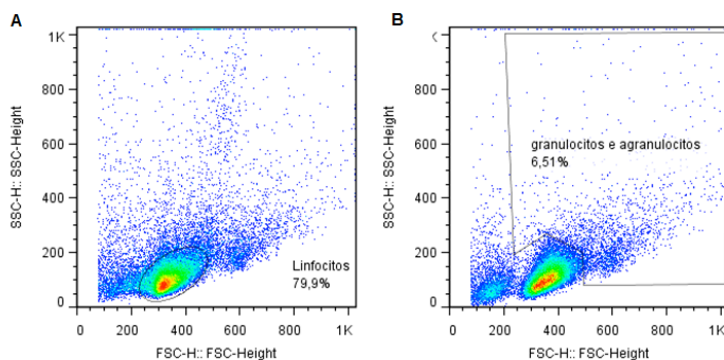


Figura 12: Populações de linfócitos (A) e de células granulares e agranulares (B).

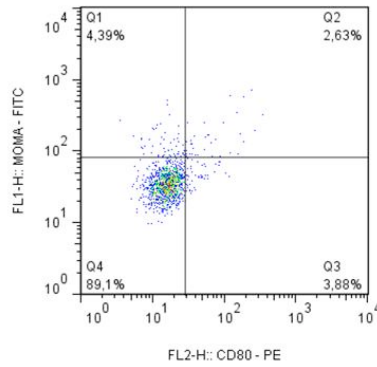


Figura 13: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores MOMA e CD80, dentro da marcação das células granulares e agranulares.

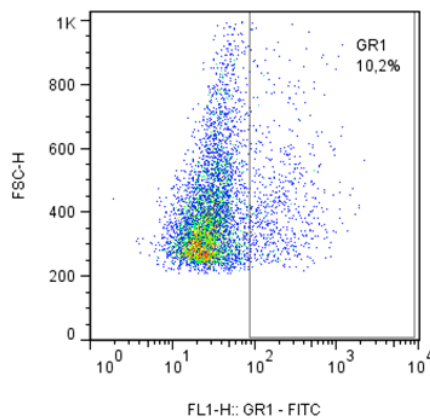


Figura 14: Delimitação do quadrante para análise do marcador GR1, dentro da marcação das células granulares e agranulares.

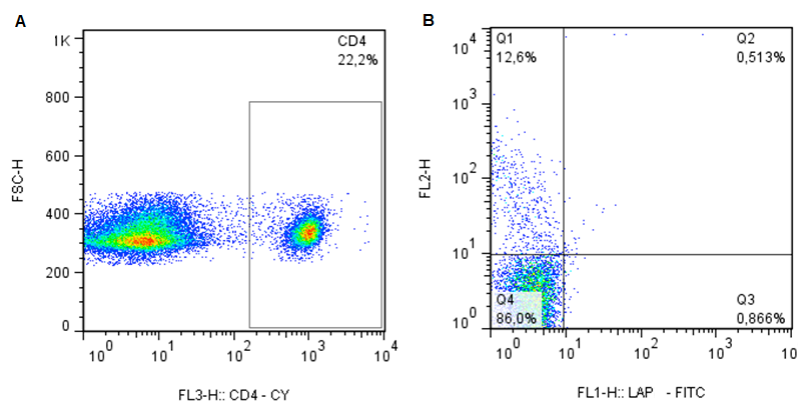


Figura 15: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD25 e LAP (B), dentro da marcação de CD4 (A), dentro da marcação dos linfócitos.

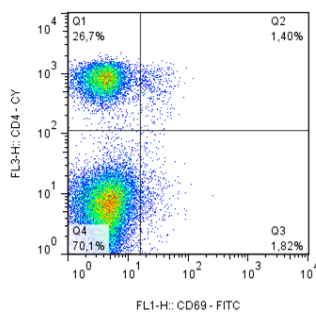


Figura 16: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD4 e CD69, dentro da marcação dos linfócitos.

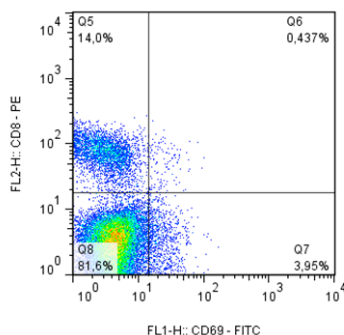


Figura 17: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD8 e CD69, dentro da marcação dos linfócitos.

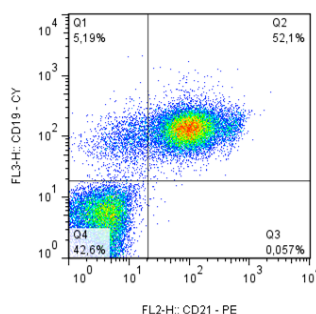


Figura 18: Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD19 e CD21, dentro da marcação dos linfócitos.

5.11 Análise de Citocinas e Quimiocina e Ovalbumina por ELISA

Foram analisadas presença de citocinas no soro, cólon e tecido adiposo epididimal. Para isso, os órgãos foram limpos com PBS1x, pesados em balança analítica, homogeneizados com solução de extração de citocinas (BSA 0,05%; Aprotinina 0,02µL/mL; cloreto de benzetônio 0,05mg/mL, NaCl

Metodologia

0,023mg/mL; EDTA 0,37mg/mL; PMSF 0,02mg/mL, Tween20 0,5µL/mL em PBS1x), centrifugado a 10000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi usado no ensaio de ELISA. O soro foi diluído (leptina 1:20, adiponectina 1:100, resistina 1:100, ovalbumina 1:2) em PBS/BSA-0,1% e usado para o ensaio.

O ensaio de ELISA, com duração de três dias, foi feito com kits de anticorpos (R&D Systems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, no primeiro dia a placa de 96 poços foi sensibilizada com o anticorpo de captura e incubada em câmara úmida no escuro a 4°C por 24 horas. No segundo dia, após lavar a placa 6 vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), foi feito o bloqueio com PBS1x acrescido de albumina bovina a 1% (Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada 2 vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), as amostras foram adicionadas e foi feita incubação durante a noite em câmara úmida no escuro a 4°C. No terceiro dia, após lavar a placa 6 vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), foi acrescentado o anticorpo de detecção e feita incubação por 1 hora em câmara úmida no escuro a 4°C; a placa foi lavada 6 vezes, foi acrescentada estreptavidina e feita incubação por 45 minutos. A placa foi novamente lavada por 6 vezes, foi então acrescentado o cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma), as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz e a reação foi parada com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos em ng/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão ou em unidades arbitrárias. Para as amostras de tecido adiposo e cólon, o resultado foi normalizado por proteínas, que foram dosadas pela técnica de Lowry¹²¹, no homogenato usado no ensaio.

Foi analisada a presença de TNF, INF- γ , MCP1/CCL2, IL-6, IL-4 e IL-10 no cólon, TNF, MCP1/CCL2, IL-6 no tecido adiposo epididimal e a presença de leptina, adiponectina, resistina e ovalbumina no soro.

5.12 Análise da expressão de RNA em tecido adiposo epididimal, cólon e linfonodos cecal e mesentérico

Para avaliação da expressão de TNF, IL6, MCP1/CCL2, ICAM1, VCAM1, TLR4, leptina, adiponectina, resistina no tecido adiposo epididimal, de TLR4, receptor de leptina Ob-Rb, ZO-1, ocludina e MLCK no cólon e eubactérias nos linfonodos cecal e mesentéricos, estes foram retirados do animal e imediatamente armazenados a -75°C , em tubos de 2,0mL livres de RNase e DNase.

5.12.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA, tecido adiposo epididimal, cólon e linfonodos cecal e mesentérico foram homogeneizados com Trizol (Invitrogen #15596-026) e o tecido adiposo foi centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos a 4°C , para retirada da camada gordurosa. Foram adicionados 0,2mL de clorofórmio aos tubos, agitados por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados novamente a 13.000rpm por 10 minutos a 4°C . A fase superior foi então transferida para outro tubo livre de RNase contendo 0,5mL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Em seguida foram incubados a -75°C , por 30 minutos para precipitação do RNA. As

amostras foram centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, o pellet lavado com álcool 75% e centrifugados a 13.000rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o etanol foi removido e o pellet seco em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. O pellet, depois de seco, foi ressuspendido em água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 minutos. Para o cólon dos animais que receberam DSS, o RNA extraído foi purificado com Kit de purificação de RNA (Qiagen, Alemanha), conforme instrução do fabricante. A concentração (ng/μL) e a pureza do RNA foram medidos no aparelho NanoDrop (ND 1000). O RNA foi armazenado a -75°C.

5.12.2 Produção do cDNA

Para a produção do cDNA, o RNA extraído anteriormente foi diluído para a concentração 0,2μg/μL em água livre de RNase e DNase. Para 10μL de RNA a 0,2μg/μL foi adicionado 1μL de Oligo dT 50uM e 2,5μL de água livre de RNase e DNase. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados no termociclador (PCR System 9700 – Applied Biosystems) a 72°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado à mistura 6,7μL do segundo mix, composto de 4uL de MMLV5x tampão, 1uL de MMLV RT (200uni/amostra), 1uL de dNTPs 10mM, 0,2uL de RNAsin e 0,5uL de água livre de RNase e DNase. Os tubos foram colocados no termociclador a 42°C por 3 horas; em seguida a 72°C por 15 minutos e armazenados a -20°C para posterior uso para RT-PCR (reação em cadeia de polimerase em tempo real).

5.12.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

Para análise do RT-PCR, 2,5µL de cDNA diluído 1:10 foram adicionados à 7,5µL do mix composto de 5µL de Syber Green, 0,75µL de primer reverse, 0,75µL de primer forward e 1µL de água, em placa de 96 poços específica para RT-PCR. A tabela 2 mostra a sequência de nucleotídios de cada primer utilizado. A análise foi feita em máquina de RT-PCR (ABI PRISM 7900HT, Applied Biosystems) com auxílio do programa SDS 2.0, e o resultado expresso em “*fold increased over control*” (vezes aumentadas em relação ao controle).

Tabela 2 – Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados

	Foward	Reverse
Leptina	5'-CCTGTCGCTTTGGTCTATCTG-3'	5'-AGGCAAGCTGGTGAGGATCTG-3'
Adiponectina	5'-AGGTTGGATGGCAGGC-3'	5'-GTCTCACCCCTTAGGACCAAGAA-3'
Resistina	5'-AGACTGCTGTGCCTTCTGGG-3'	5'-CCCTCCTTTTCCTTTTCTTCCTTG-3'
TNF	5'CGTCGTAGCAAACCACCAAG-3'	5'-GAGATAGCAAATCGGCTGACG-3'
IL6	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'	5'-CACGATTTCCAGAGAACATGTG-3'
MCP1/CCL2	5'-CCACTCACCTGCTGCTACTACT-3'	5'-TGGTGATCCTCTAGCTCTCC-3'
VCAM1	5'-CCTCACTTGCAGCACTACGGGC-3'	5'-TTTTCCAATATCCTCAATGACGGG-3'
ICAM1	5'-TGCGTTTTGGAGCTAGCGGACCA-3'	5'-CGAGGACCATACAGCAGCTGCAG-3'
TLR4	5'-TGACAGGAAACCCTATCCAGAGTT-3'	5'-TCTCCACAGCCACCAGATTCT-3'
Ob-Rb	5'-GTGTGAGCATCTCTCCTGGAG-3'	5'-ACCACACCAGACCCTGAAAG-3'
ZO1	5'-CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTTC-3'	5'-TCCTCTTTGCCAACTTTTCTC-3'
Ocludina	5'-ATGTCCGGCCGATGCTCTC-3'	5'-TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT-3'
MLCK	5'-AGTTTGTGGCTCCTGAAGTGAT-3'	5'-AGTCCGCTGACCAGAATATAGC-3'
Eubactéria	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
β-actina	5'-CTGCCTGACCAAGTC-3'	5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAGG A-3'

5.13 Microscopia intravital no tecido adiposo epididimal e cólon

Para a realização da microscopia intravital, os camundongos em estado de jejum por 12 horas foram anestesiados. A veia jugular direita foi canulada e os animais receberam injeção intravenosa de rodamina 6G (Sigma Chemical Co. EUA) (0,15mg/Kg). O tecido adiposo epididimal e o cólon foram expostos para a análise das interações entre leucócitos e endotélio na microcirculação.

A microcirculação foi visualizada por meio de um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse, Japão) conectado a uma câmera (Nikon, Japão) que transmitia a imagem a um monitor. A imagem foi gravada em DVD para análises posteriores.

Os leucócitos em rolamento foram avaliados contando-se o número de células que passavam por um determinado ponto da vênula por minuto. O leucócito foi considerado aderido quando permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100 μ m de extensão da vênula.

5.14 Avaliação da permeabilidade intestinal por ovalbumina

Para análise da permeabilidade intestinal, os animais receberam, por gavagem, 0,5mL de uma solução contendo 80mg de ovalbumina (OVA) (160mg/mL), após jejum de 12 horas, de acordo com protocolo adaptado de Peng e colaboradores¹²². Uma hora e quinze minutos após a gavagem, os animais foram anestesiados e eutanasiados por exanguinação da artéria femoral. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 6.000rpm durante 5

minutos em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243) para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C para determinação posterior da concentração de OVA, por ELISA, conforme descrito acima.

5.15 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs e pelo teste de Box-Plot. Os dados que assumiram distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os dados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de ANOVA Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Para verificar se os resultados eram devido à dieta indutora de obesidade (DIO) e/ou à colite crônica, foi utilizado o teste ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni (ANEXO 2).

Os resultados foram expressos como média e erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* Prisma (GraphPad Software, San Diego California – EUA), versão 5.0, e o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Letras diferentes significam $p < 0,05$.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

6. RESULTADOS

Evolução ponderal e ingestão calórica e líquida

Como previsto, o consumo calórico foi maior nos grupos que receberam dieta hiperlipídica, ao longo de todo experimento (fig. 19A). Durante os períodos de colite aguda (períodos de oferecimento de DSS), percebe-se que houve uma diminuição na ingestão calórica dos animais do grupo Colite+DIO (fig. 19B).

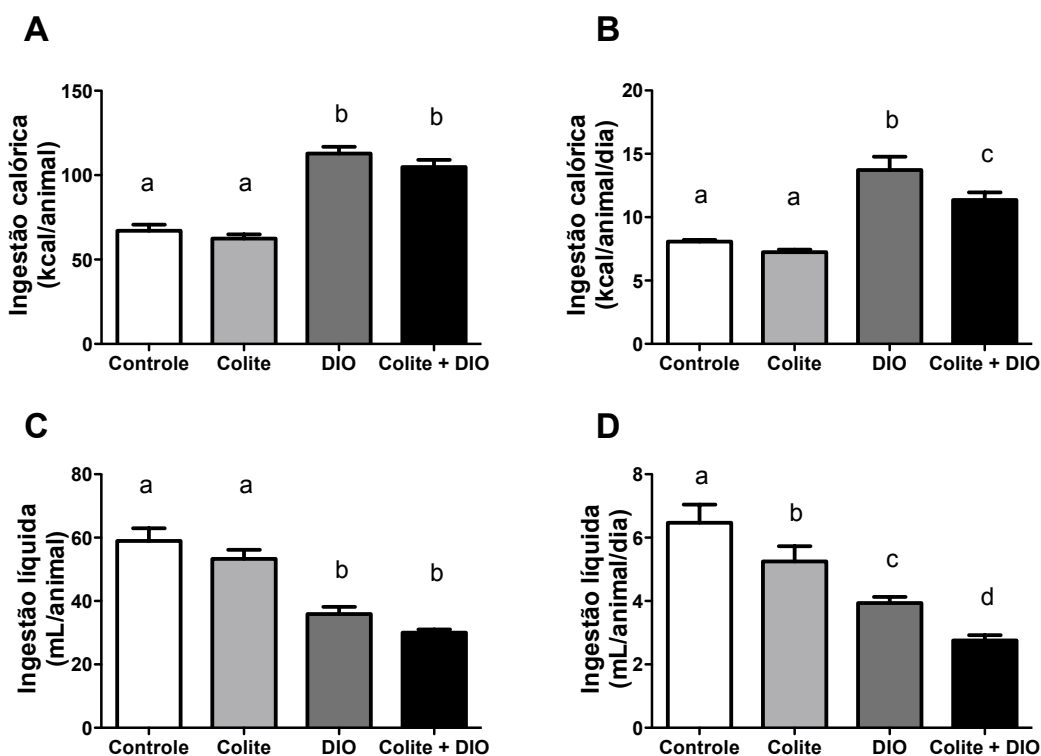


Figura 19: Consumo calórico e líquido. Soma da ingestão calórica durante todo o experimento (A) e ingestão diária durante o período de oferecimento de DSS (B). Soma da ingestão líquida durante todo o experimento (C) e ingestão líquida diária durante o período de oferecimento de DSS (D). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média \pm erro padrão, por kcal/animal, n=5 por grupo experimental (A e C) ou kcal/animal/dia, n=10 por grupo experimental (B e D). Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls; Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Resultados

Em relação à ingestão líquida (Fig. 19C), observa-se uma menor ingestão nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica. Durante o oferecimento do DSS, percebe-se uma diminuição da ingestão de líquido dos grupos Colite e Colite+DIO (Fig. 19D). Observa-se também que a ingestão de DSS pelo grupo Colite+DIO é menor que a ingestão de DSS pelo grupo Colite, porém essa diferença não influenciou a indução da colite crônica, como foi mostrado em resultados posteriores (fig. 24-25).

Durante o experimento (fig. 20A), observa-se um ganho de peso aumentado apenas no grupo DIO, em relação aos outros três grupos, em concordância com a maior ingestão calórica. Durante o oferecimento do DSS (fase aguda da colite), observa-se perda de peso nos grupos Colite e Colite+DIO, sendo essa perda mais acentuada no segundo ciclo de DSS (Fig. 20B-C).

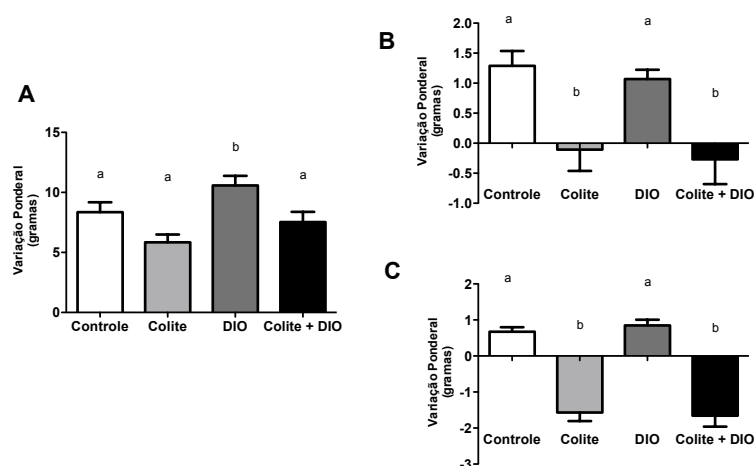


Figura 20: Variação ponderal. Soma do ganho de peso durante o todo o experimento (A), durante a 1ª dose de DSS (B) e durante a 2ª dose de DSS (C). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em grama. n=12/9/12/9. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls, Letras diferentes significam p<0,05.

Houve sangramento anal visível nos grupos Colite e Colite+DIO a partir do terceiro dia após a introdução do DSS na água dos animais, e essa presença permaneceu em ambos os grupos até um dia após a retirada do DSS.

Avaliação do perfil lipídico no sangue

A obesidade pode levar a alteração no perfil de lipídeos e lipoproteínas no sangue⁴¹. Sendo assim, esse perfil foi analisado no presente trabalho, mas não foi observada diferença entre os grupos (tabela 3).

Tabela 3: Perfil lipídico do sangue

	Controle	Colite	DIO	Colite + DIO
Triglicerídeos (mg/dL)	78,3±8,3	62,6±7,1	51,2±5,9	58,3±10,4
Colesterol total (mg/dL)	96,1±4,3	88,6±3,6	97,1±6,9	90,5±14,0
HDL colesterol (mg/dL)	34,9±1,9	28,8±4,9	32,9±3,2	28,7±3,8
Colesterol não HDL (mg/dL)	61,2±5,0	59,7±5,5	64,2±6,3	61,7±11,8

Resultado expresso como média±erro padrão, em mg/dL. n=12/9/12/9. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Sem diferença estatística.

Avaliação da homeostase da glicose

A obesidade também pode levar a alterações na homeostase da glicose, podendo culminar em resistência insulínica e diabetes tipo 2⁴¹. Quando

avaliada a glicemia de jejum, não foi observada diferença entre os grupos (tabela 4). Em relação à insulina de jejum e aos índices HOMA, também não foram observadas diferenças entre os grupos.

Tabela 4: Homeostase da glicose

	Controle	Colite	DIO	Colite + DIO
Glicemia de jejum(mg/dL)	141,2±20,1	159,7±5,6	133,3±8,2	111,2±28,2
Insulinemia de jejum (pM)	13,4±6,2	21,3±5,5	27,5±8,0	37,4±26,2
HOMA-IR	0,008±0,004	0,01±0,023	0,012±0,004	0,019±0,015
HOMA-BETA	0,07±0,02	0,34±0,22	0,21±0,07	0,32±0,07

Resultado expresso como média±erro padrão. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way, post-test Newman-Keuls. Sem diferença estatística.

No teste de sensibilidade à insulina, não foram observadas alterações (fig. 21). Porém observa-se menor tolerância à glicose, nos grupos DIO e Colite+DIO, quando realizado o teste de tolerância oral à glicose (fig. 22).

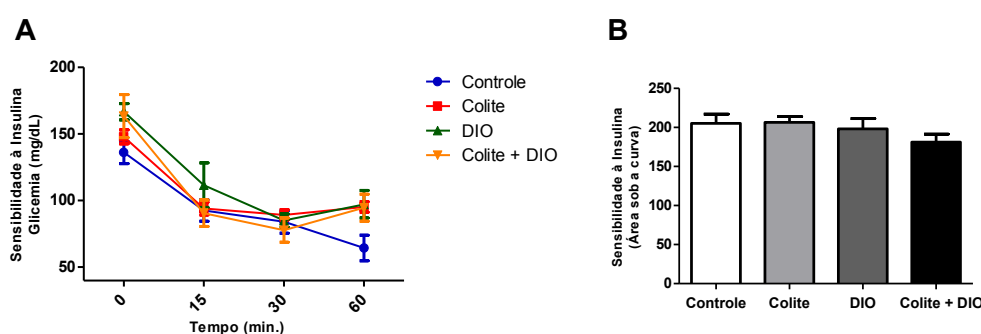


Figura 21: Teste de sensibilidade à insulina. Curva de controle da glicemia durante 1 hora (A), em mg/dL de glicose e área sob a curva (B), em unidades arbitrárias. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão. n=7 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Sem diferença estatística.

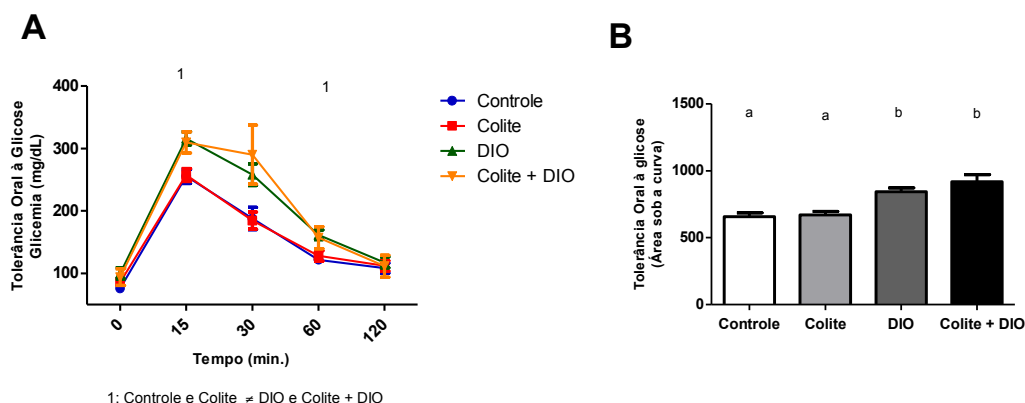


Figura 22: Teste de tolerância oral à glicose. Curva de controle da glicemia durante 2 horas (A), em mg/dL de glicose e área sob a curva (B), em unidades arbitrárias. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão. n=7 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls; Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Avaliação do leucograma

Na contagem total de leucócitos e no percentual de neutrófilos, eosinófilos e basófilos não foi observada diferença entre os grupos. Porém, foi observado aumento do percentual de linfócitos e monócitos no grupo Colite + DIO em relação aos outros grupos e aos grupos Controle e Colite, respectivamente (tabela 5), sugerindo inflamação sistêmica.

Tabela 5 – Leucograma no sangue

	Controle	Colite	DIO	Colite + DIO
Contagem total (numero de células)	4138±205,4	5405±799,3	4059±339,8	4449±441,6
Neutrófilos (%)	42,33±6,11	50,33±6,59	33,43±3,05	29,88±5,50
Eosinófilos (%)	1,33±0,42	2,00±0,52	3,43±0,97	1,25±0,53
Monócitos (%)	1,33±0,61 ^a	1,67±0,33 ^a	2,80±0,20 ^{ab}	4,62±0,60 ^b
Basófilos (%)	9,83±1,58	5,00±1,37	9,43±2,44	6,25±1,06
Linfócitos (%)	38,20±3,82 ^a	41,00±5,59 ^a	50,71±2,88 ^a	62,86±3,34 ^b

Resultado expresso como média±erro padrão, em numero de células ou percentual do total de células contadas. n=7 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Avaliação do cólon

Em relação ao tamanho do cólon, esse foi menor nos animais do grupo Colite + DIO (5,74cm±0,38) em relação ao grupo Controle (7,20cm±0,15), com valores intermediários para o grupo DIO (6,42cm±0,15) e Colite (6,36cm±0,32).

Na avaliação histológica do cólon (fig. 23), percebe-se que os cólons dos animais dos grupos Controle e DIO apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade. A arquitetura do cólon apresentou-se íntegra, com presença de células caliciformes, camada submucosa sem sinais de congestão e ausência de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa. O grupo Colite apresentou áreas com ulceração, ausência de glândulas em algumas partes da mucosa, depleção de células caliciformes, espessamento irregular da camada muscular, e infiltrado inflamatório constituído principalmente por macrófagos. Todos esses

sinais estavam presentes e exacerbados no grupo Colite+DIO, de acordo com análise semiquantitativa (fig 23 e 24).

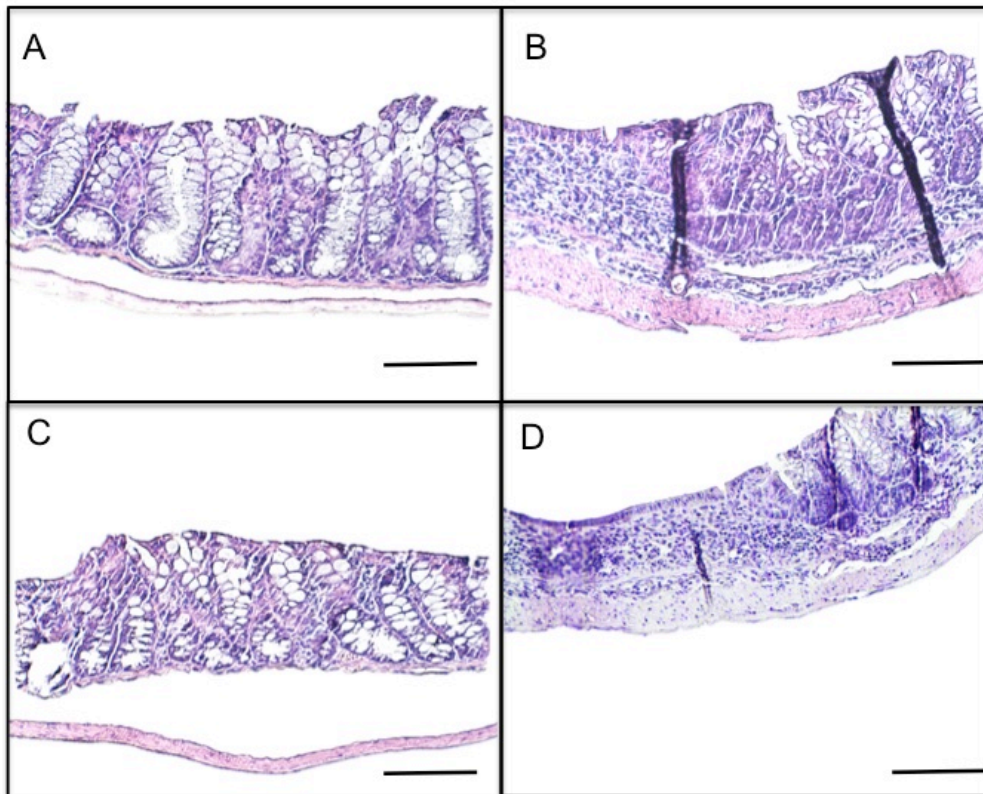


Figura 23: Aspecto morfológico do cólon. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica (A); Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v) (B); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica (C); Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v) (D). Cólon corado com hematoxilina e eosina, aumento final de 100x, escala=100 μ m.

O escore histopatológico da mucosa colônica mostrou que o grupo Colite apresentou um escore maior que os grupos Controle e DIO. O grupo Colite+DIO apresentou escore maior que os outros 3 grupos (fig 24).

Quando os itens do escore histopatológico foram avaliados separadamente (fig. 24B-E), observa-se o mesmo resultado anterior para quase todos os itens, com exceção apenas da depleção de células caliciformes, no qual o grupo Colite+DIO não foi diferente do grupo Colite.

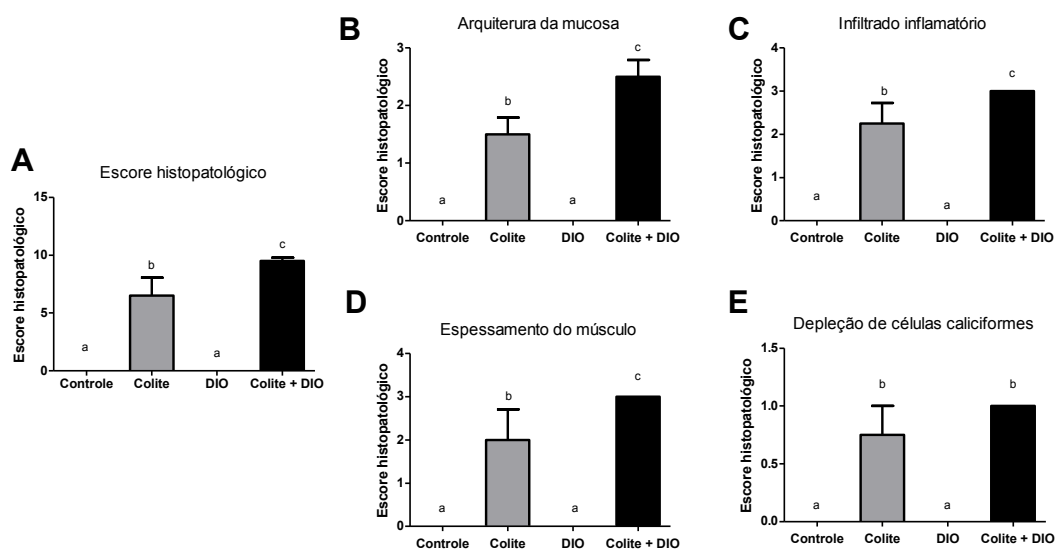


Figura 24: Escore histopatológico do cólon (A) e seus componentes: arquitetura da mucosa (B), infiltrado inflamatório (C), espessamento do músculo (D) e depleção de células caliciformes (E). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, n=5/4/5/4 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Análise do perfil inflamatório

O infiltrado inflamatório do cólon foi então investigado mais detalhadamente. Foram avaliadas na lâmina própria do cólon dos animais, por citometria de fluxo, a presença e ativação de marcadores indicativos de linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e macrófagos e para a presença de linfócitos T reguladores e neutrófilos.

Apesar de não terem sido observadas diferenças no percentual de monócitos e macrófagos (MOMA+) (fig. 25A), observa-se aumento no percentual de ativação dessa célula (MOMA+CD69+) no grupo Colite+DIO em relação aos outros grupos (fig. 25B). Também foi observado aumento no

Resultados

percentual de neutrófilos (GR1+) no grupo Colite+DIO em relação aos outros grupos (fig. 25C).

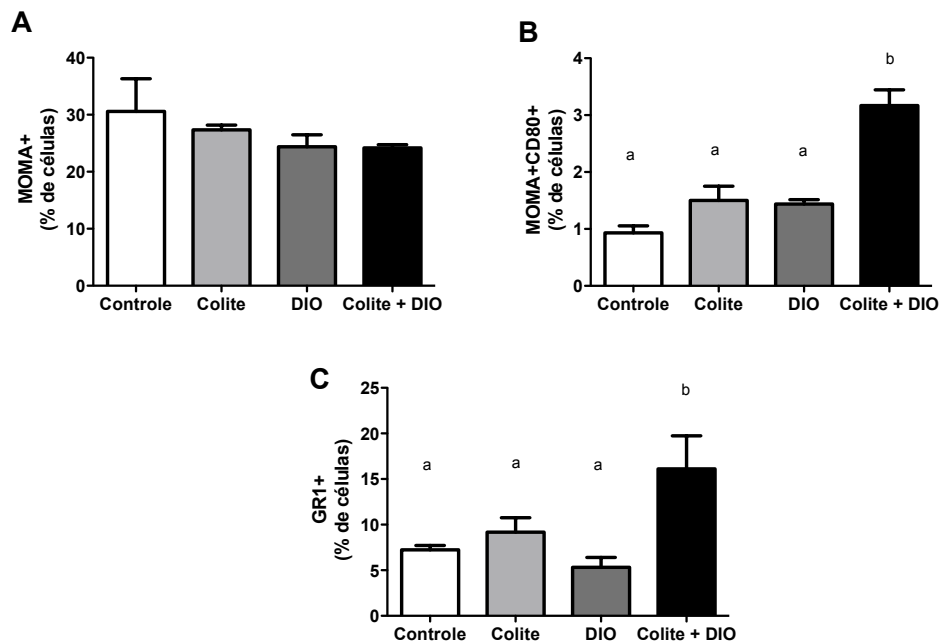


Figura 25: Porcentagem de monócitos e macrófagos totais (A), macrófagos ativados (B) e neutrófilos (C) na lâmina própria. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Os resultados observados para o marcador MOMA foram confirmados pela avaliação da atividade de N-acetil-glicosaminidase (NAG) (fig 26A). Para a mieloperoxidase (MPO), marcador indireto da atividade de neutrófilos, foi observado aumento nos grupos Colite e Colite+DIO em relação aos outros grupos (fig. 26B). Também foi avaliada a peroxidase de eosinófilos (fig. 26C), como medida indireta desse tipo celular, e não foi observada diferença nesse grupo celular.

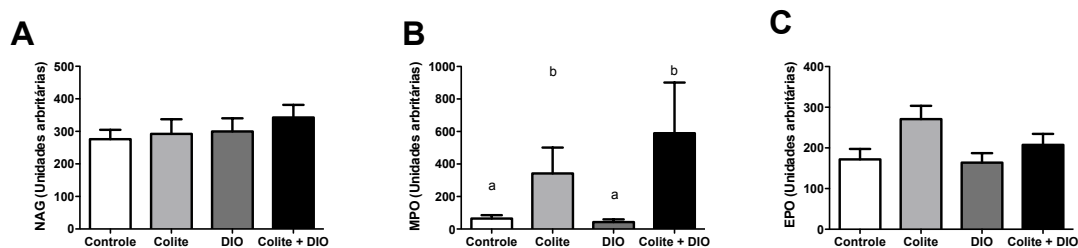


Figura 26: Ensaio enzimático no cólon. Análise indireta da presença de macrófagos (A), neutrófilos (B) e eosinófilo (C) pela quantificação da atividade das enzimas n-acetilglicosaminidase, mieloperoxidase e peroxidase de eosinófilo, respectivamente. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em unidades arbitrárias. n=12/9/12/9, teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

O percentual de linfócitos T CD4+ totais mostrou-se aumentado no grupo Colite+DIO em relação aos outros grupos (fig. 27A), e sua ativação (CD4+CD69+) estava aumentada nos grupos Colite e Colite+DIO em relação aos grupos Controle e DIO (fig. 27B).

Foi observado aumento no percentual de linfócitos T citotóxicos (CD8+) no grupo Colite e um aumento ainda maior no grupo Colite+DIO (fig. 27C). Quando avaliada a ativação dessas células (CD8+CD69+), observa-se que está aumentada no grupo Colite+DIO e intermediária no grupo Colite, em relação ao Controle (fig. 27D). Em relação aos linfócitos T reguladores, para os quais foi usada a marcação positiva para CD4, CD25 e LAP, não foi observada diferença entre os grupos (fig. 27E).

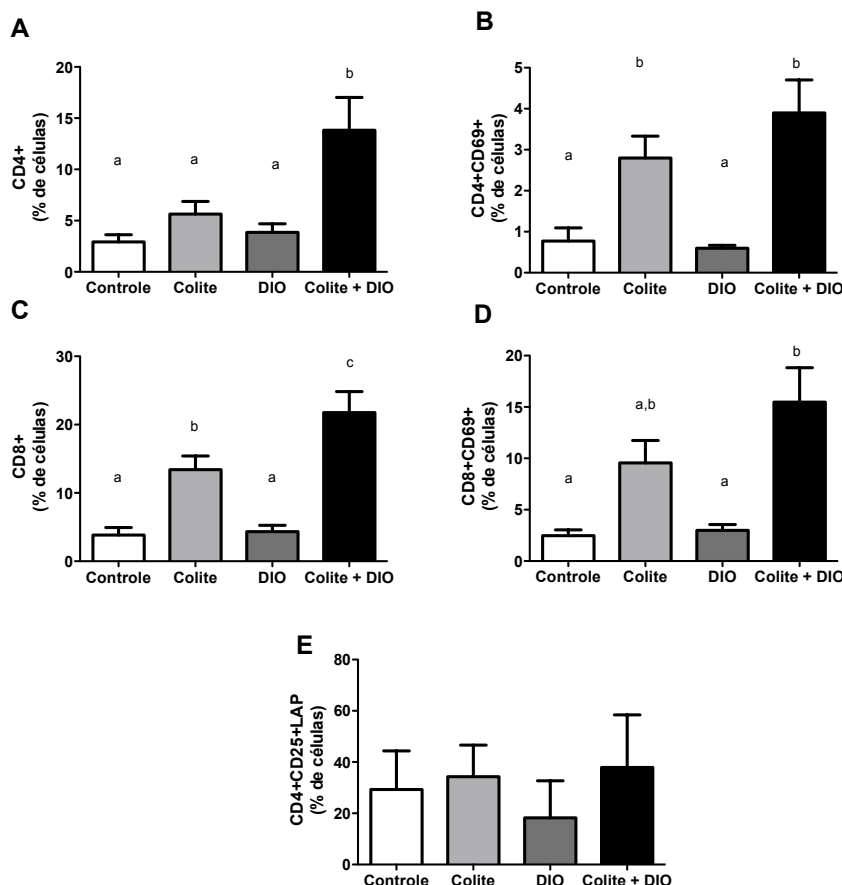


Figura 27: Porcentagem de linfócito T na lâmina própria. Linfócito T auxiliar total (A) e ativado (B), linfócito T citotóxico total (C) e ativado (D), e linfócito T regulador (E). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Na avaliação dos linfócitos B totais (CD19+), foi observado aumento dessas células no grupo Colite+DIO em relação aos outros grupos (fig. 28A). Quando os linfócitos B ativados (CD19+CD21+) foram avaliados (fig. 28B), foi observado aumento no percentual de células ativadas no grupo DIO e um aumento ainda maior no grupo Colite+DIO, em relação aos grupos Controle e Colite.

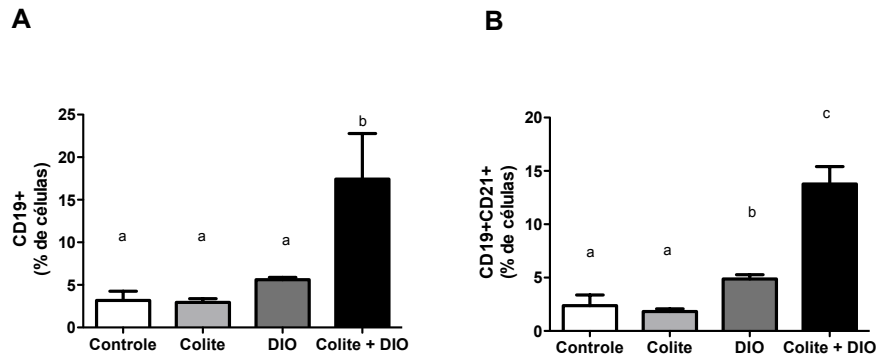


Figura 28: Porcentagem de linfócito B total (A) e ativado (B) na lâmina própria. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Em seguida, foi avaliada a presença de citocinas e MCP1/CCL2 em extrato do cólon (fig. 29). O resultado foi normalizado pela quantidade de proteínas no extrato para permitir a comparação. Foi observado aumento na concentração de TNF (fig. 29A), IL-6 (fig. 29B) e $IFN\gamma$ (fig. 29D) no cólon dos animais do grupo Colite e Colite+DIO, em relação ao grupo Controle. Em relação à quimiocina MCP1/CCL2, foi observado o aumento dessa em todos os grupos em relação ao controle (fig. 29C).

Resultados

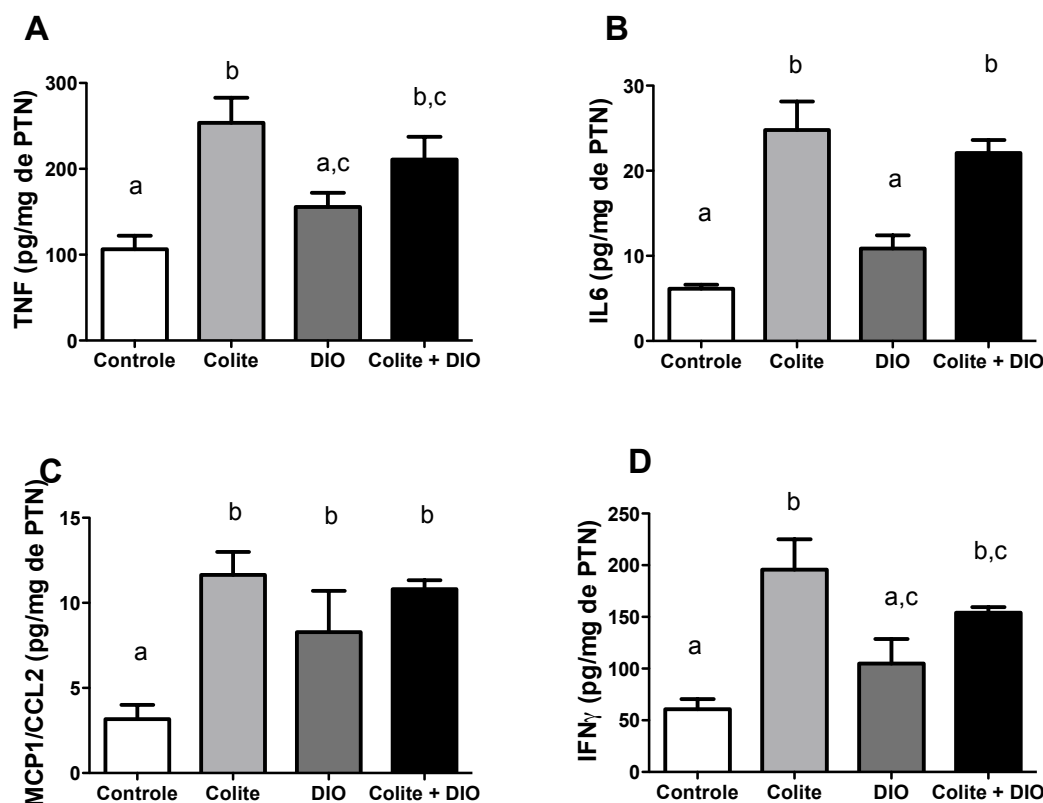


Figura 29: Concentração de citocinas e quimiocina inflamatória no cólon. TNF (A), IL6 (B), MCP1/CCL2 (C) e IFN γ (D). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média \pm erro padrão, em pg de citocina/quimiocina por mg de proteína. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Em relação às citocinas relacionadas à resposta Th2, IL-4 (fig. 30A) e IL-10 (fig. 30B), observa-se que também ocorre aumento na liberação dessas citocinas no grupos Colite em relação aos grupos Controle e DIO. Para a IL-4, observa-se valores intermediários no grupo Colite+DIO, em comparação aos grupos Controle e Colite. O mesmo foi observado para a IL-10, que ainda apresenta níveis intermediários para o grupo DIO.

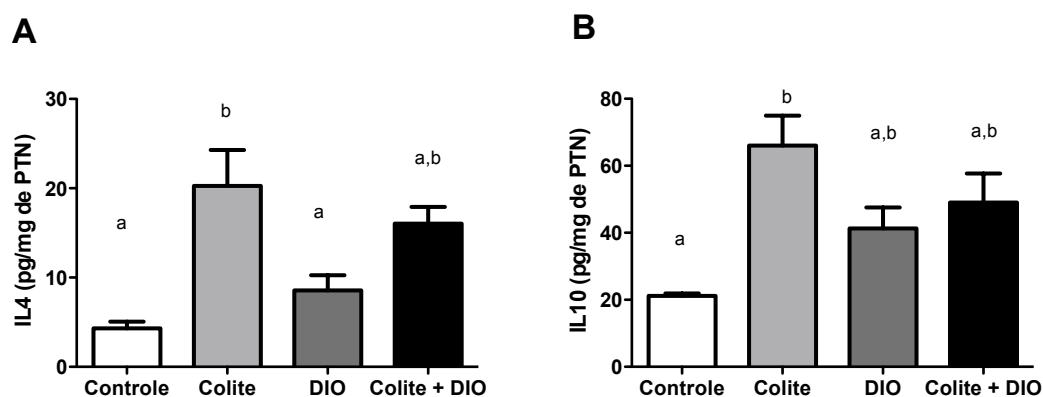


Figura 30: Concentração de citocinas da resposta Th2 no cólon. IL4 (A) e IL10 (B). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em pg de citocina por mg de proteína. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

A expressão de receptores no cólon ligados à inflamação - Ob-Rb e TLR4 - também foi determinada. Os resultados mostram que a expressão de TLR4 foi estatisticamente similar entre os grupos Colite e DIO. Porém, o grupo Colite+DIO apresentou-se ainda com uma expressão significantivamente aumentada em relação aos demais grupos (Fig. 31A). Observou-se aumento da expressão de Ob-Rb nos animais com colite e um aumento ainda maior nos animais com Colite+DIO, em relação aos grupos Controle e DIO (Fig. 31B).

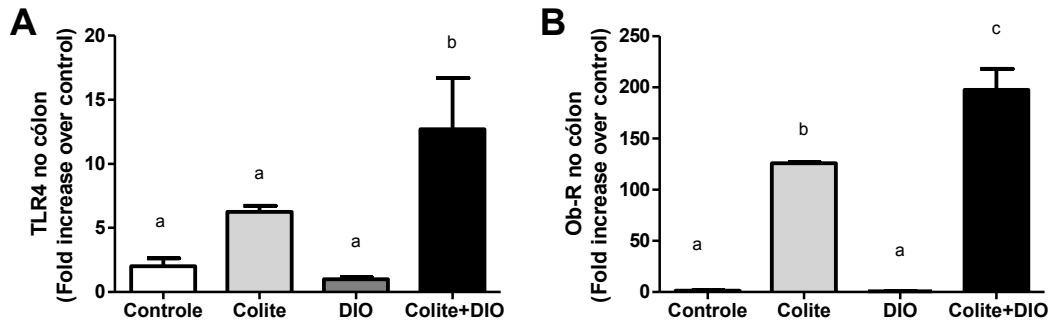


Figura 31: Expressão de TLR4 (A) e receptor de leptina – Ob-Rb - (B), no cólon. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em vezes aumentadas em relação ao controle. n=4 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Este panorama inflamatório foi também avaliado na microvasculatura da região do cólon pela microscopia intravital e não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos em relação ao rolamento e adesão de leucócitos (fig. 32).

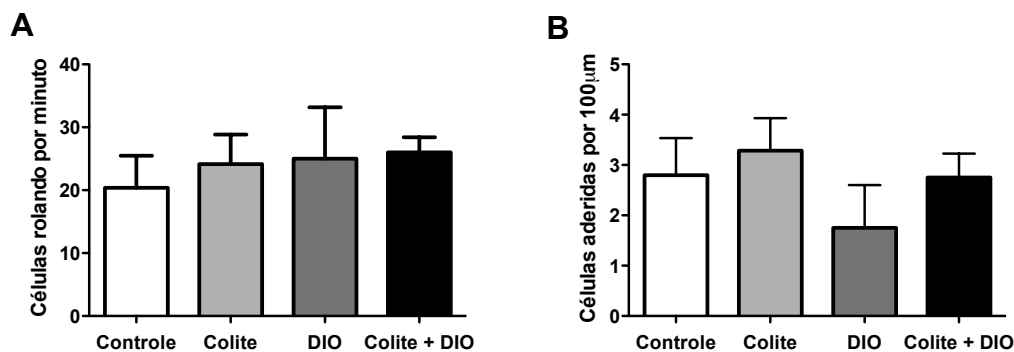


Figura 32: Microscopia intravital no cólon. Rolamento das células (A), em células rolando por minuto e Adesão das células (B), em células aderidas por 100µm. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, n=5/5/4/4 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Sem diferença estatística.

Avaliação da translocação bacteriana e permeabilidade intestinal

A avaliação da translocação bacteriana foi realizada através da análise da expressão de mRNA de eubactérias nos linfonodos cecais e mesentéricos. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os grupos, observa-se que a expressão de genes marcadores de eubactérias está cerca de 5 vezes aumentada no grupo Colite e 6 vezes aumentada no grupo Colite+DIO em relação ao grupo Controle (fig. 33).

Entretanto, quando avaliada a permeabilidade intestinal pelo teste de OVA, foi observado aumento da permeabilidade no grupo Colite, em relação aos grupos Controle e DIO e aumento ainda maior no grupo Colite+DIO (fig. 33).

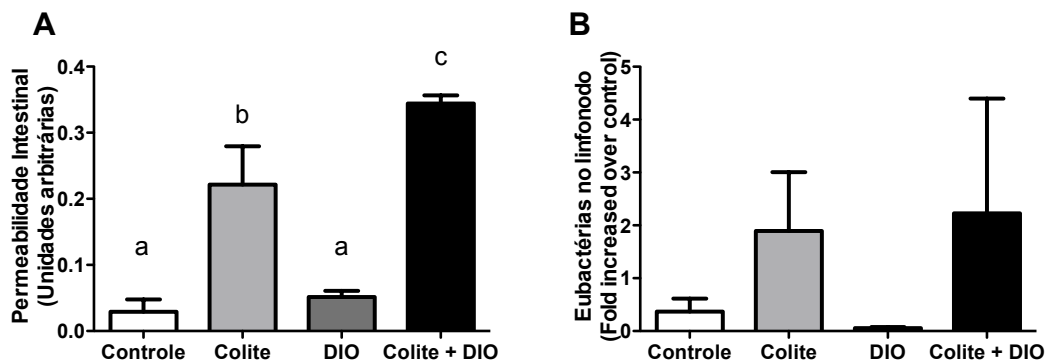


Figura 33: Avaliação da permeabilidade intestinal (A) e translocação bacteriana (B). A: Dosagem de Ovalbumina no soro; n=5 por grupo. B: Expressão de mRNA para eubactéria nos linfonodos cecais e mesentéricos; n=3 por grupo. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Resultados

Em seguida, foram avaliadas as proteínas das junções firmes ocludina e ZO-1 e a enzima MLCK (fig. 34). Foi demonstrado aumento da expressão de ZO-1 no cólon dos animais dos grupos Colite e Colite+DIO, em relação aos outros dois grupos (fig 34B). Em relação à ocludina, apesar de sua expressão estar cerca de 3 vezes aumentada no grupo Colite+DIO em relação ao Controle, não foi observada diferença estatística (fig. 34A).

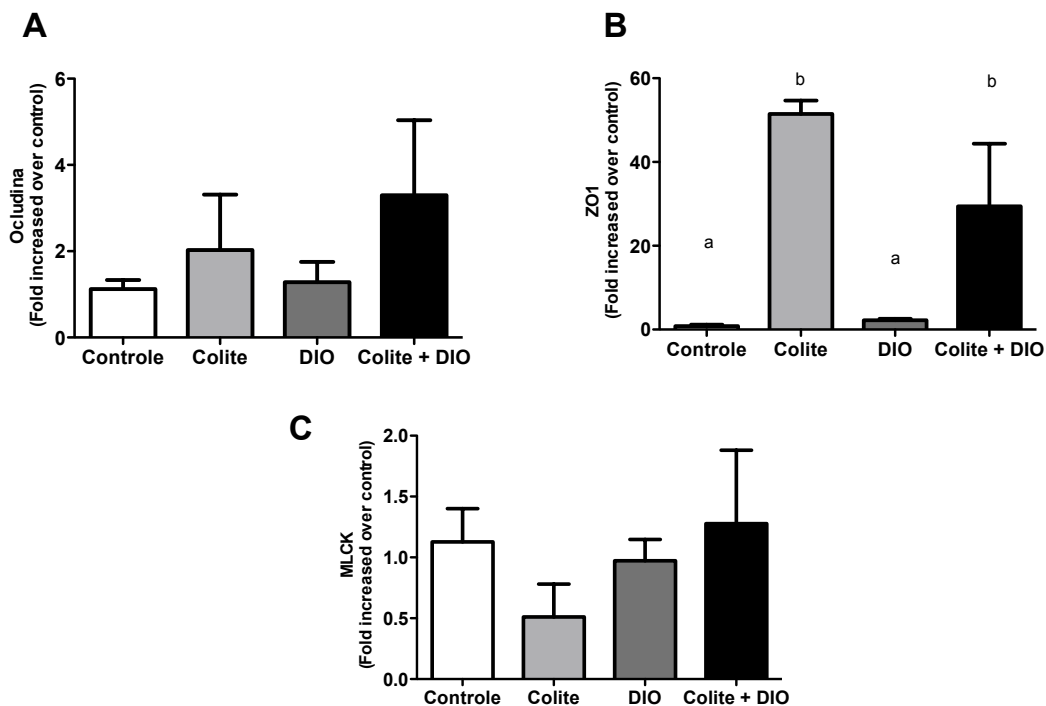


Figura 34: Expressão de proteínas das junções firmes. Expressão colônica de ocludina (A), ZO-1 (B) e da enzima MLCK (D). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, n=5/5/5/4 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Avaliação do linfonodo cecal e do baço

Análises do perfil de células imunes, utilizando citometria de fluxo, também foram realizadas no linfonodo cecal e no baço, assim como descrito anteriormente para a lâmina própria do cólon.

Como descrito na tabela 6, no linfonodo cecal, foi observado aumento no percentual de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no grupo DIO, em relação aos outros grupos. Além disso foi observada a diminuição dos linfócitos T auxiliares ativados no grupo Colite+DIO em relação ao grupo DIO e diminuição dos linfócitos T citotóxicos do grupo Colite+DIO em relação aos grupos Controle e DIO. Foi observada também diminuição no percentual de linfócitos T reguladores dos grupos Colite, DIO e Colite+DIO em relação ao Controle.

Observou-se a diminuição dos macrófagos e monócitos totais no linfonodo cecal do grupo DIO, em relação aos outros grupos. Em relação à ativação dos macrófagos, percebe-se um aumento nos grupos Colite e Colite+DIO e uma diminuição no percentual dessas células no grupo DIO, em relação ao Controle (tabela 6).

O percentual de neutrófilos no linfonodo cecal estava aumentado no grupo Colite e ainda mais aumentado no grupo Colite+DIO, em relação aos grupos Controle e DIO (tabela 6).

Tabela 6 – Perfil de células imunes do linfonodo cecal

	Controle	Colite	DIO	DIO + Colite
Linfócito T auxiliar (%)	30,8±2,9 ^a	35,7±1,8 ^{ab}	39,8±3,1 ^b	27,3±1,6 ^a
Linfócito T auxiliar ativado (%)	3,8±0,4 ^{ab}	3,8±0,5 ^{ab}	4,5±0,4 ^a	2,9±0,1 ^b
Linfócito T citotóxico (%)	19,2±2,6 ^a	18,0±1,8 ^a	27,6±2,9 ^b	15,0±0,5 ^a
Linfócito T citotóxico ativado (%)	1,3± 0,1 ^a	0,99± 0,1 ^{ab}	1,4±0,1 ^a	0,7±0,1 ^b
Linfócito T regulador (%)	0,6±0,1 ^a	0,3±0,04 ^b	0,2±0,04 ^b	0,1±0,04 ^b
Linfócito B (%)	33,4±1,8	40,9±5,5	26,6±6,1	41,4±3,5
Linfócito B ativado (%)	32,6±1,6	39,6±5,6	26,0±5,9	40,5±3,4
Macrófago e monócito (%)	57,7±1,9 ^a	62,1±4,9 ^a	25,0±6,8 ^b	60,4±4,1 ^a
Macrófago ativado (%)	11,4±0,8 ^a	21,3±2,2 ^b	5,8±0,6 ^c	24,9±1,6 ^b
Neutrófilo (%)	3,1±0,4 ^a	7,3±1,2 ^b	4,0±0,4 ^a	10,8±1,7 ^c

Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual do total de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Já no baço, as diferenças observadas limitaram-se ao maior peso relativo e o percentual de linfócitos B, linfócitos T auxiliares e neutrófilos (tabela 7).

A dieta e a colite influenciaram o tamanho relativo do baço, estando esse maior no grupo Colite e ainda maior no grupo Colite+DIO, em relação aos grupos Controle e DIO, sendo este um indicativo de inflamação nesse órgão.

Em relação aos linfócitos B ativados, essas células encontram-se em menor proporção no baço dos animais do grupo Colite+DIO, em relação ao grupo Controle e DIO (tabela 7).

Resultados

Já os percentuais de linfócitos T auxiliares ativados e os neutrófilos encontram-se aumentados no baço dos animais do grupo Colite+DIO, em relação aos outros grupos (tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação do baço

	Controle	Colite	DIO	DIO + Colite
Peso relativo (%)	0,3±0,01 ^a	0,5±0,08 ^b	0,3±0,02 ^a	0,7±0,1 ^c
Linfócito T auxiliar (%)	23,3±0,9	25,1±2,2	20,4±2,7	20,0±2,9
Linfócito T auxiliar ativado (%)	1,3±0,3 ^a	1,5±0,4 ^a	1,2±0,1 ^a	2,4±0,2 ^b
Linfócito T citotóxico (%)	14,3±0,5	13,6±0,9	13,1±2,2	11,7±2,1
Linfócito T citotóxico ativado (%)	0,8±0,2	0,7±0,2	0,4±0,02	0,6±0,1
Linfócito T regulador (%)	0,6±0,2	0,6±0,2	0,5±0,07	1,2±0,2
Linfócito B (%)	58,2±2,1	50,5±1,2	51,6±0,3	47,3±4,8
Linfócito B ativado (%)	53,7±1,9 ^a	44,4±2,7 ^{ab}	49,5±1,2 ^a	38,7±3,9 ^b
Macrófago e monócito (%)	26,8±1,0	23,2±2,9	26,4±1,8	24,2±3,1
Macrófago ativado (%)	11,3±1,7	11,7±1,4	11,2±1,0	11,7±2,1
Neutrófilo (%)	4,9±0,5 ^a	7,8±2,6 ^a	7,8±1,6 ^a	26,5±6,0 ^b

Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual (para peso relativo) ou percentual do total de células. n=12/9/12/9 para peso relativo do baço e n=5 por grupo para a citometria de fluxo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Avaliação do tecido adiposo epididimal (TAE)

Após o estudo do cólon, linfonodo cecal e baço, nosso objetivo foi observar as possíveis repercussões da colite no tecido adiposo. Para avaliação do tecido adiposo, foi realizada a análise histológica desse tecido (fig. 35).

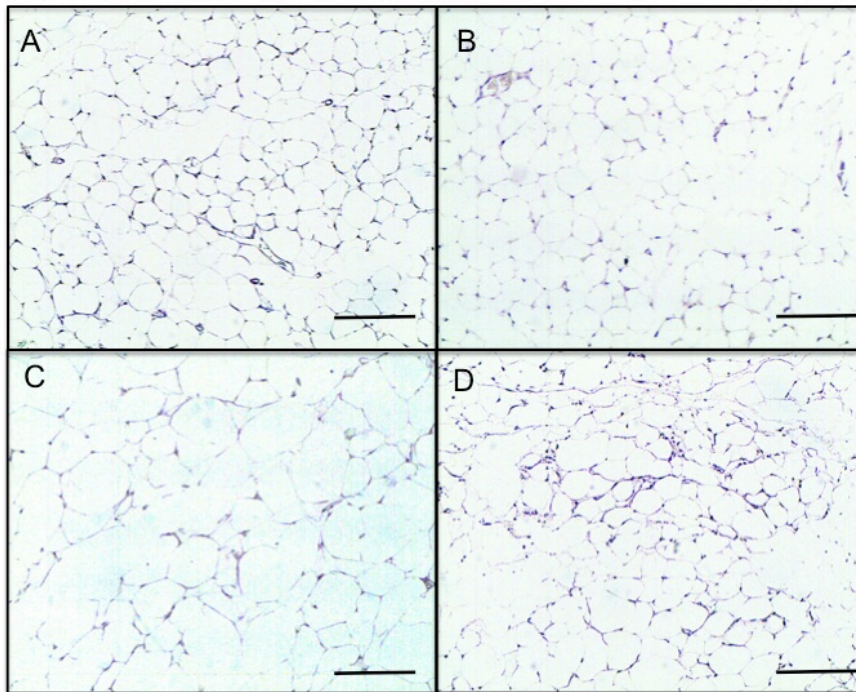


Figura 35: Aspecto morfológico do TAE. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica (A); Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v) (B); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica (C); Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v) (D). Tecido adiposo corado com hematoxilina e eosina, aumento final de 100x, escala=100 μ m.

Na avaliação da adiposidade (fig. 36A), aferida pelo percentual de tecido adiposo epididimal (TAE) em relação ao peso corporal, observou-se aumento no grupo DIO, em relação aos grupos Controle e Colite, resultado esse já esperado. O grupo Colite+DIO apresentou adiposidade intermediária. A área dos adipócitos (fig. 36B) apresentou resultado semelhante. Embora a adiposidade e área do adipócito tenham sido menores no grupo Colite + DIO

Resultados

comparado ao grupo DIO, o número de estruturas em forma de coroa foi maior no primeiro (fig. 36C), sugerindo o efeito pró-inflamatório da colite crônica no tecido adiposo.

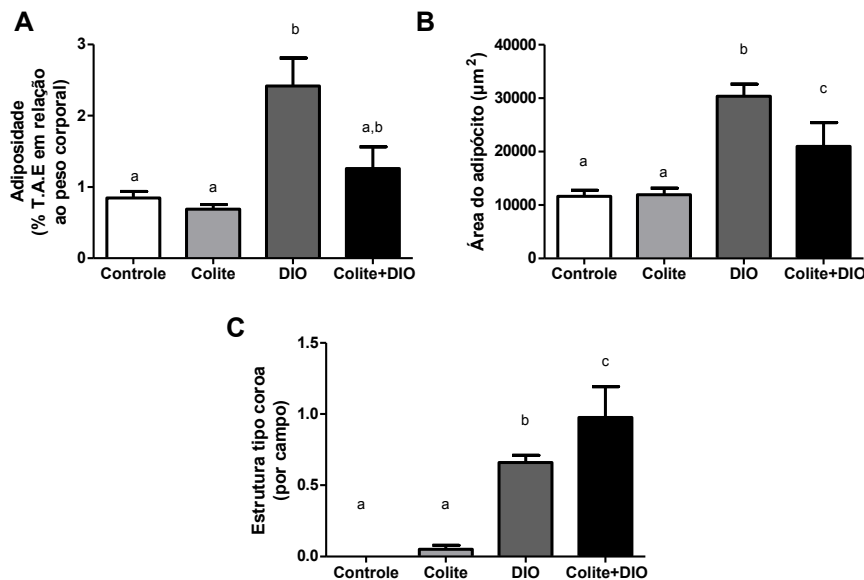


Figura 36: Adiposidade (A), área dos adipócitos (B) e estruturas em forma de coroa (C). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, n=12/9/12/9 para adiposidade, em percentual de tecido adiposo epididimal em relação ao peso corporal final e n=5/4/5/4 para área dos adipócitos, em µm², e estruturas em forma de coroa por campo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Concordante com o peso corporal, os níveis de leptina circulante foram maiores no grupo DIO em relação aos outros três grupos (fig. 37A). Em relação à expressão de leptina no tecido adiposo (fig. 37B), foi observado aumento nos grupos DIO e Colite+DIO, em relação ao grupo Colite, com valores intermediários para o grupo Controle.

A concentração sérica de adiponectina e resistina, também relacionadas à inflamação, e sua expressão pelo tecido adiposo também foram avaliadas.

Resultados

Em relação à resistina, observou-se expressão semelhante no tecido adiposo, mas a concentração sérica foi maior no grupo Colite em relação aos demais grupos (fig. 37C-D). Já a adiponectina, apesar de não terem sido observadas alterações na sua concentração sérica, apresentou diminuição na expressão no tecido adiposo dos animais de todos os grupos em relação ao controle (fig. 37E-F).

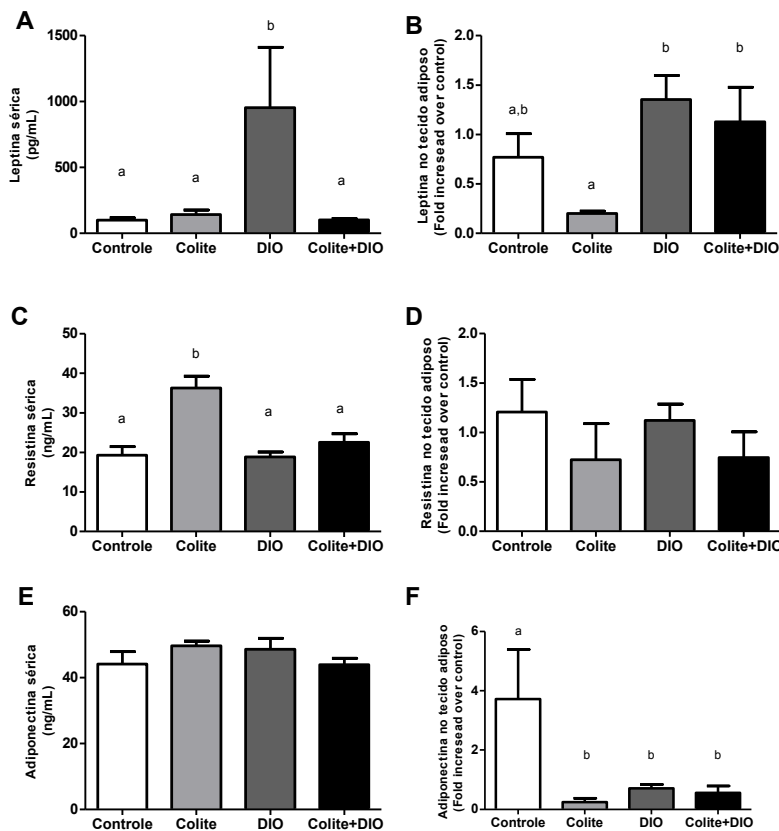


Figura 37: Concentração sérica e expressão no tecido adiposo, respectivamente de Leptina (A-B), resistina (C-D) e adiponectina (E-F) Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, n=5 por grupo, em pg/mL ou ng/mL para concentração no soro e em vezes aumentadas em relação ao controle, para expressão no tecido adiposo. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Análise do perfil inflamatório

Em seguida, o perfil inflamatório do tecido adiposo foi também analisado. Assim como na lâmina própria do cólon, no linfonodo cecal e no baço, foram avaliadas no tecido adiposo epididimal dos animais, por citometria de fluxo, a presença e ativação de marcadores para linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e macrófagos e para presença de linfócitos T reguladores e neutrófilos.

Foi observado aumento no percentual de monócitos e macrófagos totais (MOMA+) no grupo DIO em relação aos grupos Controle e Colite e um aumento ainda maior no grupo Colite+DIO (fig. 38A), corroborando o dado de estruturas em forma de coroa. Quando avaliada a ativação dos macrófagos (MOMA+CD80+) observou-se aumento semelhante nos grupos DIO e Colite+DIO em relação aos grupos Controle e Colite (fig. 38B).

Foi observado aumento no percentual de neutrófilos (GR1+) nos grupos Colite, DIO e Colite+DIO em relação ao Controle (fig. 38C).

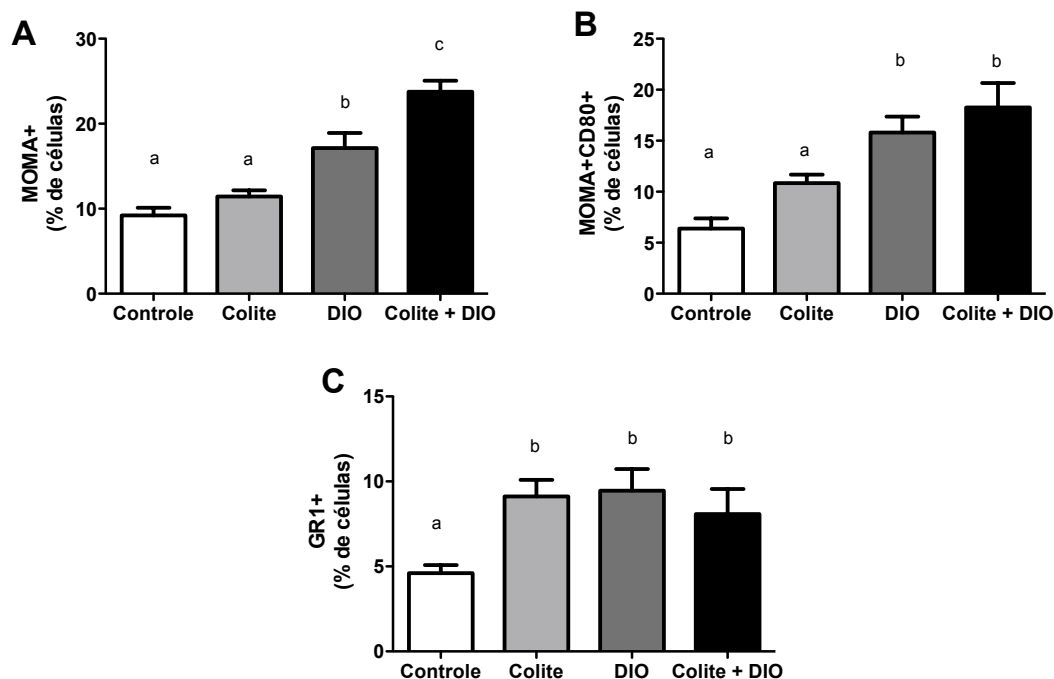


Figura 38: Porcentagem de macrófagos e monócitos totais (A), macrófagos ativados (B) e neutrófilos (C) no tecido adiposo. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Em relação aos linfócitos T (fig. 39), foi observado alteração apenas no percentual de linfócitos T auxiliares ativados (CD4+CD69+) no tecido adiposo. Esse tipo celular encontra-se aumentado no grupo Colite+DIO, em relação aos grupos Controle e Colite (fig 39B). Não foi observada diferença entre os grupos no percentual de linfócito T auxiliar total (CD4+), linfócito T citotóxico total (CD8+) e ativado (CD8+CD69+) e linfócito T regulador (CD4+CD25+LAP+) (fig. 39A-E).

Resultados

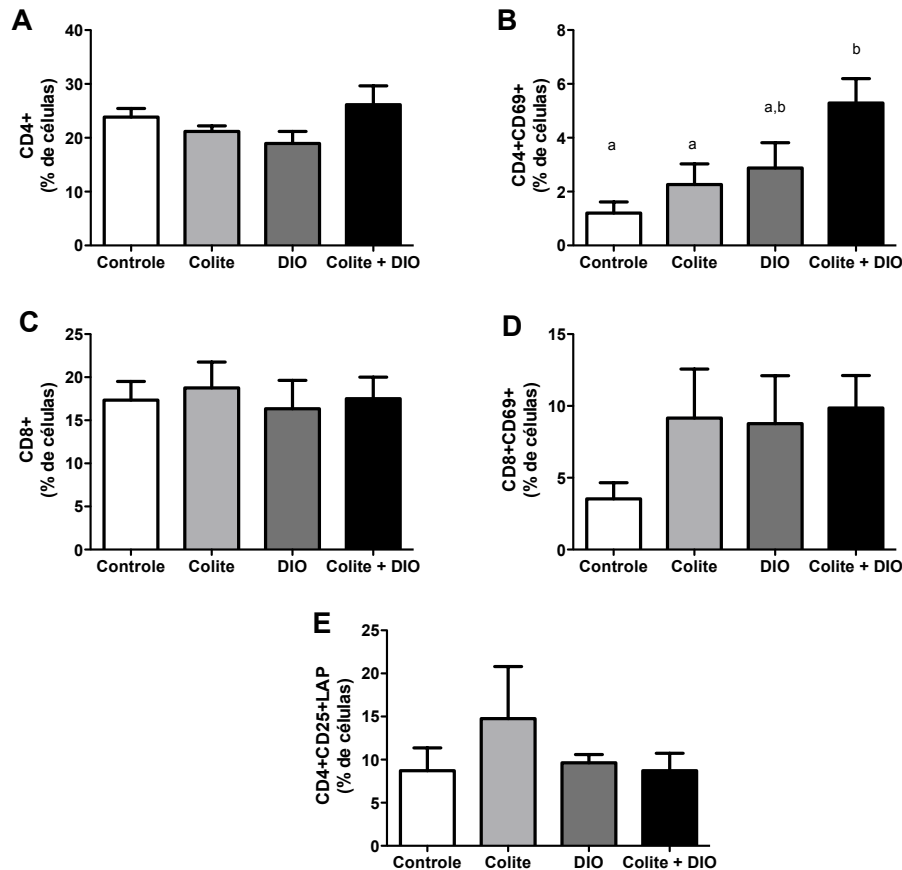


Figura 39: Porcentagem de linfócito T no tecido adiposo. Linfócito T auxiliar total (A) e ativado (B), linfócito T citotóxico total (C) e ativado (D) e linfócito T regulador (E). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam p<0,05.

Quando avaliados os linfócitos B totais (CD19+) e ativados (CD19+CD21+), não foram observadas diferenças entre os grupos (fig. 40).

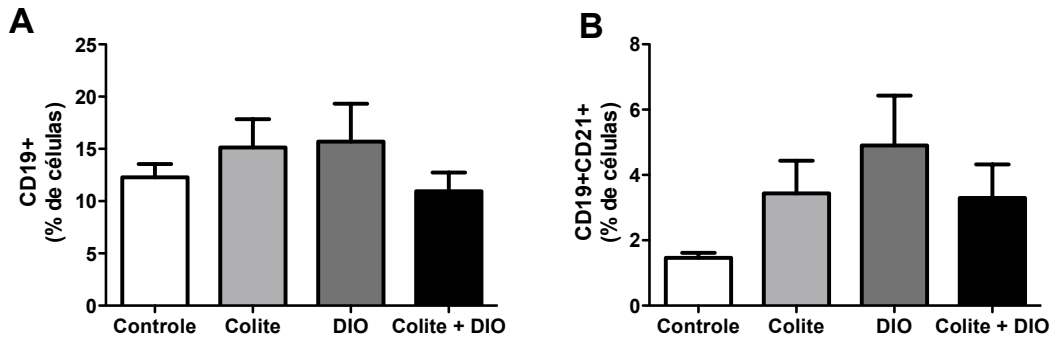


Figura 40: Porcentagem de linfócito B total (A) e ativados (B) no tecido adiposo. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em percentual de células. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Sem diferença estatística.

Após a confirmação do aumento da ativação de macrófagos e linfócitos CD4+ no tecido adiposo, foi avaliada a concentração das citocinas TNF e IL-6 e da quimiocina MCP-1/CCL-2 em extrato do tecido adiposo (fig. 41). O resultado foi normalizado pela quantidade de proteínas no extrato para permitir a comparação.

Quando comparados os grupos DIO e Controle, observou-se aumento no grupo DIO apenas do TNF (fig. 41A). Não houve diferença, entre esses dois grupos, para as outras citocinas analisadas (fig. 41).

Em relação ao grupo Colite+DIO não foram observadas diferenças nas citocinas analisadas e CCL-2/MCP-1, em relação ao controle (fig. 41).

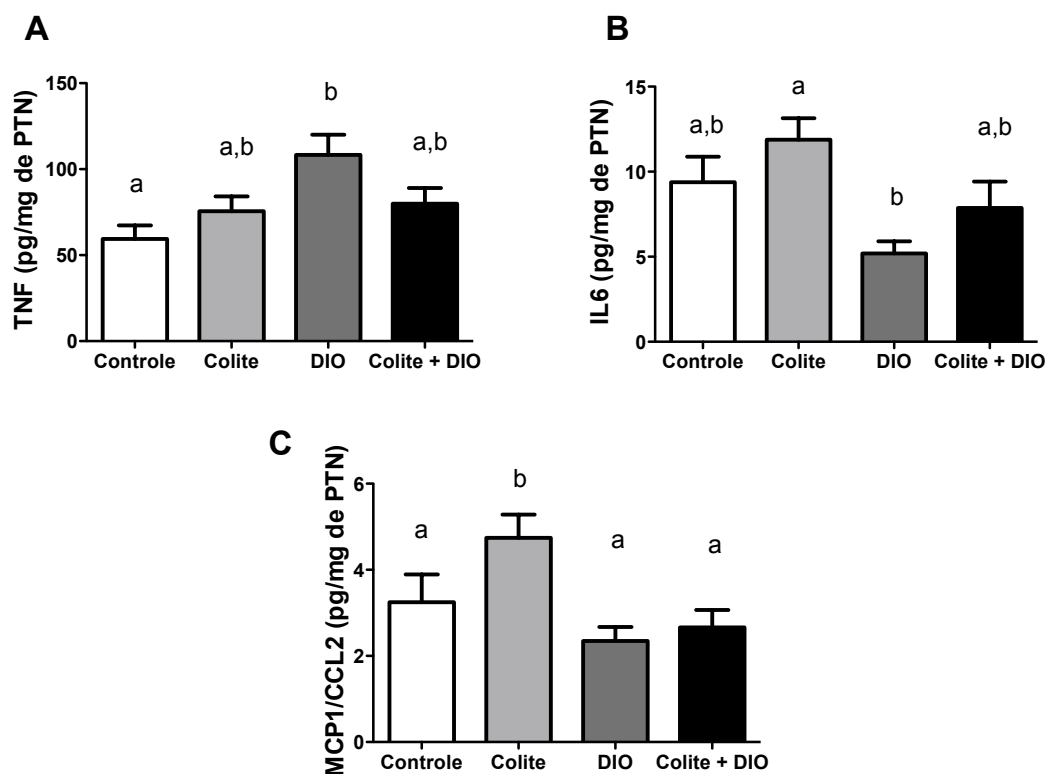


Figura 41: Concentração de citocinas e quimiocina inflamatória no tecido adiposo. TNF (A), IL6 (B) e MCP1/CCL2 (C). Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em pg de citocina/quimiocina por mg de proteína. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

Como não foi observada alteração na liberação de TNF, IL-6 e MCP1/CCL2, a expressão dessas foi avaliada (fig. 42). Em concordância com os dados de citometria de fluxo, nos quais foi observada maior quantidade de células do sistema imune no grupo Colite+DIO, foi observado aumento significativo da expressão de TNF, IL-6 e MCP1/CCL2 nesse grupo em relação aos demais (fig. 42A-C).

O TLR4 é ativado por lipopolissacarídeos, mas também pode ser ativado por ácidos graxos¹²³. Em nosso trabalho, vimos que a expressão do TLR4 foi

Resultados

maior no grupo Colite+DIO em relação ao grupo Controle, sendo os valores dos grupos Colite e DIO intermediários (fig. 42D).

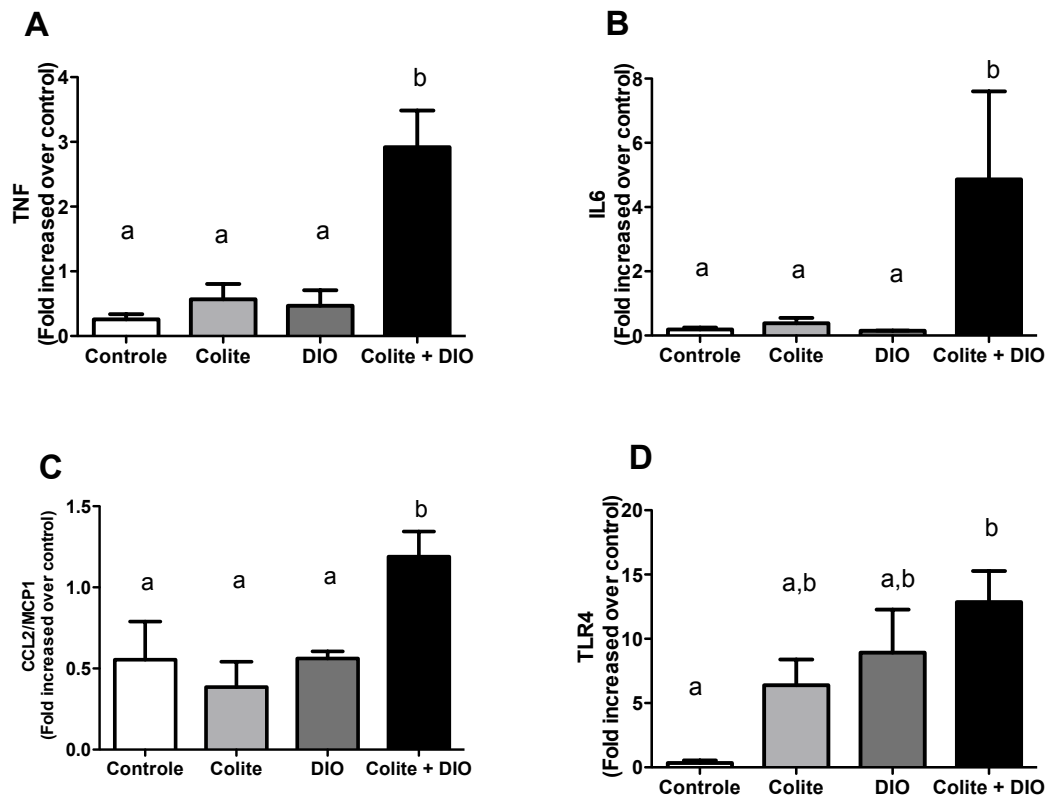


Figura 42: Expressão de TNF (A), IL6 (B), MCP1/CCL2 (C) e TLR4 (D) no tecido adiposo. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média \pm erro padrão, em vezes aumentadas em relação ao controle. n=5 por grupo. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

A repercussão à distância da colite crônica foi confirmada pela microscopia intravital realizada na microcirculação do tecido adiposo. Os resultados revelam o aumento do rolamento e da adesão leucocitária dos animais do grupo Colite+DIO em relação ao grupo Controle. Os demais grupos (grupo Colite e grupo DIO) foram mantidos em níveis intermediários (fig. 43A-B). De forma a explicar e confirmar este resultado, avaliou-se a expressão de

ICAM1 e VCAM1 nesse tecido (fig. 43C-D). A expressão de ambas estava aumentada no grupo Colite+DIO em relação aos outros 3 grupos.

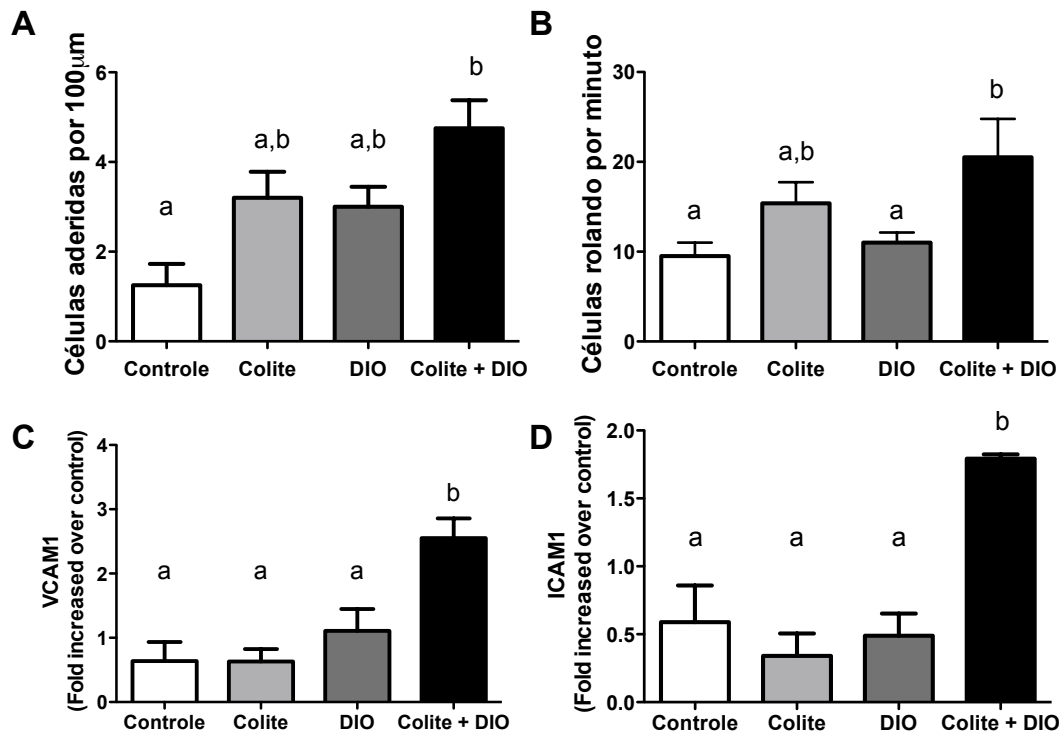


Figura 43: Adesão (A) e rolamento (B) de leucócitos, expressão de ICAM1 (C) e VCAM1 (D), em tecido adiposo. Controle: Dieta comercial e sem indução de colite crônica; Colite: Dieta comercial e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v); DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e sem indução de colite crônica; Colite+DIO: Dieta hiperlipídica indutora de obesidade e com indução de colite crônica (2 ciclos, DSS 3% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, n=4-6 por grupo, em vezes aumentadas em relação ao controle. Teste: ANOVA one-way e post-test Newman-Keuls. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

7. DISCUSSÃO

Nosso trabalho mostrou que a dieta hiperlipídica prolonga e agrava as manifestações da colite crônica, levando ao aumento do estado pró-inflamatório do tecido adiposo. Em nossos experimentos, as análises foram realizadas três semanas após o segundo oferecimento de DSS (oito semanas experimentais totais) para permitir a avaliação dessa relação fora da fase aguda da colite, na qual anormalidades metabólicas são mais intensas. Da mesma maneira, nós obtivemos uma obesidade moderada derivada da dieta hiperlipídica, como visto pelo ganho de peso, adiposidade e área no adipócito no grupo DIO.

O objetivo do presente trabalho foi elucidar os efeitos da interação da obesidade e da colite crônica na inflamação sistêmica. Para tal, usamos dieta hiperlipídica indutora de obesidade⁹⁴ e dextrano sulfato de sódio (DSS) 3%p/v em água como indutor da colite crônica^{28, 29}. Percebeu-se maior consumo calórico nos animais do grupo DIO e Colite+DIO, o que era esperado visto que a densidade calórica da dieta hiperlipídica indutora de obesidade utilizada (5,27Kcal/g) é superior ao dobro da densidade calórica da ração comercial (2,18kcal/g). Com essa ingestão aumentada, esperava-se um aumento no ganho de peso¹²⁴, o que foi observado no grupo DIO em relação ao controle. Já o grupo Colite+DIO apresentou um ganho de peso intermediário entre o grupo DIO e os grupos Controle e Colite, apesar da ingestão calórica total no experimento ter sido a mesma do grupo DIO. Isso pode ser explicado pela perda de peso durante os períodos de indução da colite aguda (oferecimento do DSS). Já é descrito na literatura a perda de peso durante indução de colite com DSS, sendo esse um sinal clínico da indução da doença²⁹. Em relação à ingestão líquida, foi observada menor ingestão nos grupos que receberam a

dieta hiperlipídica. Tal fato já foi observado em outros experimentos em nosso laboratório e já descrito na literatura¹²⁵. Durante o período de indução da colite aguda, observou-se que o grupo Colite+DIO ingeriu menor quantidade de DSS 3%p/v em relação ao grupo Colite. Entretanto, como observado na avaliação da morfologia do cólon e no escore histopatológico, essa menor ingestão do agente indutor da doença não causou problemas na indução da colite ao grupo Colite+DIO, visto que esse apresentou um quadro histopatológico pior que o grupo Colite, além de apresentar sangramento anal, perda de peso e encurtamento do cólon, sinais clínicos esses característicos da indução de colite em modelos animais²⁹. Dessa forma, a quantidade ingerida de DSS 3%p/v pelo grupo Colite+DIO foi suficiente para induzir a colite crônica.

A obesidade pode levar a diversas complicações no metabolismo de lipídeos e glicose, como o desenvolvimento de hiperlipidemia, resistência insulínica, diabetes tipo 2, culminando em síndrome metabólica e doenças cardiovasculares⁴¹. Por esse motivo, pesquisamos nesse trabalho se a obesidade induzida por dieta, juntamente com a colite crônica poderia afetar os níveis dos lipídeos circulantes e a homeostase da glicose. Não foi observado em nosso estudo, alteração no perfil lipídico. Camundongos C57BL/6 já foram descritos na literatura como resistentes ao desenvolvimento de hiperlipidemias^{126, 127}, o que pode explicar nosso resultado. Em se tratando da homeostase da glicose, uma leve alteração, decorrente da dieta hiperlipídica indutora de obesidade¹²⁴, foi vista nos grupos DIO e Colite+DIO, o que é concordante com o grau leve de obesidade induzida nesse estudo.

A análise do cólon mostrou um quadro inflamatório no grupo Colite, que se tornou mais intenso quando associado à dieta indutora de obesidade.

Quando realizada a avaliação histopatológica do cólon percebeu-se piora na arquitetura da mucosa, no infiltrado inflamatório e no espessamento do músculo, do grupo Colite+DIO em relação ao grupo Colite, estando esses dois grupos piores que os grupos DIO e Controle. A piora nos grupos que receberam o DSS para indução da colite crônica já era esperada, visto que essa deterioração da mucosa colônica é sinal da indução da doença²⁹. Em relação à dieta hiperlipídica indutora de obesidade, percebeu-se que ela, por si só, não afeta a mucosa do cólon. Porém quando adicionada ao DSS, a lesão no cólon é ainda maior do que quando o DSS é oferecido sozinho. Esse resultado está em conformidade com a literatura¹²⁸, que mostra que a dieta hiperlipídica é fator de risco para o desenvolvimento de retocolite ulcerativa.

Quando avaliado o tecido adiposo e a evolução da obesidade, foi observado que a adiposidade e a área dos adipócitos dos animais do grupo DIO foi maior em relação aos grupos Controle e Colite. Esse resultado era esperado visto que esse grupo apresentou maior ingestão calórica e o aumento na ingestão de gorduras saturadas que leva ao aumento do ganho de tecido adiposo⁴¹. Já o grupo Colite+DIO apresentou resultados de adiposidade e área de adipócitos intermediários entre o grupo DIO e os grupos Controle e Colite. Apesar dos animais do grupo Colite+DIO apresentarem ingestão total semelhante ao grupo DIO, o menor ganho de peso, juntamente com a menor adiposidade deve-se, provavelmente, à maior demanda energética gasta decorrente da colite, visto que doenças inflamatórias são hipermetabólicas¹²⁹. Resultado semelhante, já foi descrito na literatura. Eles observaram que animais com colite apresentavam menor ganho de adiposidade e peso final em relação aos animais controle, mesmo com a ingestão igual, devido à maior taxa

de lipólise no tecido adiposo para liberação de ácidos graxos como fonte de energia¹⁰³.

Disfunções no sistema imune já são descritas tanto na obesidade^{45, 46} quanto na retocolite ulcerativa^{8, 13}. Em relação ao células imunes e citocinas, foi observado em nosso trabalho, de forma geral, que os animais do grupo Colite+DIO estavam mais inflamados em relação aos outros grupos. Quando avaliado o cólon desses animais, foi observado, aumento no percentual de macrófagos ativados, de neutrófilos, de linfócitos T auxiliares totais e ativados, de linfócitos T citotóxicos totais e ativados, e de linfócitos B totais e ativados. Em relação às citocinas avaliadas no cólon, todas se apresentaram aumentadas tanto no grupo Colite quanto no grupo Colite+DIO. O aumento de citocinas da resposta Th2 (IL-4, IL-10, IL-6)^{9, 33}, da resposta Th1³³ (IFN γ) e de TNF produzidas por macrófagos⁹ no cólon de animais com colite já foram descritas na literatura. Já no tecido adiposo epididimal dos animais desse grupo observou-se que, apesar dos animais do grupo Colite+DIO apresentarem menor percentual de tecido adiposo em relação ao grupo DIO, percebe-se, aumento do rolamento e adesão de leucócitos, concordantes com os achados do aumento na expressão das moléculas de adesão ICAM1 e VCAM1 e aumento das células tanto da imunidade inata (monócitos, macrófagos e neutrófilos) quanto da imunidade adaptativa (linfócitos T auxiliares ativados). Esse panoramara se refletiu também no aumento da expressão de TNF, MCP1/CCL2 e IL-6 decorrente da associação da colite e obesidade.

Considerando apenas o grupo DIO em relação ao controle, observou-se aumento no percentual de monócitos e macrófagos totais, macrófagos ativados, neutrófilos e liberação de TNF, resultados esses já esperados e já

descritos na literatura^{41, 43, 77, 84}. Em relação às IL-6 e MCP1/CCL2, observou-se que sua liberação estava igual ao controle, o que é controverso em relação ao já descrito na literatura, já que esses descrevem o aumento da liberação de IL6 e MCP1/CCL2 com o aumento do tecido adiposo^{41, 84}. Uma possível explicação para isso é que talvez o tempo ou o grau da obesidade induzida no experimento não tenham sido suficientes para que uma expressão e liberação aumentada dessas citocina e quimiocina fossem detectadas.

Considerando o grupo Colite em relação ao grupo Controle, foi observado que os neutrófilos estavam aumentados no tecido adiposo dos animais desse grupo, bem como a liberação de MCP1/CCL2. Sendo os neutrófilos células essenciais na imunidade inata e oferecendo uma defesa imediata contra organismos invasores¹³⁰, esse resultado é um indicativo de como uma inflamação crônica, como a colite, pode afetar outros órgãos, como o tecido adiposo e não apenas o tecido alvo da doença. Outra evidência dessa ação inflamatória em outros órgãos é a quimiocina MCP1/CCL2 estar aumentada no cólon dos animais que apresentaram adiposidade aumentada (grupo DIO) em relação aos animais do grupo Controle.

Ainda foi observado aumento de neutrófilos no baço e linfonodo cecal dos animais do grupo Colite+DIO e aumento no percentual de linfócitos e monócitos circulantes, indicativos de aumento da inflamação sistêmica.

O TLR4 tem um papel importante na resposta inflamatória intestinal porque é ativado por lipopolissacarídeos produzidos pelas bactérias colônicas e por ácidos graxos saturados, ambos presentes nos animais do grupo Colite+DIO. A ativação do TLR4 em células colônicas leva ao aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como visto em nosso

estudo, provavelmente pela ativação da via do NF- κ B¹²³, levando ao aumento da permeabilidade intestinal na colite crônica. Em consequência disso, os antígenos luminiais ganham acesso à lâmina própria com a diferenciação e ativação de células T *naive* em T efectoras e produção de citocinas inflamatórias. Os macrófagos na lâmina própria são estimulados por essas citocinas e passam a secretar TNF e IL-6, aumentando ainda mais a inflamação neste local⁹. Nosso estudo corrobora esta sequência de eventos, uma vez que ocorreu aumento da permeabilidade intestinal, aumento da expressão de TLR4 no cólon, aumento do infiltrado de macrófagos, linfócitos e neutrófilos e aumento da liberação de citocinas inflamatórias. Além disso, observamos aumento da expressão de ZO-1, o que pode sugerir um intenso reparo na mucosa após o dano induzido pelo DSS. O aumento da expressão de ZO-1 em mucosa intestinal com grandes danos já foi descrita anteriormente pelo nosso grupo¹³¹.

Já é descrito na literatura que tanto a obesidade quanto a dieta hiperlipídica aumentam a permeabilidade intestinal^{132, 133}. Apesar de ser descrito na literatura várias hipóteses^{65, 85-89}, como a alteração da expressão das proteínas das junções firmes como claudinas, ocludinas e ZO1^{134, 135}, os mecanismos pelos quais a obesidade leva ao aumento da permeabilidade intestinal ainda não estão bem esclarecidos. A persistência dos altos níveis de citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo podem causar um desequilíbrio na função de barreira intestinal pela alteração das proteínas das junções firmes¹³². Essas proteínas regulam o transporte seletivo de íons, solutos e peptídeos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Assim, a associação entre a obesidade induzida por dieta e a colite crônica pode

aumentar o transporte de patógenos ou seus derivados (como LPS), que antes eram restritos pela barreira intestinal, para a circulação sistêmica, resultando em ativação de vias inflamatórias em órgãos periféricos^{14, 136}.

Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém células do estroma vascular, como monócitos e linfócitos, responsáveis pelo equilíbrio imunológico⁸³. A expansão do tecido adiposo leva ao desequilíbrio imunológico pelo aumento da expressão e ativação do TLR4, que leva à ativação do NFκB e consequente produção de citocinas inflamatórias. Além disso, ocorre influxo de células da resposta imune adaptativa, como linfócitos Th1. Esses produzem citocinas e quimiocinas que atraem os macrófagos, levando ao influxo desses para o tecido adiposo. Os macrófagos passam, então, a também secretar citocinas inflamatórias, como TNF e IL-6, fazendo com que o tecido adiposo se torne cada vez mais inflamado^{45, 46, 83}. Em nosso estudo, o aumento da inflamação no tecido adiposo visto no grupo Colite+DIO foi confirmado pelo aumento das estruturas em forma de coroa (EFC) de macrófagos, macrófagos ativados, linfócitos CD4+ ativados e neutrófilos e uma maior expressão de moléculas de adesão (ICAM1 e VCAM1), TNF, IL-6, MCP1/CCL2 e TLR4. Esse cenário pró-inflamatório foi confirmado *in vivo*, pelo aumento do rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura do tecido adiposo.

Embora os animais do grupo Colite+DIO apresentem menos adiposidade e área de adipócito, quando comparado aos animais do grupo DIO, o número de estruturas em forma de coroa (EFC) de macrófagos foi maior no tecido adiposo desses animais quando comparados aos outros grupos. As EFC representam a conclusão relativamente longa da vida dos adipócitos e está relacionada às respostas dos macrófagos às alterações no

tecido adiposo que levam à morte dos adipócitos ou apoptose¹³⁷. Em adição às EFC, o aumento da ativação de linfócitos T CD4+ no tecido adiposo dos animais do grupo Colite+DIO leva ao aumento da liberação de MCP1/CCL2⁴⁵ nesse tecido, que induz a migração e ativação de macrófagos e aumentam e perpetuam a inflamação¹³⁷.

Foi observado um aumento da resistina sérica no grupo Colite que não foi observado no grupo Colite+DIO. Aumento de resistina no soro de pacientes com retocolite ulcerativa já foi descrito^{109, 110, 112}, e é um marcador inicial de inflamação¹⁰⁹. A resistina também é produzida por células mononucleares do sangue periférico e macrófagos¹³⁸. Portanto, os níveis séricos de resistina não foram correlacionados com a expressão da mesma no tecido adiposo epididimal. A ausência do aumento de resistina no grupo DIO está em desacordo com dados da literatura¹³⁹. Essa discrepância pode ser devido à duração do presente experimento e ao grau moderado de obesidade observado, que não foram suficientes para induzir mudanças nesse parâmetro.

Embora os níveis de adiponectina circulantes tenham sido similares entre os grupos, sua expressão no tecido adiposo estava reduzida em todos os grupos em relação ao grupo Controle. Esse fato já foi anteriormente descrito para animais que recebem dieta hiperlipídica indutora de obesidade¹⁴⁰, mas seu significado patológico em doenças inflamatórias intestinais ainda é controverso. Estudos clínicos já mostraram tanto aumento^{110, 111} quanto diminuição¹¹² da adiponectina sérica em pacientes com retocolite ulcerativa. Estudos experimentais são ainda mais controversos. Dois estudos usando animais com deleção do gene para adiponectina com colite induzida por DSS mostraram resultados opostos. Um estudo encontrou efeito protetor da

adiponectina, visto que o animal nocaute apresentou colite mais severa¹⁰⁵, enquanto o outro estudo mostrou o efeito deletério da adiponectina, visto que sua deleção gerou melhora no quadro da colite induzida por DSS¹⁰⁶. Fatores pró-inflamatórios podem diminuir a expressão de adiponectina¹⁴¹, o que pode explicar essa diminuição da expressão no tecido adiposo epididimal.

A leptina é produzida pelo tecido adiposo proporcionalmente à massa de gordura corporal e controla o apetite e gasto energético através de vias hipotalâmicas⁵⁹. A leptina também modula diversas respostas imunes e inflamatórias, como ativação de monócitos e linfócitos, fagocitose e produção de TNF, IL-6 e INF γ por células mononucleares do sangue periférico^{50, 59, 142}. Em nosso trabalho, foi observado aumento na expressão de leptina no tecido adiposo em ambos os grupos que receberam dieta hiperlipídica indutora de obesidade quando comparados ao grupo Colite. Entretanto, o aumento na concentração sérica de leptina foi observado apenas no grupo DIO e não no grupo Colite+DIO. Isso pode ser devido ao aumento da ligação leptina-ObRb no cólon dos animais do grupo Colite+DIO, visto que esse receptor é super-expresso em cólons inflamados de animais com colite induzida por DSS^{53, 143}, assim como visto em nossos resultados.

Um estudo realizado anteriormente reportou o aumento da expressão do receptor de leptina no cólon de animais com câncer de cólon secundário à colite induzida por DSS. Esse resultado está de acordo com o nosso e reforça a associação da leptina e inflamação¹⁰⁸.

Sendo assim, acredita-se que, em nosso estudo, a leptina possa estar se ligando ao seu receptor (Ob-Rb) super-expresso no cólon dos animais do grupo Colite+DIO, atuando na manutenção e exacerbação da inflamação local.

Considerando todos os resultados encontrados, nossa hipótese é que esteja ocorrendo uma relação cruzada entre componentes inflamatórios da colite e da obesidade, levando à exacerbação recíproca. Esta interrelação tem como um ponto chave a maior captação da leptina pelo cólon via receptores Ob-Rb super-expressos pela colite. A leptina então desencadeará ativação de células do sistema imune com a produção de IL-6 e IL1 β ¹⁴⁴, sustentando a inflamação intestinal causada pela colite crônica. Por outro lado, as alterações na permeabilidade intestinal desencadeadas pela colite e exacerbadas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica, permitem a maior entrada na circulação de LPS e ácidos graxos alimentares. Ao alcançarem o tecido adiposo, ácidos graxos e LPS ligam-se aos receptores TLR4 na superfície de adipócitos e macrófagos nesse tecido expandido, ativando assim a sinalização do fator nuclear NF κ B, reforçando o estado de inflamação sistêmica.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações finais

Em conclusão, ambas, colite crônica e obesidade induzida por dieta hiperlipídica são capazes de ativar e potencializar reciprocamente os parâmetros inflamatórios estudados nesse trabalho.

A produção de células e citocinas pró-inflamatórias e receptores ligados à inflamação em animais obesos com indução da colite crônica é aumentada no cólon, como demonstrado pelo aumento do percentual de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, e aumento da expressão do receptor de leptina (OB-R) e também no tecido adiposo, visto pelo aumento do percentual de células TCD4+ ativadas e expressão aumentada de TNF, IL-6 e MCP-1/CCL2. A permeabilidade intestinal também está aumentada quando ocorre associação das doenças.

Esses dados mostram a importância do controle da obesidade e da colite para reduzir o estado inflamatório que agrava a evolução de tais doenças.

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

9. REFERÊNCIAS

Referências

1. Dangelo, FAttini. *Anatomia humana básica*. 1988.
2. Mahan L, Escott-Stump S. *Krause, alimentos, nutrição e dietoterapia*. São Paulo; 2002.
3. Cotran R, Kumar V, Robbins S. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro; 1996.
4. Vieira ÉLM. Efeito da administração oral de butirato de sódio na colite ulcerativa induzida por dss em animais c57bl/6 e deficientes para tlr4: Caracterização clínica, histopatológica e de células do sistema imune. *Departamento de Bioquímica e Imunologia*. 2008:157
5. Madi K, Zaltman C, Takiya C. Arquitetura da mucosa intestinal e sua plasticidade. In: Elia C, Souza H, eds. *Imunologia da mucosa intestinal da bancada ao leito*. Belo Horizonte: Atheneu; 2001:187.
6. Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:362-381
7. Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2012;3:27-43
8. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369:1627-1640
9. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*. 2007;149:173-186
10. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: Role of diet, microbiota, life style. *Transl Res*. 2012;160:29-44
11. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007;6:546-551
12. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:298-306
13. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369:1641-1657
14. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14:390-400
15. Sands BE. Inflammatory bowel disease: Past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2007;42:16-25
16. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:521-533
17. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365:1713-1725
18. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*. 2000;35:154-167
19. Spencer AU, Yang H, Haxhija EQ, Wildhaber BE, Greenson JK, Teitelbaum DH. Reduced severity of a mouse colitis model with angiotensin converting enzyme inhibition. *Dig Dis Sci*. 2007;52:1060-1070
20. Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1165:294-300
21. Lakatos L, Lakatos PL. [medical therapy of inflammatory bowel diseases: Ulcerative colitis]. *Orv Hetil*. 2007;148:1163-1170
22. Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: A role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest*. 2003;112:648-651

Referências

23. van Lierop PP, Samsom JN, Escher JC, Nieuwenhuis EE. Role of the innate immune system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:142-151
24. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:79-94
25. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* 2000;51:2-9
26. Allison TJ, Garboczi DN. Structure of gammadelta t cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Mol Immunol.* 2002;38:1051-1061
27. Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, Pamukcu R, Moore S, Lynch RG. Rapid development of colitis in nsaid-treated il-10-deficient mice. *Gastroenterology.* 2002;123:1527-1542
28. Li H, Lelliott C, Hakansson P, Ploj K, Tuneld A, Verolin-Johansson M, Benthem L, Carlsson B, Storlien L, Michaelsson E. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism.* 2008;57:1704-1710
29. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98:694-702
30. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol.* 1999;11:648-656
31. Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, Watanabe M. Myd88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol.* 2005;40:16-23
32. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118:229-241
33. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (dss) is characterized by th1 and th2 cytokines. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:385-391
34. Sartor RB. Mechanisms of disease: Pathogenesis of crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:390-407
35. Molodecky NA, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG, Alberta Inflammatory Bowel Disease C. Challenges associated with identifying the environmental determinants of the inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1792-1799
36. Investigators IBDiES, Tjonneland A, Overvad K, Bergmann MM, Nagel G, Linseisen J, Hallmans G, Palmqvist R, Sjodin H, Hagglund G, Berglund G, Lindgren S, Grip O, Palli D, Day NE, Khaw KT, Bingham S, Riboli E, Kennedy H, Hart A. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: A nested case-control study within a european prospective cohort study. *Gut.* 2009;58:1606-1611
37. Vieira EL, Leonel AJ, Sad AP, Beltrao NR, Costa TF, Ferreira TM, Gomes-Santos AC, Faria AM, Peluzio MC, Cara DC, Alvarez-Leite JI. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem.* 2012;23:430-436
38. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, Israel D, Mack D, Ghadirian P, Deslandres C, Chotard V, Budai B, Law L,

- Levy E, Seidman EG. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2016-2025
39. Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi AR. Review article: Diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30:99-112
 40. Ji Y, Sakata Y, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14:315-321
 41. Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: Mechanisms of action and implications. *J Nutr*. 2009;139:1-4
 42. Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: A neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;174:1-4
 43. O'Rourke RW. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery*. 2009;145:255-259
 44. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 2012;33:26-34
 45. Kaminski DA, Randall TD. Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*. 31:384-390
 46. Schaffler A, Scholmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*. 31:228-235
 47. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:85-97
 48. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004;30:294-309
 49. Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol*. 2007;2:229-237
 50. Juge-Aubry CE, Meier CA. Immunomodulatory actions of leptin. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;194:1-7
 51. Sahu A. Intracellular leptin-signaling pathways in hypothalamic neurons: The emerging role of phosphatidylinositol-3 kinase-phosphodiesterase-3b-camp pathway. *Neuroendocrinology*. 2011;93:201-210
 52. Yingzhong Y, Droma Y, Rili G, Kubo K. Regulation of body weight by leptin, with special reference to hypoxia-induced regulation. *Intern Med*. 2006;45:941-946
 53. Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Munoz-Navas M, Barber A, Lostao MP. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut*. 2002;50:797-802
 54. Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martin-Romero C, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:568343
 55. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316:129-139
 56. Febbraio MA. Gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J Clin Invest*. 2007;117:841-849
 57. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8:1288-1295
 58. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, de Heredia FP, Tebar FJ. Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutr*. 2007;10:1145-1150

59. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: A regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19:547-566
60. Rocha VZ, Libby P. The multiple facets of the fat tissue. *Thyroid.* 2008;18:175-183
61. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:4-12
62. OMS. Obesity.06/07/2012
63. OMS. Obesity and overweight. 2008;06/07/2012
64. Brasil. Vigitel brasil 2011: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. 2011
65. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:460-469
66. Mendonca CP, dos Anjos LA. [dietary and physical activity factors as determinants of the increase in overweight/obesity in brazil]. *Cad Saude Publica.* 2004;20:698-709
67. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jonsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Warnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr.* 2011;106 Suppl 3:S5-78
68. Ajuwon KM, Spurlock ME. Palmitate activates the nf-kappab transcription factor and induces il-6 and tnfalpa expression in 3t3-l1 adipocytes. *J Nutr.* 2005;135:1841-1846
69. Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS, Hwang DH. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through tlr4. *J Immunol.* 2005;174:5390-5397
70. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care.* 2003;26:1362-1368
71. Pereira SS, Teixeira LG, Aguilar EC, Matoso RO, Soares FL, Ferreira AV, Alvarez-Leite JI. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in c57bl/6 and apoe-/- mice fed high fat diet. *Anim Sci J.* 2012;83:549-555
72. Marsh BJ, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptors: Novel pharmacological targets for the treatment of neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8:8-13
73. Lien LF, Guyton JR. Metabolic syndrome. *Dermatol Ther.* 2008;21:362-375
74. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:S64-73
75. Ramalho R, Guimaraes C. [the role of adipose tissue and macrophages in chronic inflammation associated with obesity: Clinical implications]. *Acta Med Port.* 2008;21:489-496
76. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:939-949
77. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res.* 2008;49:1894-1903
78. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB,

- Hotamisligil GS, Shi GP. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 2009;15:940-945
79. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1304-1310
 80. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15:921-929
 81. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. Cd8+ effector t cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;15:914-920
 82. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory t cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15:930-939
 83. Sell H, Eckel J. Adipose tissue inflammation: Novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13:366-370
 84. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1785-1788
 85. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2011;130:202-212
 86. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gerard P, Harach T, Moser M, Raymond F, Mansourian R, Chou CJ. Germ-free c57bl/6j mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J*. 2010;24:4948-4959
 87. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15718-15723
 88. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:979-984
 89. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761-1772
 90. 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;372:425-432
 91. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-r. *Cell*. 1995;83:1263-1271
 92. Kleyan PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P,

- Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Carlson GA, Duyk GM, Moore KJ. Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: A member of a novel gene family. *Cell*. 1996;85:281-290
93. Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse *agouti* locus. *Cell*. 1992;71:1195-1204
94. Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, Kokura S, Yoshikawa T. A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue precedes the development of fatty liver and insulin resistance in high-fat diet-fed male *kk/ta* mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;42:150-157
95. Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. Hyperproinsulinaemia in obese *fat/fat* mice associated with a carboxypeptidase *e* mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*. 1995;10:135-142
96. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med*. 2005;56:443-458
97. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: The 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:529-644
98. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:798-808
99. Long MD, Crandall WV, Leibowitz IH, Duffy L, del Rosario F, Kim SC, Integlia MJ, Berman J, Grunow J, Colletti RB, Schoen BT, Patel AS, Baron H, Israel E, Russell G, Ali S, Herfarth HH, Martin C, Kappelman MD, ImproveCareNow Collaborative for Pediatric IBD. Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:2162-2168
100. Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G. Development of intestinal inflammation in double *il-10*- and *leptin*-deficient mice. *J Leukoc Biol*. 2004;76:782-786
101. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G. Leptin: A pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology*. 2002;122:2011-2025
102. Batra A, Okur B, Glauben R, Erben U, Ihbe J, Stroh T, Fedke I, Chang HD, Zeitz M, Siegmund B. Leptin: A critical regulator of *cd4+* t-cell polarization in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2010;151:56-62
103. Gambero A, Marostica M, Abdalla Saad MJ, Pedrazzoli J, Jr. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1357-1364
104. Hyland NP, Chambers AP, Keenan CM, Pittman QJ, Sharkey KA. Differential adipokine response in genetically predisposed lean and obese rats during inflammation: A role in modulating experimental colitis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G869-877
105. Nishihara T, Matsuda M, Araki H, Oshima K, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I. Effect of adiponectin on murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology*. 2006;131:853-861
106. Fayad R, Pini M, Sennello JA, Cabay RJ, Chan L, Xu A, Fantuzzi G. Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation. *Gastroenterology*. 2007;132:601-614
107. Miyamoto S, Tanaka T, Murakami A. Increased visceral fat mass and insulin signaling in colitis-related colon carcinogenesis model mice. *Chem Biol Interact*. 2010;183:271-275

108. Park SY, Kim JS, Seo YR, Sung MK. Effects of diet-induced obesity on colitis-associated colon tumor formation in *a/j* mice. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36:273-280
109. Konrad A, Lehrke M, Schachinger V, Seibold F, Stark R, Ochsenkuhn T, Parhofer KG, Goke B, Broedl UC. Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19:1070-1074
110. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:100-105
111. Weigert J, Obermeier F, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Aslanidis C, Rogler G, Ott C, Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:630-637
112. Valentini L, Wirth EK, Schweizer U, Hengstermann S, Schaper L, Koernicke T, Dietz E, Norman K, Buning C, Winklhofer-Roob BM, Lochs H, Ockenga J. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2009;25:172-181
113. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974;20:470-475
114. Fazio S, Babaev VR, Murray AB, Hasty AH, Carter KJ, Gleaves LA, Atkinson JB, Linton MF. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein e null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4647-4652
115. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*. 1982;28:2077-2080
116. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RA. Mas deficiency in *fvb/n* mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008;57:340-347
117. 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;28:412-419
118. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, Laplant B, Dewald GW, Tschumper RC, Jelinek DF, Witzig TE, Kay NE. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009;27:1844-1849
119. McCafferty DM, Sihota E, Muscara M, Wallace JL, Sharkey KA, Kubes P. Spontaneously developing chronic colitis in *il-10/inos* double-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279:G90-99
120. Taylor PMT, D.B.; Mills, K.H.G. . *In vitro culture and t cell lines and clones*. . 1987.
121. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275
122. Peng HJ, Turner MW, Strobel S. The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:510-515
123. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. Lps/tlr4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42:145-151

124. Hoffer U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, Travlos G, Ghanayem BI. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in c57bl/6j mice. *Endocrine*. 2009;36:311-325
125. Paul DS, Walton FS, Saunders RJ, Styblo M. Characterization of the impaired glucose homeostasis produced in c57bl/6 mice by chronic exposure to arsenic and high-fat diet. *Environ Health Perspect*.
126. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008;57:1071-1077
127. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-e-deficient mouse: A decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1006-1014
128. Ma X, Torbenson M, Hamad AR, Soloski MJ, Li Z. High-fat diet modulates non-cd1d-restricted natural killer t cells and regulatory t cells in mouse colon and exacerbates experimental colitis. *Clin Exp Immunol*. 2008;151:130-138
129. Kelly DG. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 1999;1:324-330
130. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*.89:359-372
131. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RR, Cara DC, Cardoso VN, Correia MI, Alvarez-Leite JL. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids*. 2012;47:669-678
132. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D. Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G518-525
133. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57:1470-1481
134. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.299:G440-448
135. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in leto and oleft rats. *Nutr Metab (Lond)*.7:19
136. Wang Y, Li J, Tang L, Charnigo R, de Villiers W, Eckhardt E. T-lymphocyte responses to intestinally absorbed antigens can contribute to adipose tissue inflammation and glucose intolerance during high fat feeding. *PLoS One*.5:e13951
137. West M. Dead adipocytes and metabolic dysfunction: Recent progress. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16:178-182
138. Karmiris K, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin--implications for inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52:855-866


Referências

139. Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocr J.* 2010;57:39-50
140. Barnea M, Shamay A, Stark AH, Madar Z. A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14:2145-2153
141. Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:326-330
142. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:437-446
143. Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, Merlin D. Colonic leptin: Source of a novel proinflammatory cytokine involved in ibd. *FASEB J.* 2004;18:696-698
144. Padidar S, Farquharson AJ, Williams LM, Kelaiditi E, Hoggard N, Arthur JR, Drew JE. Leptin up-regulates pro-inflammatory cytokines in discrete cells within mouse colon. *J Cell Physiol.* 2006;126:2123-2130

**Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica
aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon**

10. ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de aprovação no CETEA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 110/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Correlação entre obesidade e colite ulcerativa e seus possíveis mecanismos de ação**", que tem como responsável(is) **Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 06/2010**.

Este certificado expira-se em **9/ 06/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 110/2010**, related to the project entitled "**Correlation between obesity and ulcerative colitis and its possibles action mechanisms**", under the supervisors of **Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 9, 2010**.

This certificate expires in **June 9, 2015**.

Belo Horizonte, 14 de Junho de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2: Quadro Two-way ANOVA das análises.

Análise	Número da Figura ou tabela	Influência no resultado de acordo com Two-way ANOVA		
		Colite	Dieta	Interação entre Colite e Dieta
Consumo calórico total	Fig. 18A		x	
Consumo calórico durante oferecimento de DSS	Fig. 18B	x	x	
Ingestão líquida total	Fig. 19A		x	
Ingestão líquida durante o oferecimento de DSS	Fig. 19B	x	x	
Variação ponderal total	Fig. 20A	x	x	
Variação ponderal durante oferecimento de DSS	Fig. 20B-C	x		
Tolerância à glicose	Fig. 22		x	
Percentual de linfócitos circulantes	Tabela 5		x	
Percentual de monócitos circulantes	Tabela 5		x	
Leptina sérica	Fig. 37A		x	x
Resistina sérica	Fig. 37C	x	x	x
Avaliação do cólon				
Comprimento do cólon	-	x	x	
Escore histopatológico				
Escore histopatológico final	Fig. 24A	x	x	x
Arquitetura da mucosa	Fig. 24B	x	x	x
Infiltrado inflamatório	Fig. 24C	x	x	x
Espessamento do músculo	Fig. 24D	x	x	x
Depleção de células caliciformes	Fig. 24E	x		
Infiltrado inflamatório na lamina própria				
Macrófagos ativados (MOMA+CD80+)	Fig. 25B	x	x	x
Neutrófilos (GR1+)	Fig. 25C	x		
Atividade de MPO	Fig. 26B	x		
Linfócitos T auxiliares (CD4+)	Fig. 27A	x	x	
Linfócitos T auxiliares ativados (CD4+CD69+)	Fig. 27B	x		x
Linfócitos T citotóxicos (CD8+)	Fig. 27C	x	x	
Linfócitos T citotóxicos ativados (CD8+CD69+)	Fig. 27D	x		
Linfócitos B (CD19+)	Fig. 28A		x	

Anexo 2: Quadro Two-way ANOVA das análises (continuação).

Análise	Número da Figura ou tabela	Influência no resultado de acordo com Two-way ANOVA		
		Colite	Dieta	Interação entre Colite e Dieta
Linfócitos B ativados (CD19+CD21+)	Fig. 28B	x	x	x
Avaliação da presença de citocinas e quimiocina				
TNF	Fig. 29A	x		x
IL-6	Fig. 29B	x		
MCP1/CCL2	Fig. 29C	x	x	
IFN γ	Fig. 29D	x		x
IL-4	Fig. 30A	x		
IL-10	Fig. 30B	x		
Avaliação da expressão de receptores ligados à inflamação				
RNA de TLR4	Fig. 31A	x		
RNA de Ob-Rb	Fig. 31B		x	x
Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana				
Permeabilidade intestinal	Fig. 33A	x		x
Expressão de RNA de ZO-1	Fig. 34B	x		
Avaliação do linfonodo cecal				
Infiltrado inflamatório				
Monócitos e macrófagos (MOMA+)	Tabela 6	x	x	x
Macrófagos ativados (MOMA+CD80+)	Tabela 6	x		x
Neutrófilos (GR1+)	Tabela 6	x		
Linfócitos T auxiliares (CD4+)	Tabela 6			x
Linfócitos T auxiliares ativados (CD4+CD69+)	Tabela 6	x		
Linfócitos T citotóxicos (CD8+)	Tabela 6			x
Linfócitos T reguladores (CD4+CD25+LAP+)	Tabela 6	x	x	
Avaliação do baço				
Peso relativo do baço	Tabela 7	x	x	
Infiltrado inflamatório				
Neutrófilos (GR1+)	Tabela 7	x	x	x
Linfócitos T auxiliares ativados (CD4+CD69+)	Tabela 7	x		x
Linfócitos B ativados (CD19+CD21+)	Tabela 7	x		

Anexo 2: Quadro Two-way ANOVA das análises (continuação).

Análise	Número da Figura ou tabela	Influência no resultado de acordo com Two-way ANOVA		
		Colite	Dieta	Interação entre Colite e Dieta
Avaliação do tecido adiposo epididimal				
Adiposidade	Fig. 36A	x	x	
Área dos adipócitos	Fig. 33B	x	x	
Estrutura em forma de coroa	Fig. 33C		x	
Infiltrado inflamatório				
Monócitos e macrófagos (MOMA+)	Fig. 38A	x	x	
Macrófagos ativados (MOMA+CD80+)	Fig. 38B	x	x	
Neutrófilos (GR1+)	Fig. 38C			x
Linfócitos T auxiliares ativados (CD4+CD69+)	Fig. 39B			x
Expressão de adipocinas, quimiocinas e receptores inflamatórios				
RNA de adiponectina	Fig. 37E	x		
RNA de TNF	Fig. 42A	x	x	x
RNA de IL-6	Fig. 42B		x	x
RNA de MCP-1/CCL-2	Fig. 42C		x	x
RNA de TLR4	Fig. 42D		x	
Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos				
Rolamento leucocitário	Fig. 43A	x		
Adesão leucocitária	Fig. 43B	x		
RNA de ICAM1	Fig. 43C	x	x	x
RNA de VCAM1	Fig. 43D	x	x	x

ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni, para verificar se os resultados eram devido à dieta indutora de obesidade (DIO) e/ou à colite crônica. As análises não descritas nesse quadro não apresentaram diferença significativa pela ANOVA two-way.

ANEXO 3: Artigo publicado