

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

**Zélia Menezes Garcia**

PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO  
PLAQUETÁRIA NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NA SECREÇÃO  
DE CITOCINAS EM ANIMAIS COM AUMENTO DE ADIPOSIDADE

ORIENTADORA: PROFA. DRA. DANIELLE DA GLÓRIA DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADALIENE V. M. FERREIRA

BELO HORIZONTE  
2010

ZÉLIA MENEZES GARCIA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO  
PLAQUETÁRIA NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NA SECREÇÃO  
DE CITOCINAS EM ANIMAIS COM AUMENTO DE ADIPOSIDADE**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de pós-graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para análise.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle G. de Souza

Co-orientadora: Profa. Dra. Adaliene V.M. Ferreira

Belo Horizonte  
2010

Agradeço a Deus pela realização de mais esse sonho. À minha mãe Ester, meus irmãos Anselmo e Elmo e ao meu fofinho Davi pelo companheirismo e incentivo, imprescindíveis em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho. Uma das coisas, que julgo mais importante que aprende durante esses anos no meio científico, foi que ciência não se faz sozinha. Apoiamo-nos sobre ombros de outros pesquisadores e damos alguns passos para o crescimento da ciência. Desta forma, eventualmente, nem todos os nomes dos que contribuíram com esse trabalho vão aparecer aqui, peço desculpas e deixo claro que esse trabalho foi resultado de uma equipe incrível, da qual tenho muito prazer de participar.

Primeiramente, agradeço à minha Orientadora, Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza, pela excelente orientação, plena de competência e profissionalismo, imprescindível na minha formação científica e, sobretudo pela confiança, amizade e principalmente pelos bons conselhos em momento tão indecisos da minha vida.

Agradeço, à minha co-orientadora, Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira. Dadá para os íntimos. Sou imensamente grata a você. Se hoje estou aqui terminando esse trabalho é porque você sempre me apoio e acreditou em mim mesmo quando trocava reagente e estragava todo o seu experimento. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pela troca de idéias, amizade adquirida, por ajudar-me a pensar como uma “cientista” e me levar sempre com você.

Agradeço ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira e à Profa. Dr. Vanessa Pinho, pela acolhida, carinho, convívio de discussões importantes e interessantes.

Agradeço às amigas do Laboratório de Metabolismo Celular, Laura e Érica pelos primeiros ensinamentos científicos, pela confiança e amizade. Gosto muito de vocês. Em especial gostaria de agradecer a Érica pelo constante apoio e ajuda.

Agradeço à Profa. Dra. Leida Botion, por dar a oportunidade de entrar no mundo científico.

Agradeço às minhas queridas amigas Renata, Milene e Raquel que tornaram minha vida tão mais feliz e prazerosa no laboratório. Por sempre estarem dispostas a me ajudar em todos os experimentos. Devo muito a vocês.

Agradeço à Marina, ao Felipe e à Priscila pela ajuda na execução desse trabalho e pela oportunidade de ensiná-los.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Imunofarmacologia, por estarem sempre pronto a ajudar e tornar o laboratório um ótimo lugar para se trabalhar.

Agradeço à TODOS os amigos do Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro. Todos os dias tenho prazer em ir para o laboratório, pois sei que vou encontrar pessoas alegres e amáveis que tornam o nosso laboratório um ótimo lugar de se trabalhar.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Maria Caetano, Andrezza, Daniel Cisalpino, Luana e Talles pela ajuda na obtenção dos resultados de citometria de fluxo, PCR e histologia.

Agradeço à Gil, Fernanda, Dora, Deusimar e Ilma por possibilitar um ambiente de trabalho adequado e por toda a ajuda diária.

Agradeço à Dirce pelo apoio, incentivo e discussões sobre a apresentação desse trabalho.

Agradeço a todos os amigos do programa da pós-graduação em Fisiologia e farmacologia, pela agradável convivência durante as disciplinas.

Agradeço aos professores Dr. Cândido Celso Coimbra e Dra. Danusa Dias Soares por aceitarem participar da banca e possibilitarem o meu crescimento e aprimoramento.

Agradeço à Capes, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Agradeço aos amigos “externos” e familiares por proporcionarem momento de lazer, descontração, companheirismo e apoio.

LISTA DE ABREVEATURAS,  
SIGLAS E SÍMBOLOS



**ACC** – Acil CoA-carboxilase

**ACO** – Acil CoA-oxidase

**AD** - Adipócitos

**AMP** – Adenosina monofosfato

**BSA** – Bovine serum albumin – albumina de soro bovino

**C** – grupo alimentado com dieta controle.

**CCL (número)** - Quimiocina ligante CC (número)

**cDNA** – Ácido desoxirribonucléico complementar

**CETEA** – Comitê de ética em experimentação animal

**CPT-1**- Carnitina palmitoiltransferase-1

**CSV** – Células do estroma vascular

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA** - Ezyme linked immunosorbente assay

**FAS** – Ácido graxo sintase

**HG** – Meio hiperglicêmico

**HSL** – Lipase hormônio sensível

**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas

**IL-(número)** – Interleucina (número)

**IMC** – índice de massa corporal

**LPL** – lipase lipoproteica (enzima)

**M** - Molar

**MTT** – 3-(4-5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide Thiazole Blue

**n** – número de repetições

**ND** – não detectável

**OPD** – o-phenylenediamine dihydrochloride

**P** – Grupo alimentado com dieta palatável

**PAF** – Platelet-activating factor (fator de ativação plaquetária)

**PAF-AH** – PAF - acetilhidrolase

**PAFR** – Receptor para o fator de ativação plaquetária

**PAFR<sup>-/-</sup>** - Deleção genética do receptor para o PAF

**PAI-1** Inibidor do ativador de plasminogênio 1

**PBS** – Phosphate-buffered saline – Tampão fosfato salina

**PC** – Peso corporal

**PCR-RT** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

**PPAR  $\gamma$**  - peroxisome proliferator-activated receptor gama – receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama

**RNA** – ribonucleic acid – ácido ribonucléico

**RNA<sub>m</sub>** – Ácido ribonucléico mensageiro

**SDS** – Sodium dodecyl sulfate

**SREBP** – Proteína ligadora de elementos regulados por esteróis (Sterol Regulatory Element Binding Proteins)

**TGFP** – Fator transformado de crescimento

**TNF $\alpha$**  – Tumor necrosis factor-alfa – Fator de necrose tumoral alfa

**TNFR** – Receptor do fator de necrose tumoral

**VEGF** - fator de crescimento endotelial vascular

**WT** – Wild type – tipo selvagem

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO  
PLAQUETÁRIA NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NA SECREÇÃO  
DE CITOCINAS EM ANIMAIS COM AUMENTO DE ADIPOSIDADE**

**ZÉLIA MENEZES GARCIA**

Dissertação de mestrado defendida e aprovada, no dia 8 de setembro de 2010, pela

Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa Dra. DANUSA DIAS SOARES

Prof. Dr. CÂNDIDO CELSO COIMBRA

Prof. Dr. FREDERIC JEAN GEORGES FREZARD

Profa. Dra. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA

**CO- ORIENTADORA**

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia e Farmacologia

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

UFMG

Belo Horizonte, 8 de setembro de 2010.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIO

AGRADECIMENTO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	18
1.INTRODUÇÃO.....	20
1.1 PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO.....	21
1.2 OBESIDADE E COMORBIDADES ASSOCIADA.....	23
1.3 A RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO E OBESIDADE.....	24
1.4 O FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	29
2. JUSTIFICATIVA .....	32
3.OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 ANIMAIS E SEU TRATAMENTO.....	38
4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	40
4.2.1 Isolamento de adipócitos e de células do estroma vascular.....	40
4.2.2 PCR quantitativo em tempo real (Real-time PCR).....	40
4.2.3 Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal.....	42
4.2.3.1 Processamento do tecido adiposo para a microscopia de luz.....	42
4.2.3.2 Aquisição de imagem no microscópio e mensuração da área e perímetro.....	42
4.2.4 Dosagens bioquímicas.....	42
4.2.5 Extração de citocinas do tecido adiposo.....	43
4.2.6 Determinação da concentração de citocinas por ELISA.....	43
4.2.7 Cultura primária de adipócitos.....	44
4.2.8 Índice lipolítico in vitro.....	44
4.2.9 Ensaio de viabilidade de células em cultura utilizando o método do MTT.....	44
4.2.10 Citometria de fluxo.....	45
4.2.11 Teste de sensibilidade à insulina e de tolerância à glicose.....	45
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 O RNA mensageiro do receptor para o PAF é expresso em adipócitos.....	48

5.2 Ingestão alimentar, peso ponderal, biometria dos tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal e análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal.....	48
5.3 Expressão do RNAm para a LPL e a ACC.....	52
5.4 Concentração de triacilglicerol, colesterol total e glicose no soro.....	53
5.5 Porcentagem de macrófagos GR-1 <sup>low</sup> F4/80 <sup>+</sup> do tecido adiposo epididimal.....	54
5.6 Concentração e expressão de citocinas no tecido adiposo epididimal.....	54
5.7 Índice lipolítico e a concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$ liberados por adipócitos para o meio de incubação após estímulo com meio hiperglicêmico.....	56
5.8 Avaliação da tolerância à glicose.....	58
6. DISCUSSÃO.....	59
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado correlação positiva entre aumento da adiposidade, alterações metabólicas e vários mediadores inflamatórios. O presente trabalho avaliou a participação do receptor para o fator de ativação plaquetária (PAF) nessas alterações no tecido adiposo por meio da utilização de animais com deleção genética para tal receptor. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: selvagem com dieta controle (WT-C), selvagem com dieta palatável (WT-P), animais com deleção para o receptor do PAF alimentados com dieta controle (PAFR<sup>-/-</sup>-C) e palatável (PAFR<sup>-/-</sup>-P).

Os animais WT-P apresentaram aumento da adiposidade, hipertrofia dos adipócitos, maior expressão das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC) e lipase lipoproteica (LPL), aumento da concentração de colesterol total, das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, CCL-3 e CCL-5 e menor tolerância à glicose quando comparados com o grupo WT-C. O grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P apresentou aumento do ganho de peso corporal, aumento dos tecidos adiposos viscerais, associado à hipertrofia dos adipócitos, aumento de triacilglicerol e colesterol total, ao passo, que não alteraram a concentração das citocinas no tecido adiposo, nem a tolerância oral à glicose em relação animais PAFR<sup>-/-</sup>-C. A lipólise apresentou-se reduzida no grupo com deleção, bem como a liberação das citocinas TNF $\alpha$  e IL-6, tanto em condições basais quando após estímulo com meio hiperglicêmico em relação ao grupo selvagem.

Os dados obtidos sugerem que a presença do receptor para o PAF é importante para a atenuação da adiposidade, para a homeostase lipídica e para a secreção de citocinas no tecido adiposo epididimal após estímulo com dieta palatável. O aumento de citocinas no tecido adiposo parece ser importante para o controle da expansão desse tecido. O aumento da adiposidade observado na ausência do receptor pode também estar relacionado, pelo menos em parte, ao menor índice lipolítico.



## ABSTRACT

Recent studies have demonstrated the participation of several inflammatory mediators in immune and metabolic changes resulting from increased adiposity. This study evaluated the participation of the platelet-activating factor (PAF) receptor in the metabolic changes in adipose tissue through the use of animals with genetic deletion for this receptor. The animals were divided into four groups: wild type fed control diet (WT-C), wild type fed palatable diet (WT-P), animals with PAF receptor deletion fed a control (PAFR<sup>-/-</sup>-C) or palatable diet (PAFR<sup>-/-</sup>-P).

The group WT-P showed increased adiposity, adipocyte hypertrophy, increased acetyl-CoA carboxylase (ACC) and lipoprotein lipase (LPL) enzymes expression, increased total cholesterol serum concentration and high levels of the adipose tissue cytokines IL-1 $\beta$ , IL-10, CCL3 and CCL5. The mice fed a palatable diet also showed lower glucose oral tolerance. The group PAFR<sup>-/-</sup>-P showed increased body weight gain, exacerbated visceral adipose tissues fat mass, associated with hypertrophy of adipocytes when compared with group PAFR<sup>-/-</sup>-C and WT-P. The group PAFR<sup>-/-</sup>-P also had increased triglyceride and total cholesterol serum levels. No change was observed in relation to adipose tissue cytokines concentration or oral glucose tolerance in relation PAFR<sup>-/-</sup>-C animals. The adipocyte lipolysis was lower in PAFR<sup>-/-</sup>-C, as well as, the release of TNF $\alpha$  and IL-6 cytokines, both in basal or hyperglycemic medium conditions, when compared to WT-C group.

The results suggest that the presence of PAF receptor is important for the negative control of adiposity, for lipid homeostasis and the increased cytokines concentration in epididymal adipose tissue. The high levels of adipose tissue cytokines appears to be important to control the fat mass expansion. The increased adiposity observed in the absence of the PAF receptor can also, at least in part, be due to the lower adipocyte lipolysis.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A sobrevivência de organismos multicelulares depende da sua capacidade de lidar com infecções patogênicas, da cicatrização de lesões e da capacidade de armazenar energia para situações de baixa disponibilidade de nutrientes ou de alta demanda energética. Os sistemas metabólico e imune constituem requisitos básicos para sobrevivência dos animais (WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005). Muitos hormônios, citocinas, proteínas sinalizadoras, fatores de transcrição e lipídios bioativos desempenham funções tanto metabólicas quanto imunes, sendo assim essas vias são intimamente ligadas e interdependentes. A resposta inflamatória adequada necessita de suporte metabólico e de redistribuição de energia e, particularmente, a mobilização dos estoques lipídicos desempenha um importante papel no estabelecimento da resposta inflamatória de fase aguda (KHOVIDHUNKIT et al., 2004). A resposta inflamatória favorece o estado catabólico e suprime as vias anabólicas, como por exemplo, a via de sinalização da insulina (WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005).

A integração entre o metabolismo e a imunidade, que em condições fisiológicas é benéfica para a manutenção da saúde, pode se tornar deletéria em condições de baixo aporte energético, exemplificada pela imunossupressão característica de indivíduos desnutridos (KHOVIDHUNKIT, et al., 2004). A fome tem sido uma ameaça para a saúde humana ao longo da história, e por milhares de anos a ligação entre a infecção patogênica e a má nutrição foi bem estabelecida. No último século, entretanto, o pêndulo deslocou-se na direção oposta, e hoje muitos indivíduos apresentam excesso de peso ou obesidade. Com o advento da sobrecarga metabólica crônica, um novo grupo de problemas e complicações na intersecção entre metabolismo e imunidade emergiu, incluindo doenças inflamatórias ligadas à obesidade como diabetes, esteatose hepática e aterosclerose (HOTAMISLIGIL, 2004; HOTAMISLIGIL, 2006). Entre as várias razões para se manter um peso ideal está o paradigma emergente segundo o qual o desequilíbrio metabólico leva ao desequilíbrio imune,

com desnutrição e imunossupressão de um lado, e obesidade e aumento de marcadores inflamatórios do outro lado.

## **1.1 O PAPEL DO TECIDO ADIPOSO**

O tecido adiposo está envolvido no depósito de energia na forma de gordura, substrato energético com alta densidade energética. Durante o jejum ou aumento da demanda energética o tecido adiposo apresenta mecanismos capazes de aumentar a quebra e liberação da gordura estocada suprindo, assim, as necessidades energéticas corporais (BERNE et al, 2004).

A capacidade de armazenamento energético resulta do aumento das reservas de cada adipócito (hipertrofia) e/ou da replicação e diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (hiperplasia). A expansão do tecido adiposo relacionada à hipertrofia dos adipócitos está associada ao aumento da síntese e armazenamento de ácidos graxos sob a forma de ésteres de triacilglicerol e conseqüente aumento da adiposidade (KADOWAKI et al., 2003; HAUSMAN et al., 2001). Mudanças em curto prazo na adiposidade são importantes para o controle metabólico, por outro lado, o rompimento desse balanço no controle da deposição de gordura a longo prazo pode resultar em depósito insuficiente, como ocorre na lipodistrofia, ou excessivo, levando ao desenvolvimento da obesidade. A ausência de limite no estoque de gordura nos adipócitos representa uma vantagem adaptativa, entretanto, o estoque excessivo nessas células culmina em disfunção endócrina e/ou metabólica (TRAYHURN & WOOD, 2005).

O conteúdo de gordura corporal é determinado pelo balanço entre a deposição e a mobilização de lipídeos do tecido adiposo. A insulina tem um papel importante na síntese e armazenamento de ácidos graxos por estimular a captação de glicose, substrato necessário para a esterificação dos ácidos graxos, e estimular a atividade da lipase lipoproteica (LPL)

presente no endotélio de vasos sanguíneos do tecido adiposo (PICARD et al, 1999), enzima fundamental para a hidrólise dos triacilgliceróis das *quilomicra*, em ácidos graxos livres e glicerol. A insulina também estimula a via de síntese *de novo* de ácidos graxos, através do aumento da transcrição gênica de enzimas envolvidas no processo lipogênico, como a acil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS). Além disso, a insulina inibe a quebra dos ésteres graxos (lipólise) ao aumentar a atividade da fosfodiesterase, enzima que inativa o AMP cíclico e, conseqüentemente, diminui a fosforilação de enzimas chaves para o processo lipolítico (KITAMURA et al., 1999). Durante o jejum, com a diminuição da concentração de insulina e o aumento da adrenalina circulante, os triacilgliceróis estocados no tecido adiposo são hidrolisados e mobilizados na forma de ácidos graxos livres sendo liberados para a corrente sanguínea chegando até outros tecidos, como no músculo esquelético, para serem utilizados como fonte de energia (BERNE et al., 2004).

Até o início da década passada, acreditava-se que o papel essencial do tecido adiposo era a deposição de gordura, além de promover isolamento térmico e proteção mecânica contra traumas. Em 1994, com a descoberta da leptina por ZHANG e colaboradores, iniciou-se uma nova era de estudos sobre a função do tecido adiposo, como órgão endócrino. Atualmente, sabe-se que além do seu papel na homeostase energética, via armazenamento e mobilização de energia, o tecido adiposo é um tecido envolvido em vários processos fisiopatológicos e metabólicos (HIROSUMI et al., 2002; SABIO et al., 2008; KRYSIAK et al., 2010; FERREIRA et al., 2010). Essa mudança de perspectiva ocorreu devido ao reconhecimento de que o tecido adiposo é capaz de sintetizar e secretar vários hormônios, proteínas e peptídeos, fatores do complemento, citocinas, enzimas e receptores. O conjunto de moléculas sintetizadas pelo tecido adiposo tem efeitos biológicos importantes, como regulação da massa do tecido adiposo, modulação do balanço energético e ativação de fatores de transcrição (KIM, 2007).

De forma importante, essas moléculas participam no desenvolvimento das comorbidades presente em indivíduos obesos.

## **1.2 OBESIDADE E COMORBIDADES ASSOCIADAS**

Nos últimos anos a prevalência da obesidade vem crescendo em quase todas as comunidades do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), há 300 milhões de obesos no mundo e, destes, um terço está nos países em desenvolvimento (WHO, 2004). A obesidade é definida pelo índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 Kg/m<sup>2</sup>. A OMS considera a obesidade um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo, classificando-a como epidemia. No Brasil, o número de indivíduos acima do peso ideal cresceu alarmantemente nos últimos anos. Dados coletados pelo sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizado nas 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal em 2009, mostraram que a prevalência de excesso de peso foi de 46,6%, sendo que destes, 13,9% estavam obesos (VIGITEL, 2009).

A obesidade pode resultar de um prolongado desequilíbrio energético ocasionado por aumento da ingestão de calorias e diminuição do gasto energético e está associada a uma série de alterações metabólicas e funcionais como o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes tipo 2, esteatose hepática, dislipidemias, aterosclerose, hipertensão, além de várias outras complicações cardiovasculares (MOKDAD et al., 2003). Em conjunto, essas alterações são conhecidas como síndrome metabólica (REAVEN, 1988). A obesidade e as alterações metabólicas associadas estão entre as mais crescentes e deletérias doenças da atualidade. Estima-se que a prevalência global de diabetes tipo 2 irá dobrar para 350 milhões

de casos em 2030, gerando altos gastos para os cofres públicos (ALBERTI, 1997; HOGAN et al., 2003).

O número crescente de indivíduos obesos e com síndrome metabólica, nos últimos anos, é decorrente de alterações na composição da dieta, associadas a mudanças econômicas, sociais, demográficas e comportamentais (POPKIN, 2001). Alguns estudos demonstram aumento crescente do consumo de ácidos graxos saturados, açúcares e refrigerantes, em detrimento da redução do consumo de carboidratos complexos, frutas, verduras e legumes, nas regiões metropolitanas do Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2000a; GALEAZZI *et al.*, 1997). Observou-se também, um incremento da densidade energética da dieta, favorecido pelo maior consumo de carnes, leite e derivados ricos em gorduras (VIGITEL, 2009). A crescente substituição dos alimentos *in natura* ricos em fibras, vitaminas e minerais, por produtos industrializados (BARRETO & CYRILLO, 2001), associada a um estilo de vida sedentário, favorecido por mudanças na estrutura de trabalho, assim como avanços tecnológicos (POPKIN, 1999), compõem um dos os principais fatores etiológicos da obesidade.

A associação entre a obesidade e outras doenças crônicas é documentada há vários anos (KELLEY, 1946; BRAM, 1947, DILLON & TRAPNELL, 1951). Porém, nas últimas duas décadas, com descoberta da liberação de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo durante sua expansão (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; SOMM, 2006; BRUUN, 2004; CHAVEY *et al.*, 2009), um novo elo de ligação entre a obesidade e as alterações metabólicas passou a ser investigado.

### **1.3 A RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO E OBESIDADE**

Após a descoberta da secreção de leptina pelo tecido adiposo, ocorreu uma rápida expansão no conhecimento de proteínas e outras moléculas secretadas por esse tecido (TRAYHURN & BEATTIE, 2001; TRAYHURN & WOOD, 2004). Algumas dessas



proteínas são moléculas que participam do sistema imune e da resposta inflamatória (HOTAMISLIGIL, 2006). A primeira ligação entre obesidade e inflamação foi sugerida quando se descobriu que o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), uma citocina com atividade pró-inflamatória, é expressa no tecido adiposo de roedores obesos (HOTAMISLIGIL, et al., 1993).

Várias das moléculas secretadas pelo tecido adiposo podem agir como sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos na regulação da homeostase energética, incluindo a autorregulação do crescimento e o desenvolvimento do adipócito, assim como na homeostase corporal. Outras moléculas estão envolvidas na angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular – VEGF), homeostase glicêmica (adiponectina, leptina e TNF $\alpha$ ), reatividade vascular (inibidor do ativador de plasminogênio 1 – PAI-1) e na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio) (FRUHBECK *et al.*, 2001). As moléculas secretadas pelo tecido adiposo identificadas até o momento são altamente variadas e compreendem proteínas como as citocinas TNF $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-1- $\beta$ , (IL-1- $\beta$ ), quimiocina CC ligante 5 (CCL5), quimiocina CC ligante 3 (CCL3), fatores de crescimento (fator transformador de crescimento  $\beta$  – TGF- $\beta$ ), leptina, adiponectina, resistina, dentre outros (HOSTAMILISGIL *et al.*, 1993; WU *et al.*, 2007; HUBER *et al.*, 2008).

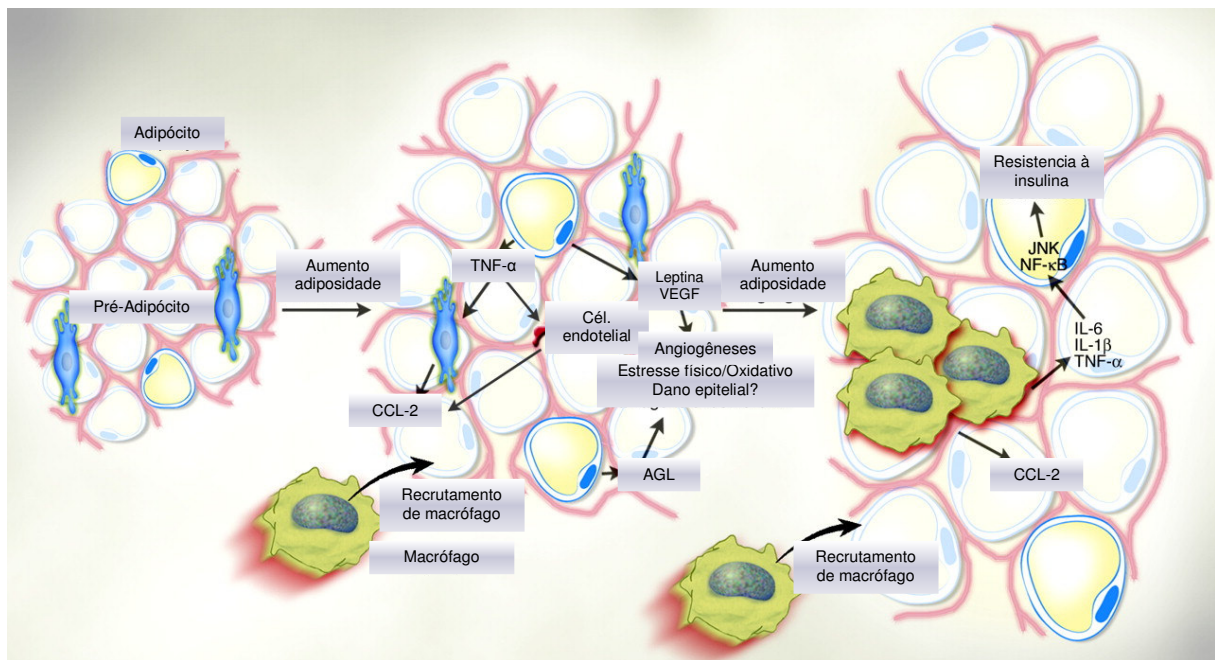
Embora o tecido adiposo seja capaz de sintetizar e secretar várias citocinas, não se sabe com clareza quais os fatores que levam esse tecido a apresentar perfil de secreção pró-inflamatório durante sua expansão (TRAYHURN *et al.*, 2008). Entretanto, alguns estudos tem sugerido que tanto o estresse oxidativo quanto a hipóxia presentes durante a hipertrofia dos adipócitos podem ser responsáveis pelo aumento da secreção de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo (OZCAN *et al.*, 2004; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2007; HOUSTIS *et al.*, 2006; TRAYHURN *et al.*, 2008).

Vários trabalhos observaram uma correlação positiva entre o aumento da adiposidade em roedores e humanos e o aumento da concentração de TNF $\alpha$ , IL-6 e CCL-2 no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 1993; CORICA, 1999; TSUKUI, 2000). Atenção considerável tem sido dada ao aumento da síntese e secreção de TNF $\alpha$  pelos adipócitos, bem como, seus efeitos na obesidade. A resposta inflamatória observada na obesidade é desencadeada no tecido adiposo, embora outros sítios metabólicos críticos, como o músculo e o fígado, possam estar envolvidos durante o curso da doença (HIROSUMI, 2002; FERREIRA et al., 2010).

Na obesidade, a secreção de mediadores pró-inflamatórios pelos adipócitos, pré-adipócitos e macrófagos residentes, levam ao infiltrado de células como monócitos/macrófagos (WEISBERG et al., 2003), linfócitos T (WU et al., 2007) e de neutrófilos (ELGAZAR-CARMON et al., 2008). No tecido adiposo, as células infiltradas também secretam várias citocinas, que estimulam os adipócitos a produzirem mais citocinas gerando assim um ciclo de retroalimentação positiva (XU et al., 2003). Desta forma, ocorre a cronificação do processo inflamatório sustentada pela interação entre as células infiltradas no tecido e os adipócitos, conforme pode ser observado na figura 1. A interação entre essas células levam ao remodelamento do tecido adiposo, promovendo, por exemplo, o aumento da angiogênese, necessário para a expansão do tecido (MEDZHITOV, 2008; TAKAYOSHI & YOSHIHIRO, 2010). O processo inflamatório crônico presente na obesidade está envolvido na gênese da resistência à insulina e aumento da liberação de ácidos graxos (BERG & SCHERER, 2005; HOTAMISLIGIL, 2006; SCHENK, et al., 2008; ROCHA & LIBBY, 2009).

A resistência à insulina é definida como uma menor resposta à insulina em tecidos insulino-dependentes, como, músculo, fígado e tecido adiposo. Nessa situação são necessárias concentrações maiores de insulina para manutenção da homeostase glicêmica (FACCHINI *et al.*, 2001). A progressão da insensibilidade nesses três tecidos diminui a capacidade da

insulina em promover a captação de glicose, inibir a lipólise no tecido adiposo, bem como, a liberação e produção de glicose via glicogenólise e gliconeogênese no fígado, respectivamente. Em decorrência da resistência à insulina ocorre um aumento da glicemia e da liberação de ácidos graxos livres (UGER, 1995; UGER, 2002).



**Figura 1:** O aumento da adiposidade estimula a síntese e secreção de várias citocinas pelo tecido adiposo. Essas citocinas liberadas participam do recrutamento de monócitos/macrófagos da corrente sanguínea. (Figura modificada de Wellen et al. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1785-1788).

Vários pesquisadores tem demonstrado que o TNF $\alpha$  está envolvido no desenvolvimento de resistência à insulina no tecido adiposo (HOTAMILISGIL et al., 2003; UYSAL et al., 1997; MOON et al., 2010). Além disso, o TNF $\alpha$  também aumenta a taxa lipolítica (LANGIN & ARNER, 2006), inibe a diferenciação de pré-adipócitos (TORTI et al., 1989), estimula a síntese de quimiocinas, como CCL-2, CCL-3 (WEISBERG et al, 2003; XU

et al, 2003) e CXCL5 (CHAVEY et al, 2009) e promove a apoptose de adipócitos (PRINS et al., 1994; SORISKY, et al., 2000).

Outra citocina também envolvida nas alterações metabólicas decorrentes do aumento da adiposidade é a IL-6. Os níveis plasmáticos dessa citocina estão aumentados em indivíduos com diabetes tipo 2 e positivamente correlacionados com o índice de massa corporal e com a concentração plasmática de ácidos graxos livres (LAZAR, 2005; MOHAMED-ALI, et al., 1997). Tal como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 é capaz de estimular a lipólise, diminuir a remoção de triacilglicerol do soro e reduzir a sensibilidade à insulina (SENN et al., 2003), modulando assim o metabolismo de lipídeos e de glicose. A IL-1 $\beta$  também tem sua concentração aumentada na obesidade (ZHANG et al., 2001). Alguns estudos demonstram, que o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 durante a obesidade é acompanhado pelo aumento da concentração de IL-1 $\beta$  na circulação e nas ilhotas pancreáticas (MAEDLER et al., 2009). Além disso, a apoptose das células beta, responsáveis pela síntese e secreção de insulina, observada durante exposição crônica a meio hiperglicêmico, é dependente de IL-1 $\beta$  (MAEDLER et al., 2001 e 2002). Desta forma, o aumento desta citocina compromete a síntese de insulina por diminuir o número de células betas. Foi demonstrado que a concentração de algumas quimiocinas, como CCL1, CCL2 e CCL5, está aumentada na obesidade (GERHARDT et al., 2001; WU et al., 2007). Além das citocinas pró-inflamatórias, o tecido adiposo também é capaz de secretar moléculas com atividade antiinflamatórias como a IL-10 e adiponectina (TILG et al., 2005). Há relatos na literatura de que a IL-10 está aumentada em indivíduos obesos, provavelmente, como parte de um mecanismo homeostático para contrapor os efeitos dos mediadores inflamatórios (STRISSEL et al., 2007; ESPOSITO et al., 2003). Por outro lado, a concentração de adiponectina, conhecida por melhorar a sensibilidade à insulina, está reduzida na obesidade (VENDRELL et al., 2004).

Além dos mediadores inflamatórios já descritos, um trabalho recente demonstrou que adipócitos, mas não pré-adipócitos, após estimulados com TNF $\alpha$ , são capazes de secretar o fator de ativação plaquetária (PAF), um importante mediador lipídico pró-inflamatório (GOUNTOPOULOU et al., 2008).

#### **1.4 O FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA (PAF)**

O fator de ativação plaquetária (acetil-gliceril-éter-fosfricolina) é um potente mediador lipídico pró-inflamatório que atua em concentrações extremamente baixas. Apesar da denominação, o PAF tem ação sobre diferentes tipos de células e é importante para o processo inflamatório tanto agudo quanto crônico. O PAF foi o primeiro mediador inflamatório lipídico, derivado de fosfolípidos a ser descoberto (BENVENISTE, 1974), que funciona como um mediador intercelular e também como mensageiro intracelular (SNYDER, 1994). A sinalização do PAF resulta da sua ligação a receptores específicos acoplados à proteína G e não de efeitos diretos sobre a membrana plasmática de células alvo. A ligação do PAF aos seus receptores promove amplas ações, sendo capaz de produzir muito dos fenômenos da inflamação, incluindo ativação de neutrófilos e quimiotaxia, alteração da permeabilidade vascular e ativação plaquetária (MONTRUCCHIO et al., 2000).

As plaquetas e uma variedade de células como os monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células endoteliais e adipócitos produzem PAF quando adequadamente estimuladas (CAMUSSI et al., 1990; TRIGGIANI et al., 1991; KARASAWA K. et al., 2003; GOUNTOPOULOU et al., 2008). Exemplos de substâncias capazes de levar a produção de PAF incluem radicais livres de oxigênio (HOTTER et al., 1997), IL-1 $\alpha$ , bradicinina e TNF- $\alpha$  (MONTRUCCHIO et al., 2000). Muitas das células produtoras de PAF também apresentam receptores para esse mediador lipídico (YE et al., 1991). O PAF é biologicamente ativo, pois

apresenta características estruturais próprias necessárias para sua ligação a receptores específicos, bem como, para o seu reconhecimento por enzimas envolvidas no seu processo de degradação e/ou de síntese. Seu reconhecimento como substrato é importante, pois, se a degradação enzimática não fosse específica para esta estrutura não usual de fosfolípido, poderia haver uma hidrólise contínua de fosfolípidos estruturais (VENABLE et al., 1993; PRESCOTT et al., 2000). O precursor do PAF, acil-PAF, é convertido pela enzima fosfolipase A2 a liso-PAF, que é então acetilado pela PAF-acetiltransferase, para finalmente produzir o PAF. A degradação ocorre pela desacetilação do PAF novamente em liso-PAF pela enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) (SNYDER, 1994). A presença do PAF foi detectada em praticamente todos os fluidos corporais (ISHII, NAGASE, SHIMIZU, 2002) e esse apresenta um espectro muito amplo de atividades biológicas.

Além de seu papel clássico no processo inflamatório, existem alguns trabalhos na literatura, principalmente da década de 80, mostrando que o PAF participa do metabolismo (HANAHAN, 1986; BRAQUET et al., 1987 e SNYDER, 1989). Já foi demonstrado que o PAF em concentrações de 1mM a 10pM é capaz de estimular a glicogenólise em fígado perfundido de ratos (SHUKLA et al., 1993), entretanto, o mesmo não ocorre em hepatócitos (FISHER et al., 1984). Isso ocorre porque os receptores para o PAF estão presentes nas células de Kupffer (CHAO et al., 1989) evidenciando, desta forma, que o metabolismo de glicose pode ser alterado por produtos secretados pelas células de Kupffer. Ainda no fígado, o PAF é capaz de estimular a lipogênese (EVANS et al., 1990), além disso, outro estudo demonstrou que a infusão de PAF é capaz de aumentar a atividade da enzima lipase lipoproteica liberada pela infusão de heparina em ratos (MIMURA et al., 1991). Vários estudos em humanos tem evidenciado que a concentração da enzima PAF-acetilhidrolase está aumentada em obesos (KUDOLO et al., 1997; WU et al., 1999), sugerindo que a

metabolização do PAF pode estar relacionada com a patogênese da obesidade (IYER et al., 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA



A obesidade e as doenças metabólicas associadas estão entre as mais comuns e deletérias patologias da atualidade, constituindo uma ameaça a saúde da população mundial. Recentemente, foi demonstrado que durante a obesidade ocorre um processo de inflamação crônica sub-clínica. Essa inflamação é apontada como um elo entre a obesidade e algumas patologias, como diabetes tipo 2, aterosclerose, complicações cardiovasculares, dentre outros. Vários estudos tem sido conduzidos com a finalidade de elucidar a participação de diferentes mediadores inflamatórios nas alterações metabólicas presentes na obesidade. Esses estudos tem demonstrado que durante a obesidade ocorre aumento da síntese e secreção de citocinas como TNF $\alpha$ , IL-6 e CCL2 no tecido adiposo. Essas citocinas podem promover resistência à insulina, aumento de ácidos graxos livres circulantes e maior infiltração de monócitos/macrófagos no tecido adiposo. Além disso, trabalhos desenvolvidos em roedores com deleção genética de receptores e/ou citocinas, bem como o uso de antagonistas de alguns mediadores inflamatórios, tem se mostrado eficientes na prevenção do desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade. Esses resultados, em conjunto, tem evidenciado que a modulação dos mediadores inflamatórios secretados pelo tecido adiposo em expansão pode ser uma ferramenta terapêutica importante para prevenção das comorbidades associadas à obesidade. Diante disso, é extremamente importante estudar a participação de diferentes mediadores inflamatórios durante a expansão do tecido adiposo.

Recentemente, demonstrou-se que adipócitos, quando estimulados com TNF $\alpha$ , são capazes de secretar o fator de ativação plaquetária (PAF), um importante mediador lipídico pró-inflamatório. Embora, na literatura haja vários relatos de que a enzima envolvida na metabolização desse mediador estaria aumentada em indivíduos obesos, nenhum trabalho até o momento foi realizado para avaliar a participação do PAF nas alterações metabólicas e inflamatórias no tecido adiposo. Desta forma, esse trabalho, tem por objetivo estudar a participação do PAF nas alterações metabólicas e inflamatórias no tecido adiposo induzidas

por dieta palatável em camundongos. Para isso, foram utilizados camundongos geneticamente modificados que não apresentam o receptor para o PAF e animais selvagens alimentados com uma dieta capaz de induzir aumento de adiposidade e de mediadores inflamatórios, bem como alterações no metabolismo de glicose e lipídios.

### 3.OBJETIVOS

### **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo desse trabalho foi estudar a participação do receptor para o PAF nas alterações metabólicas e na concentração e secreção de citocinas pelo tecido adiposo em camundongos alimentados com dieta palatável.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- i. Verificar se adipócitos e células do estroma vascular expressam o receptor para o PAF.
- ii. Verificar o efeito da ausência do receptor para o PAF na evolução de ganho de peso ponderal, ingestão alimentar, bem como, na adiposidade e morfologia dos adipócitos.
- iii. Analisar se a ausência do receptor para o PAF altera o perfil lipídico no soro de animais alimentados com a dieta palatável.
- iv. Verificar se a ausência do receptor para o PAF interfere nas vias de deposição de gordura no tecido adiposo.
- v. Analisar se a ausência do receptor para o PAF modifica a porcentagem de macrófagos e a produção de citocinas no tecido adiposo de animais alimentados com a dieta palatável.
- vi. Analisar se a ausência do receptor para o PAF altera o índice lipolítico e a liberação de mediadores inflamatórios por adipócitos após estímulo hiperglicêmico.
- vii. Verificar se a ausência do receptor para o PAF altera a tolerância à glicose.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 ANIMAIS E SEU TRATAMENTO

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA- protocolo 84/2009) sob o título de “Fator de ativação plaquetária: um possível participante das alterações metabólicas e inflamatórias na obesidade induzida por dieta.”

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos com seis a sete semanas de vida, das linhagens C57B/6J e C57B/6J-PAFR<sup>-/-</sup>. Os animais PAFR<sup>-/-</sup> foram criados no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB, UFMG. Os animais selvagens (C57B/6J) e animais com deleção genética do receptor para o PAF foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a dieta que receberam:

- 1- Animais selvagens alimentados com dieta controle (WT-C);
- 2- Animais selvagens alimentados com dieta palatável (WT-P);
- 3- Animais com deleção genética do receptor para o PAF alimentados com dieta controle (PAFR<sup>-/-</sup>-C);
- 4- Animais com deleção genética do receptor para o PAF alimentados com dieta palatável (PAFR<sup>-/-</sup>-P).

Os animais tiveram livre acesso à água e à dieta determinada.

A tabela 1 apresenta a distribuição de macro e micronutrientes, assim como a porcentagem de kilocalorias provenientes da dieta controle e da dieta palatável, obtidos através da análise bromatológica da dieta realizada no laboratório de qualidade do leite da escola de veterinária da UFMG.

**Tabela 1.** Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle e palatável.

	Dieta Controle	Dieta Palatável
Proteína (%)	26,3	17,5
Lipídio (%)	2,6	5,0
Carboidrato (%)	55,6	64,8
Fibra bruta (%)	6,2	4,1
Minerais (%)	9,3	8,5
Energia (Kcal/g)	4,0	4,4

A ingestão alimentar média foi determinada a partir da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante na gaiola dos animais durante as trocas. O valor obtido foi dividido pelo número de animais que estavam na caixa. O peso corporal foi avaliado uma vez por semana em balança semi-analítica com capacidade para 500 gramas e variação de 0,01 grama.

Na sétima semana, após início da alimentação com a dieta determinada, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose. Na oitava semana os animais foram deixados em jejum por aproximadamente 12 horas e então eutanasiados por exsanguinação após terem sido anesiados com 100µl de anestésico ketamina: xilasina: PBS (3:1:4). Os tecidos adiposos epididimal, retroperitonal e mesentérico foram removidos e utilizados imediatamente ou conservados em freezer -20°C até o momento do uso. O tecido adiposo utilizado para análise de biologia molecular foi conservado no freezer -80°C. O sangue foi coletado em tubos, centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos à 4°C para a obtenção de soro e armazenado à - 20°C para a dosagem de triacilglicerol, colesterol total e glicose.

## **4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

### **4.2.1 Isolamento de adipócitos e células do estroma vascular**

Após a eutanásia dos animais, o tecido adiposo epididimal foi removido, fragmentado e incubado com colagenase específica em banho-maria por aproximadamente 45 minutos a 37°C, sob agitação contínua, conforme descrito por RODBELL (1964). Ao término do período de incubação, as células foram filtradas através de uma tela de nylon e centrifugadas a 500 rpm por 1 minuto. Foi coletado o sobrenadante, que continha os adipócitos, e o infranadante foi usado para a obtenção das células do estroma vascular. Os adipócitos foram lavados três vezes com tampão HEPES (pH 7,4) contendo 1% de albumina bovina livre de ácidos graxos. Os adipócitos isolados foram ressuspensos na proporção de 1g de tecido para 20 mL de tampão.

### **4.2.2 PCR em tempo real (Real-time PCR)**

Para a quantificação relativa da expressão do RNAm do receptor para o PAF, foram utilizados adipócitos isolados e células do estroma vascular, obtidas como descrito no 4.2.1. Para a quantificação da expressão dos demais RNAm, foram usados fragmentos do tecido adiposo epididimal. O RNA total foi extraído com Trizol<sup>TM</sup> (life technologies) e procedeu-se a extração das amostras com clorofórmio-isopropanol conforme protocolo do fabricante. Para reação da transcriptase reversa, foi utilizado kit da Pharmacia/Biotech para síntese da fita de DNA complementar (cDNA). Com o uso de *primers* específicos (tabela 2), o cDNA do receptor para o PAF, acil CoA carboxilase, lípase lipoproteica, interleucina-6 e proteína 18S foram amplificados.



Como controle da quantidade de RNA utilizado, foi determinado o nível de expressão de gene da proteína mitocondrial 18S de todas as amostras.

**Tabela 2.** *Primers* para PCR em tempo real.

<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
<b>Receptor do PAF</b>	Senso	5´ - CCT CCC ACT GTG GAT TGT CTA CT 3´
	Antisenso	5´ GCC ACG TTG CAC AGG AAG T 3´
<b>Acil-CoA carboxilase (ACC)</b>	Senso	5´ – TCC GCA CTG ACT GTA ACC ACA T -3´
	Antisenso	5´ – TGC TCC GCA CAG ATT CTT CA -3´
<b>Lipase lipoproteica (LPL)</b>	Senso	5´ – AGT CTG GCC TCG AAC TAA ACT ATG TAT -3´
	Antisenso	5´ – TCC CAG GAC ACA GGA AGC TAA -3´
<b>Interleucina 6 (IL-6)</b>	Senso	5´ – TTC CAT CCA GTT GCC TTC TTG -3´
	Antisenso	5´ – TTG GGA GTG GTA TCC TCT GTG A -3´
<b>18S</b>	Senso	5´ – CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG -3´
	Antisenso	5´ – CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC -3´

### **4.2.3 Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal**

#### **4.2.3.1 Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz**

Fragmento do tecido adiposo epididimal com cerca de 50-100mg foram removidos e imersos em solução fixadora de formaldeído à 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se várias etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95°, 100°), a diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia de luz.

#### **4.2.3.2 Aquisição de imagens no microscópio e mensuração da área e perímetro**

Para a determinação do tamanho dos adipócitos, as lâminas foram analisadas através de microscópio de luz, equipado com uma câmera digital (Motican 2500). O perímetro e a área seccional foram obtidos através da mediada aleatória de 50 adipócitos por lâmina e posterior análise com o programa ImageJ para o processamento de imagens digitais.

### **4.2.4 Dosagens bioquímicas**

O triacilglicerol, colesterol total e glicose presentes no soro foram quantificados por Kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG) segundo as instruções do fabricante.

#### **4.2.5 Extração de citocinas do tecido adiposo**

Fragmentos do tecido adiposo epididimal (100mg) foram homogeneizados em 1 mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8g NaCl, 0,2g KCl e 2,89g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10min a 10000 r.p.m. a 4<sup>0</sup>C e o infranadante foi recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA.

#### **4.2.6 Determinação da concentração de citocinas por ELISA**

As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. Os níveis de IL-10, IL-1 $\beta$ , CCL3 e CCL5 foram determinados utilizando-se anticorpos obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas, e estão resumidamente descritas abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Nunc, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4<sup>0</sup>C. A placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina, em seguida as amostras foram pipetadas na placa. A reação ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4<sup>0</sup>C. Os anticorpos de detecção foram diluídos em PBS, pH 7,4, com 0,1% de albumina bovina, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase e revelada com OPD (“o-phenyldiamine dihidrochloride”-Sigma) A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M .

A leitura foi feita no leitor de ELISA com filtro para um comprimento de onda de 492nm.

Os resultados foram expressos corrigidos pela concentração de proteínas totais presente no tecido adiposo epididimal. As proteínas presente no homogeneizado usado para o ensaio de ELISA foram quantificadas através do método de Bradford (1976).

#### **4.2.7 Cultura primária de adipócitos**

Adipócitos isolados (4.2.1) foram incubados com meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) acrescido de penicilina, soro fetal bovino e 10% de albumina bovina livre de ácidos graxos na presença ou não de meio hiperglicêmico (25 mM) por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> à 5% (Chuang et al., 2007). Após o período de incubação, o meio infranadante foi coletado para determinação da liberação de citocinas como descrito no item 4.2.6 e de glicerol como descrito no item 4.2.8.

#### **4.2.8 Índice lipolítico *in vitro***

A liberação de glicerol para o meio de incubação foi utilizada como medida do índice lipolítico. O meio de incubação de adipócitos em cultura foi usado para determinação da concentração de glicerol através de método enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG). Foram seguidas as instruções do fabricante.

#### **4.2.9 Ensaio de viabilidade de células em cultura utilizando o método do MTT**

Após a coleta do infranadante, os adipócitos em cultivo foram submetidos a um ensaio de viabilidade para avaliar a sobrevivência das células. Para isso, as células

foram cultivadas na presença de 200µL de uma solução de MTT a 500µg/mL em meio de cultura DMEM a 37°C. Após 4 horas de incubação, o infranadante foi descartado e as células lisadas pela lavagem com uma solução de SDS a 10% em formamida/água (1:1). Foram transferidos 100µL do lavado para uma placa de ELISA e a densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 550nm. Os valores obtidos são expressos como a absorbância média das amostras.

#### **4.2.10 Citometria de Fluxo**

As células do estroma vascular do tecido adiposo epididimal foram isoladas como descrito no item 4.2.1. Essas células foram lavadas com solução de DMEM acrescido com 10% de soro fetal bovino, contadas e marcadas com anticorpos para componentes específicos de macrófagos ativados: GR<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup>. A fluorescência de cada célula foi mensurada rapidamente pelo feixe de excitação transversa e analisada com FACScan. Os dados foram expressos em porcentagem de células GR<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> presentes no *gate* de granulócitos.

#### **4.2.11 Teste oral de tolerância à glicose**

Para o teste oral de tolerância à glicose foram utilizados camundongos no estado de jejum de aproximadamente 12 horas. Os animais receberam, por gavagem, D-glicose na dose de 0,2g/100g de peso corporal, e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada aos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção, utilizando um glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA). As amostras de sangue foram obtidas da cauda dos animais após um pequeno corte na ponta da mesma.

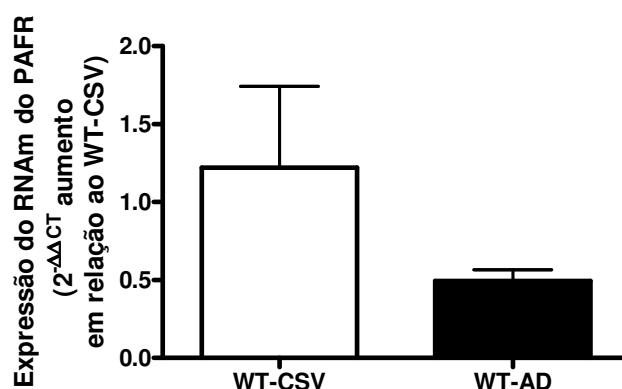
### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após ter sido realizado o teste de normalidade e verificado que as amostras apresentavam distribuição Gaussiana, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão médio. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

## 5. RESULTADOS

## 5.1 Expressão do RNA mensageiro do receptor para o PAF em adipócitos

Como mostrado na figura 1, o RNA mensageiro para o receptor do PAF é expresso tanto em adipócitos quanto em células do estroma vascular.



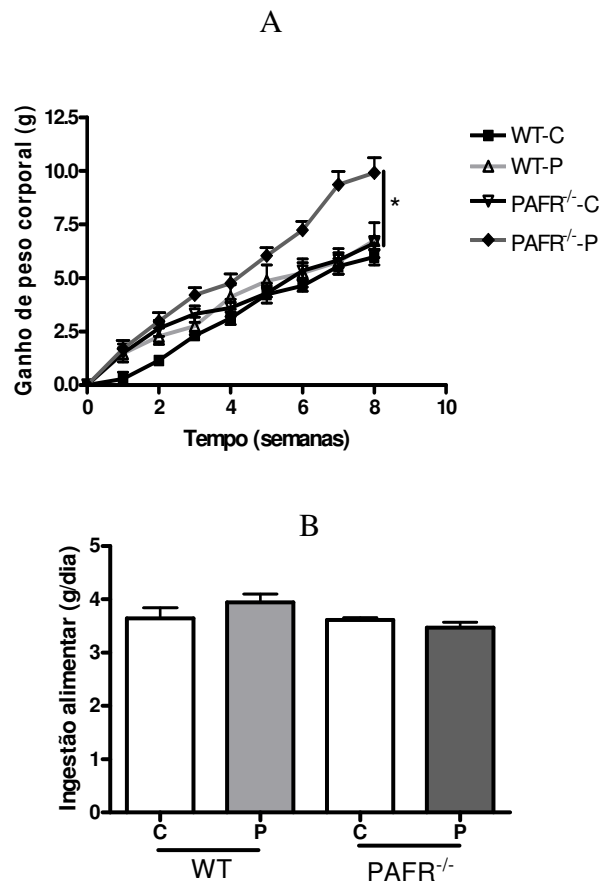
**Figura 2:** Expressão do RNAm para o receptor do PAF em células do estroma vascular (CSV) e adipócitos (AD) isolados do tecido adiposo epididimal de animais selvagens (WT). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. n= 3 e 4.

## 5.2 Ingestão alimentar, peso ponderal, biometria dos tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal e análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

Animais selvagens, quando alimentados com a dieta palatável, apresentaram ganho de peso similar aos animais alimentados com a dieta controle (Figura 2A). Entretanto, os animais deficientes para o receptor do PAF alimentados com a dieta palatável tiveram ganho de peso maior quando comparado a animais com deleção que

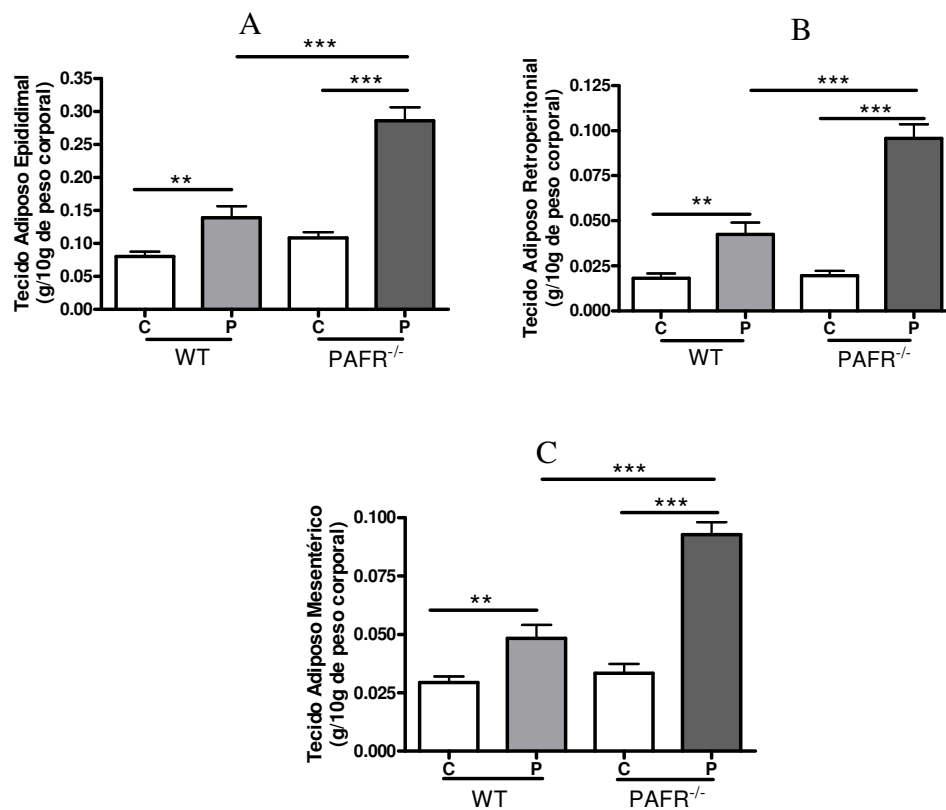


receberam a dieta controle ou quando comparados aos animais selvagens alimentados com a dieta palatável. O aumento de peso corporal não está associado ao aumento da ingestão alimentar, uma vez que não houve diferença nesse parâmetro em nenhum dos grupos avaliados (Figura 2B).



**Figura 3:** Ganho de peso ponderal e ingestão alimentar de camundongos selvagens (WT) e com deleção genética do receptor para o PAF (PAFR<sup>-/-</sup>), alimentados com dieta controle - C e palatável - P. (A) Representação do ganho de peso corporal avaliado semanalmente. (B) Ingestão alimentar diária média referente às oito semanas experimentais. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão, n= 9. \*p<0,05.

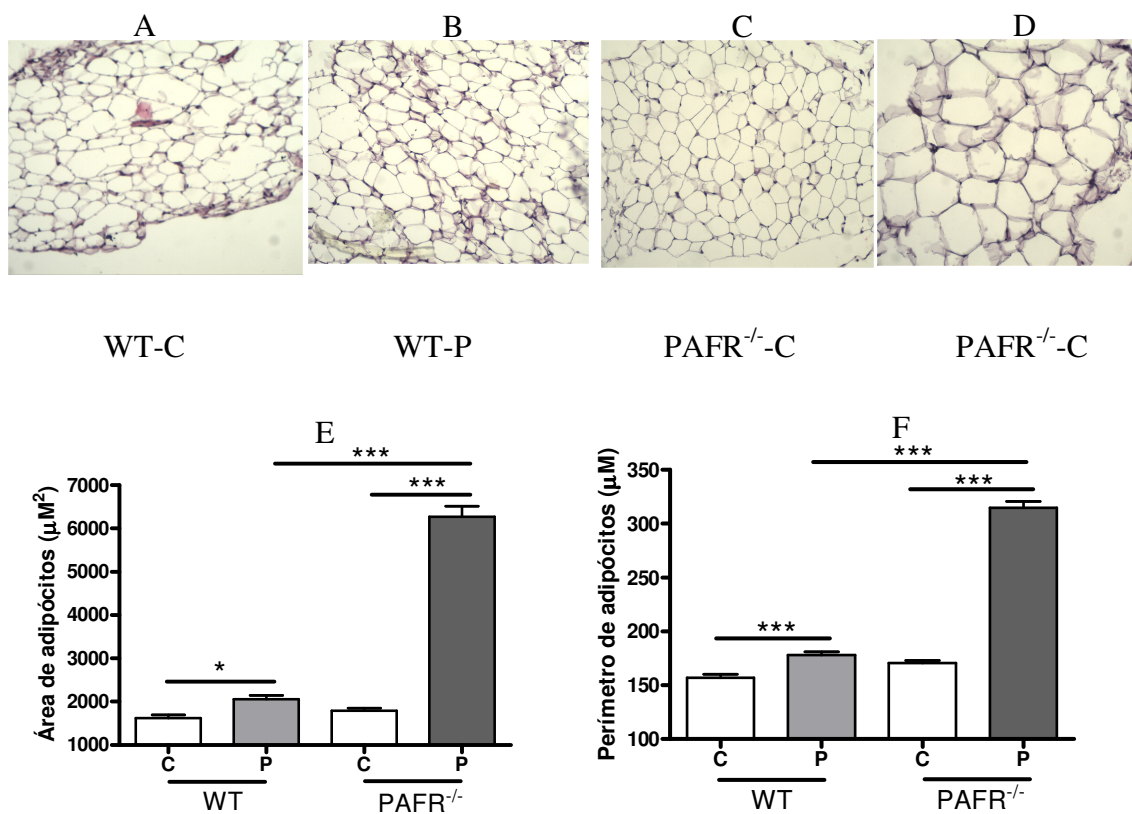
Conforme pode ser observado na figura 3, animais selvagens alimentados com a dieta palatável apresentaram aumento do peso dos tecidos adiposos epididimal (Figura 3A), mesentérico (Figura 3B) e retroperitoneal (Figura 3C) quando comparados ao seu respectivo controle. Entretanto, na ausência do receptor para o PAF, animais alimentados com dieta palatável apresentaram aumento de até três vezes na adiposidade em relação ao grupo  $PAFR^{-/-}$ -C. O aumento de adiposidade do grupo  $PAFR^{-/-}$ -P foi significativamente maior do que o encontrado no grupo selvagem alimentados com a mesma dieta.



**Figura 4:** Biometria de três tecidos adiposos intraperitoneais de camundongos selvagens (WT) e com deleção genética do receptor para o PAF ( $PAFR^{-/-}$ ) alimentados com dieta controle -C e palatável - P. Peso dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B)

e mesentérico (C). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão,  $n= 10-15$ .  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ .

A análise histológica do tecido adiposo epididimal mostrou que os dois grupos alimentados com a dieta palatável apresentaram aumento da área (Figura 4A) e do perímetro (Figura 4B) dos adipócitos quando comparados com seus respectivos controles. Todavia, esse aumento foi maior no grupo  $PAFR^{-/-}$ -P que no grupo WT-P. Esse resultado mostra que o aumento da adiposidade induzida pela dieta está relacionado com a hipertrofia dos adipócitos.

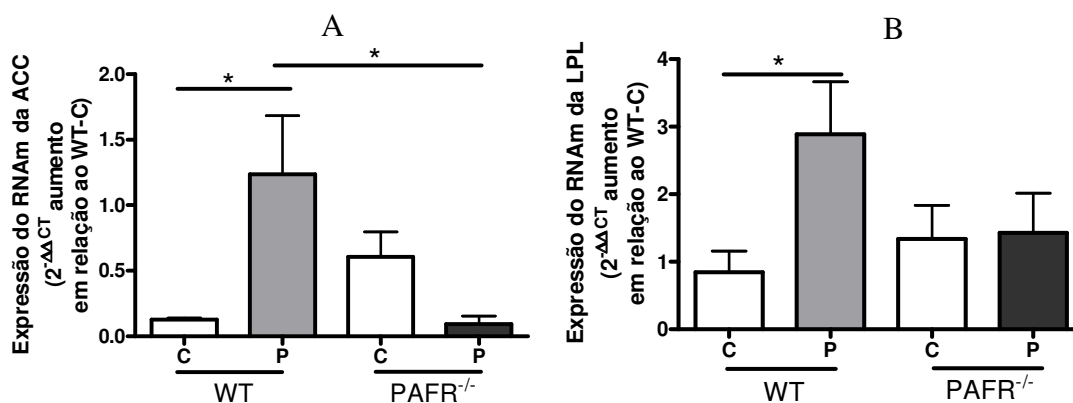


**Figura 5:** Análise histológica de secções do tecido adiposo epididimal de animais selvagens e com deleção genética do receptor para o PAF alimentados dieta controle-C e palatável-P. Tecido adiposo epididimal dos animais WT-C (A), WT-P (B),  $PAFR^{-/-}$ -C (D),  $PAFR^{-/-}$ -P (E) em aumento de 10x. Determinação da área (E) e do perímetro (F) de adipócitos do tecido adiposo epididimal de camundongos selvagens (WT) e com

deficientes para receptor do PAF (PAFR<sup>-/-</sup>) alimentados com dieta controle e palatável. As barras representam a média ± erro padrão. n= 3-5. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001.

### 5.3 Expressão do RNAm para as enzimas LPL e ACC

O grupo selvagem alimentado com a dieta palatável apresentou aumento da expressão do RNAm para a ACC (Figura 5A), bem como para a LPL (Figura 5B), quando comparado com o grupo selvagem que recebeu a dieta controle. Em relação a expressão das enzimas ACC e LPL, o grupo com deleção genética não apresentou diferença entre os animais alimentados com a dieta palatável e controle. A expressão do RNAm para a enzima ACC apresentou-se diminuída no grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P quando comparado com WT-P.



**Figura 6:** Expressão do RNAm para as enzimas acil-CoA carboxilase (ACC) (A) e lipase lipoproteica (LPL) (B) no tecido adiposo epididimal de camundongos selvagens (WT) e deficientes para receptor do PAF (PAFR<sup>-/-</sup>), alimentados com dieta controle -C e palatável - P. As barras representam a média ± erro padrão. n= 3-6 para ACC e n=8-13 para LPL. \*p<0,05.

#### 5.4 Concentração de triacilglicerol, colesterol total e glicose no soro

Para verificar o efeito do receptor do PAF sobre os parâmetros sorológicos, foram determinadas as concentrações de triacilglicerol, colesterol total e de glicose. Os dados apresentados na tabela 3 mostram que os animais selvagens alimentados com a dieta palatável tiveram aumento da concentração sorológica de colesterol total em relação ao grupo alimentado com dieta controle, contudo não houve alteração na concentração de triacilglicerol e glicose nesse grupo. No grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P houve aumento na concentração de colesterol total e de triacilglicerol em relação grupo com deleção alimentado com a dieta controle, entretanto, não houve diferença na concentração de glicose entre esses dois grupos.

Tanto o aumento de colesterol quanto de triglicérides foi significativamente maior no grupo com deleção genética alimentado com a dieta palatável do que o grupo selvagem alimentado com a mesma dieta.

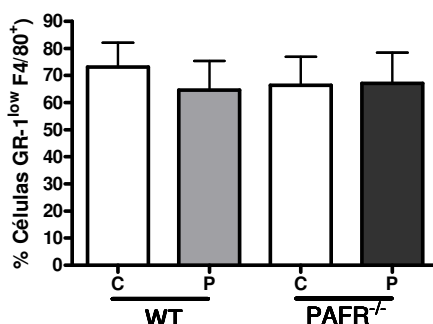
**Tabela 3.** Efeito da dieta e da ausência do receptor para o PAF na concentração de lipídeos e de glicose no soro.

Grupos	Perfil no Soro		
	Triacilglicerol (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	Glicose de jejum (mg/dL)
WT-C	54,57±3,60 (9)	95,08±6,26 (10)	109±2,44 (10)
WT-P	46,20±6,31 (8)	113,10±4,43 (10)*	109±1,35 (10)
PAFR <sup>-/-</sup> -C	45,09±4,15 (10)	89,24±4,05 (10)	113±1,91 (9)
PAFR <sup>-/-</sup> -P	100,6±7,56 (5)*#	130,00±2,62 (5)*#	111,4±3,58 (5)

Os valores representam a média ± erro padrão. Os números entre parêntese representam o número de animais utilizados. \*p<0,05 vs respectivo controle (WT-C ou PAFR<sup>-/-</sup>-C); #p<0,05 vs WT-P.

## 5.5 Porcentagem de macrófagos GR-1<sup>low</sup> F4/80<sup>+</sup> do tecido adiposo epididimal

A análise da população de células GR-1<sup>low</sup> F4/80<sup>+</sup> (macrófagos ativados) nas células do estroma vascular do tecido adiposo epididimal está representada no gráfico 6. Conforme pode ser observado, em relação essa população de células não houve diferença em nenhum dos grupos avaliados.

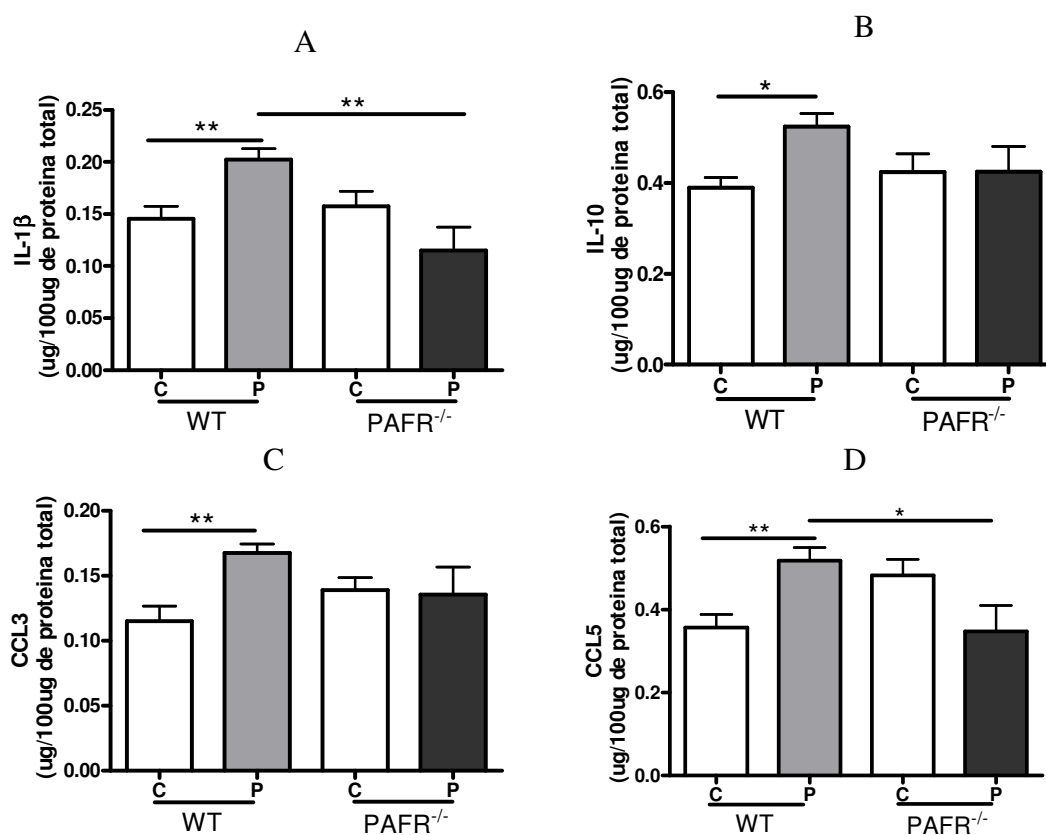


**Figura 7:** Porcentagem da população de células GR-1<sup>low</sup> F4/80<sup>+</sup> (macrófagos ativados) presentes no estroma vascular do tecido adiposo epididimal de animais selvagens (WT) e deficientes para receptor do PAF (PAFR<sup>-/-</sup>) alimentados com dieta controle-C e palatável-P. As barras representam a média ± erro padrão. n= 5-6.

## 5.6 Concentração e expressão de citocinas no tecido adiposo epididimal

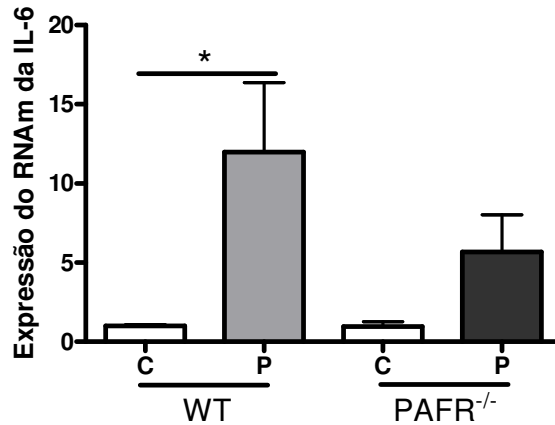
Conforme mostrado na figura 7, animais alimentados com a dieta palatável tiveram aumento na concentração das citocinas IL-1 $\beta$  (7A), IL-10 (7B), CCL3 (7C) e CCL5 (7D) no tecido adiposo epididimal. Entretanto, na ausência do receptor não houve diferença entre os grupos alimentados com as dietas palatável e controle. As citocinas IL-1 $\beta$  e CCL5 estão reduzidas no grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P apenas quando comparado com o grupo WT-p. A dieta palatável promoveu aumento da concentração de TNF $\alpha$  no tecido

adiposo dos animais selvagens, mas não nos animais com deleção genética do receptor (dado não mostrado).



**Figura 8:** Concentração de citocinas extraídas do tecido adiposo epididimal de camundongos deficientes para receptor do PAF comparados com animais selvagens, ambos alimentados com dieta controle-C e palatável-P. Concentração de IL-1 $\beta$  (A), IL-10 (B), CCL3 (C) e CCL5 (D). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. n= 5-9. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Em relação à expressão da RNAm para a IL-6 no tecido adiposo epididimal, houve aumento da expressão no grupo selvagem alimentado com a dieta palatável, conforme mostrado na figura 8. Entretanto, no grupo com deleção do receptor não houve diferença entre os animais alimentados com as diferentes dietas.



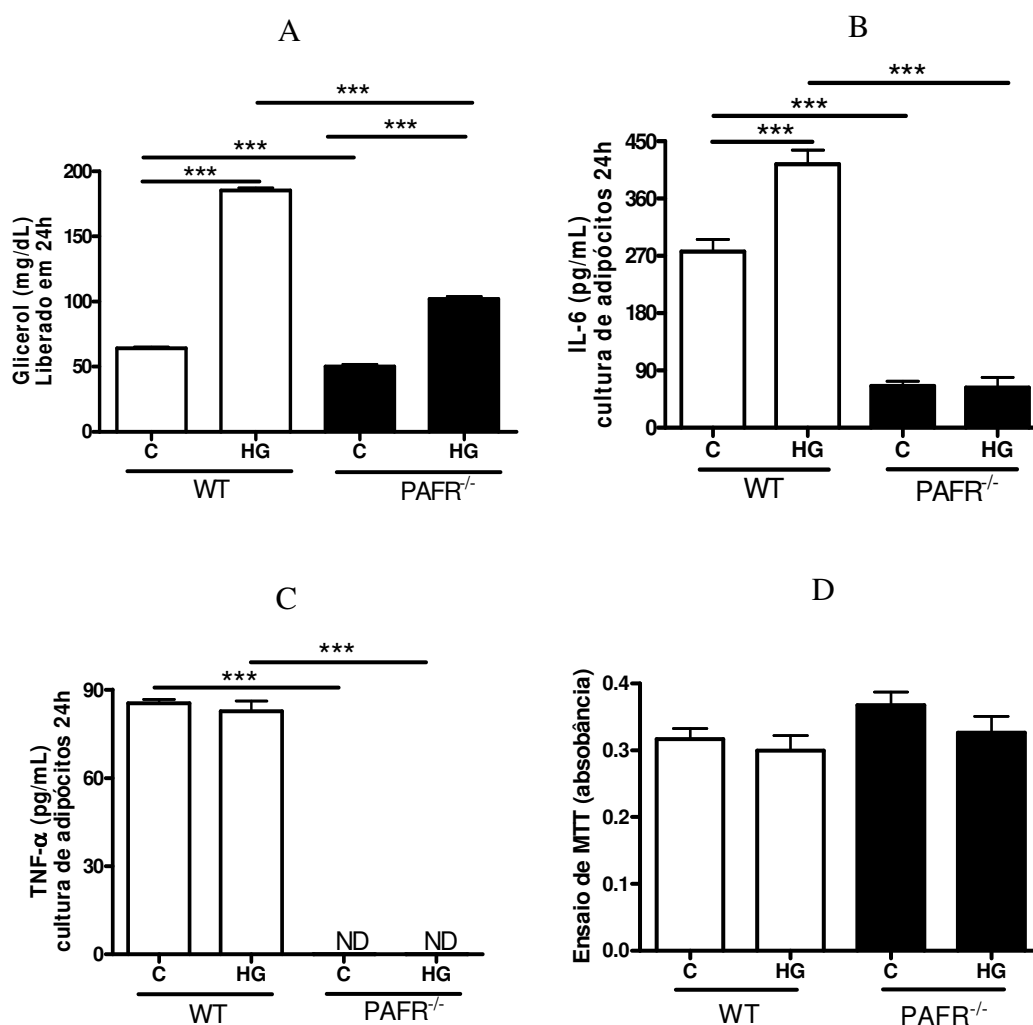
**Figura 9:** Expressão do RNAm da IL-6 no tecido adiposo epididimal de camundongos selvagens (WT) e deficientes para receptor do PAF (PAFR<sup>-/-</sup>), ambos alimentados com dieta controle-C e palatável-P. As barras representam a média ± erro padrão. n= 3-5. \*p<0,05.

### 5.7 Índice lipolítico e a concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$ liberados por adipócitos para o meio de incubação após estímulo com meio hiperglicêmico

Para determinação do índice lipolítico, foi realizada a dosagem de glicerol liberado por adipócitos em cultura primária. Como mostrado na figura 9A, o grupo com deleção apresentou taxa lipolítica basal menor que o grupo selvagem. Quando se estimulou a lipólise com meio hiperglicêmico (glicose 25mM) observou-se aumento da liberação de glicerol para o meio de incubação tanto pelos adipócitos dos animais selvagem quanto dos animais com deleção genética para o receptor. Entretanto, ressaltamos que no grupo com deleção o índice lipolítico foi 81,2% menor que o apresentado pelos adipócitos dos animais selvagens quando ambos foram estimulados com meio hiperglicêmico. Além disso, os adipócitos dos animais selvagens, em resposta



ao meio hiperglicêmico, aumentaram a liberação de IL-6 (Figura 9B), mas não de TNF $\alpha$  (Figura 9C). Os adipócitos dos animais com deleção genética não alteraram a liberação de IL-6 e TNF $\alpha$  após estímulo com meio hiperglicêmico. Na figura 9D está representada a absorbância do ensaio de MTT para determinação da viabilidade celular dos adipócitos em cultura. Esse dado demonstra que a quantidade de células viáveis foi semelhante nos quatro grupos experimentais.

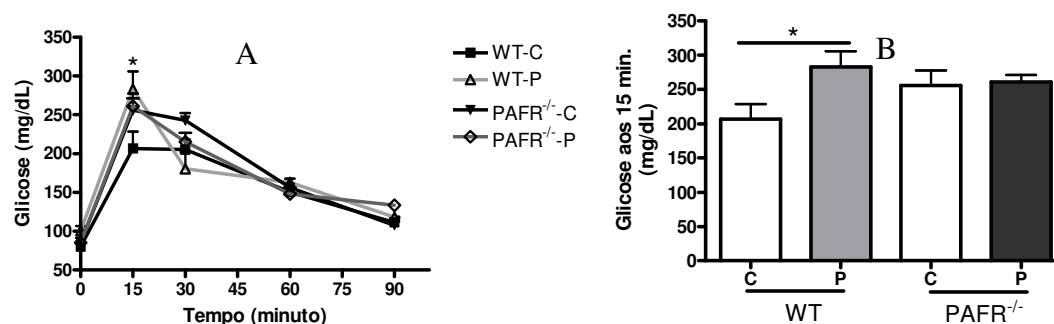


**Figura 10:** Efeito do meio hiperglicêmico (25mM) em adipócitos de animais selvagem (WT) e com deleção genética para o receptor do PAF (PAFR<sup>-/-</sup>) incubados por 24 horas. (A) Concentração de glicerol mensurados no meio de incubação para determinação do índice lipolítico. Concentração de IL-6 (B) e de TNF $\alpha$  (C) liberados para o meio de

incubação. (D) Viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão.  $n=4-8$ .  $***p<0,001$ .

### 5.8 Avaliação da tolerância à glicose

Como mostrado na figura 10A e B, os animais selvagens se tornaram menos tolerantes à glicose. Entretanto na ausência do receptor para o PAF não houve alteração na tolerância à glicose entre animais alimentados com dieta controle e palatável.



**Figura 11:** Glicemia após gavagem de 2g/Kg de glicose (A). Representação da glicemia no tempo 15 minutos após gavagem (B). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão,  $n=5$ .  $*p<0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, nosso objetivo foi estudar a participação de um importante mediador lipídico pró-inflamatório, o PAF, nas alterações metabólicas e inflamatórias no tecido adiposo induzidas por uma dieta palatável (LIMA et al., 2008; NADERALI & WILLIAMS, 2001; HARROLD et al., 2000). Essa dieta é caracterizada por conter maior teor de carboidratos (LINDQVIST et al., 2005). Embora geralmente dietas palatáveis promovam hiperfagia, a dieta usada pelo nosso grupo não apresentou esse efeito em diferentes linhagens de camundongos, como Swiss, Balb/C (dados não mostrados) e C57/B6. Nesse trabalho os animais selvagens alimentados com a dieta palatável durante oito semanas apresentaram aumento da adiposidade, associado à hipertrofia dos adipócitos, aumento de colesterol total, bem como, menor tolerância à glicose e maior concentração e expressão de citocinas no tecido adiposo quando comparados com o grupo controle. Desta forma, camundongos alimentados com a dieta palatável constituem um bom modelo para o estudo da expansão do tecido adiposo associado ao aumento de mediadores pró-inflamatórios e diminuição periférica da tolerância à glicose.

O controle do acúmulo de lipídeos nos adipócitos é determinado primariamente pela atividade de três vias metabólicas: a lipogênese, que consiste na síntese *de novo* de ácidos graxos e sua posterior reesterificação à triacilglicerol, sendo a acil-CoA carboxilase uma enzima chave nesse processo; a captação de ácidos graxos derivados de triacilgliceróis presentes em lipoproteínas circulantes clivados pela enzima LPL e a hidrólise dos lipídeos armazenados (lipólise) no tecido adiposo pela enzima lipase hormônio sensível (FREDRIKSON et al., 1981) e pela lipase de triacilglicerol do tecido adiposo (JENKINS et al., 2004; VILLENA et al., 2004; ZIMMERMANN et al., 2004). A expansão do tecido adiposo nos animais selvagens alimentados com a dieta palatável foi acompanhada pelo aumento da expressão do RNAm das enzimas ACC e LPL.

Embora a atividade das enzimas não tenha sido avaliada, há vários relatos na literatura demonstrando que o aumento da expressão da ACC está intimamente relacionado com a atividade da enzima, bem como, com o aumento da adiposidade (COUPÉ et al., 1990; PERDEREAU et al., 1990; ELSHOUBAGY, et al., 1990; TRAVERS et al., 1997). A atividade da LPL está sob regulação tanto transcricional quanto pós-transcricional. Há estudos mostrando que macronutrientes, como carboidratos e lipídeos, podem modular a atividade da LPL, tanto em humanos quanto em roedores (YOST, et al., 1998; ERSKINE et al., 1994). ERSKINE e colaboradores (1994) demonstraram que após ingestão de uma dieta rica em carboidratos ocorre aumento da atividade da LPL liberada por heparina.

1	
---	--

Diante da forte correlação, apontada pela literatura, entre a expansão do tecido adiposo e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, vários estudos estão sendo conduzidos com a finalidade de elucidar novos mediadores envolvidos na relação entre o aumento da adiposidade e alterações metabólicas. Recentemente, GOUNTOPOULOU e colaboradores (2008) demonstraram que adipócitos quando estimulados com TNF $\alpha$  são capazes de produzir o fator de ativação plaquetária (PAF). Além disso, diversos trabalhos tem evidenciado que a metabolização do PAF pode estar aumentada em indivíduos obesos e com complicações metabólicas (KUDOLO et al., 1997; WU et al., 1999; IYER, et al., 2010), evidenciando que o PAF pode estar envolvido na etiologia da obesidade e das comorbidades associadas.

Nesse trabalho, observamos que na ausência do receptor para o PAF, os animais alimentados com a dieta palatável apresentaram maior ganho de peso corporal e aumento dos três tecidos adiposos avaliados, bem como, marcante hipertrofia dos adipócitos do tecido adiposo epididimal. Diante do exarcebado aumento dos tecidos

adiposos observado nos animais PAFR<sup>-/-</sup>-P, avaliamos algumas vias metabólicas envolvidas no acúmulo de gordura nas células adiposas. E, ao contrário do observado no grupo selvagem, os animais com deleção do receptor que receberam a dieta palatável não apresentaram alteração na expressão do RNAm para as enzimas ACC e LPL quando comparados com os animais PAFR<sup>-/-</sup>-C. Desta forma, esses dados sugerem que o aumento da adiposidade observado no grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P não está relacionado a maior expressão dessas enzimas. Por outro lado, observou-se que a taxa lipolítica basal de adipócitos isolados de animais PAFR<sup>-/-</sup> foi 21% menor que a dos adipócitos de animais selvagens. Quando os adipócitos dos animais com deleção foram incubados em meio hiperglicêmico, observou-se que a taxa lipolítica foi 81,2% menor que os adipócitos de animais selvagens. Desta forma, sugerimos que o aumento no tamanho dos adipócitos observado no grupo com deleção alimentado com a dieta palatável pode estar relacionado com a diminuição da lipólise, como observado *in vitro*. Há relatos na literatura demonstrando que a lipólise pode regular o tamanho do adipócito. Animais com deleção da perilipina, proteína que funciona como uma barreira protegendo a gota lipídica da ação da HSL e da ATGL, apresentaram diminuição da área do adipócito em relação ao grupo selvagem (MARTINEZ-BOTAS et al., 2000; TANSEY et al., 2001). Em outro trabalho, foi demonstrado que a deleção da fosfolipase A2 (PLA2), em adipócitos de camundongos, preveniu o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta rica em gordura e por deficiência de leptina (ob/ob). Esse efeito foi atribuído ao aumento da taxa lipolítica, tanto basal quanto estimulado por isoproterenol, e resultou em diminuição da área dos adipócitos (JAWORSKI et al., 2009). Desta forma, nossos dados, em conjunto, evidenciam que a presença do receptor para o PAF é importante para atenuar o ganho de peso corporal e a adiposidade em animais alimentados com a

dieta palatável. O aumento da adiposidade nesse grupo pode estar relacionado, pelo menos em parte, a menor taxa lipolítica.

Embora não tenha sido avaliado nesse trabalho, outra via importante, que pode estar envolvida na regulação do tamanho dos adipócitos, bem como da adiposidade, é a oxidação de lipídeos no próprio tecido adiposo. O aumento da transcrição das enzimas oxidativas, como carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1) e acil-CoA oxidase, (ACO) estão relacionadas com diminuição da área de adipócitos no tecido adiposo epididimal (JEONG & YOON, 2009). Por outro lado, a redução da oxidação de lipídeos no tecido adiposo pode contribuir para a obesidade e para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (OBERKOFER et al., 1997; BOTTCHEER & FURST, 1997). Além disso, o aumento do tecido adiposo pode resultar do desequilíbrio entre a ingestão de energia e o gasto energético (DUCAN et al., 2007). No nosso modelo demonstramos que não ocorre maior ingestão calórica nos animais com deleção alimentados com a dieta palatável, entretanto o gasto energético pode está diminuído. Desta forma, investigações futuras serão necessárias para determinar se a oxidação de lipídeos e o gasto energético estão alterados nos animais PAFR<sup>-/-</sup>-P.

Apesar do marcante aumento da adiposidade nos animais PAFR<sup>-/-</sup>-P, não houve aumento da população de macrófagos no tecido adiposo epididimal, assim como observado no grupo selvagem alimentados com a mesma dieta. Os animais PAFR<sup>-/-</sup>-P não apresentaram alteração na concentração das citocinas avaliadas em relação ao grupo PAFR<sup>-/-</sup>-C, diferentemente do observado no grupo selvagem. Avaliamos a expressão do RNAm para a IL-6 e demonstramos que no grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P não houve diferença em relação a expressão do RNAm dessas citocinas quando comparados ao grupo PAFR<sup>-/-</sup>-C. Nossos dados, *in vitro*, confirmaram que os adipócitos na ausência do receptor para o PAF apresentam liberação basal de TNF $\alpha$  e IL-6 menor que os adipócitos de animais

selvagens, e ainda, quando estimulados com meio hiperglicêmico não alteraram a liberação dessas citocinas. Esses achados no tecido adiposo e adipócitos dos animais com deleção corroboram dados da literatura que tem demonstrado em diferentes tecidos e modelos experimentais diminuição significativa da concentração de citocinas em animais deficientes para o receptor do PAF quando comparados com os seus controles (SOARES et al., 2002; GALVEZ et al., 2003; HIRAYAMA et al., 2003; SOUZA et al., 2003). A ativação do receptor do PAF estimula a síntese de várias citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e eicosanóides (ROTH et al., 1996; POUBELLE et al., 1991; RUIS et al., 1991; AEPFELBACHER et al., 1992; BAZAN, 2005; HASEGAWA et al., 2010) desempenhando papel fundamental nos processos inflamatórios. O PAF, via seu receptor, é capaz de ativar o NF- $\kappa$ B, fator chave de regulação, envolvido no processo inflamatório, capaz de promover a transcrição de receptores, enzimas e várias citocinas (DE PLAEN et al., 1998; 2000; FERNANDES et al., 2003). Diferentes trabalhos tem demonstrado que a inflamação que ocorre durante a obesidade está relacionada com a ativação desse fator de transcrição nuclear (OITA et al., 2010; KLEEMANN, et al., 2010; RAYSSIGUIER et al., 2006). Desta forma, em conjunto, nossos dados sugerem que a presença do receptor para o PAF é necessária para aumentar a concentração de mediadores inflamatórios durante a expansão do tecido adiposo induzida por dieta palatável. Além disso, a presença do receptor para o PAF é importante em adipócitos, para a liberação basal e estimulada por meio hiperglicêmicos de IL-6 e TNF $\alpha$ .

A dislipidemia é um achado comum em indivíduos com sobrepeso e obesos e está intimamente relacionada com o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, como aterosclerose (KLEEMANN et al., 2010). Nesse trabalho, os animais com deleção do receptor para o PAF alimentados com a dieta palatável tiveram



aumento da concentração de colesterol total e de triacilglicerol (TG). Está bem estabelecido na literatura que o transporte de colesterol em camundongos ocorre principalmente em partículas de HDL (PLUMP et al., 1992; ZHANG et al., 1992; BRESLOW 1996; HOFKER et al., 1998; NEUZIL et al., 1998). Desta forma, é provável que o aumento de colesterol total observado nos animais PAFR<sup>-/-</sup>-P seja devido ao aumento dessa lipoproteína. No grupo com deleção, alimentado com a dieta palatável, o aumento de TG ocorreu associado à menor expressão da LPL. Ao passo que, nos animais selvagens, a dieta palatável não alterou a concentração de TG, mas aumentou a expressão da LPL (SARAVAN et al., 2005). Esses resultados sugerem que o aumento de TG observado na ausência do receptor para o PAF nos animais alimentados com a dieta palatável pode estar relacionado à menor remoção de TG do soro devido menor expressão da LPL no tecido adiposo. Entretanto, outras vias de regulação também podem estar envolvidas nesse processo, como aumento da síntese e secreção hepática de VLDL e menor oxidação periférica de gordura.

Apesar de todas as alterações metabólicas observadas nos animais com deleção do receptor para o PAF, alimentados com a dieta palatável, eles não apresentaram alteração na tolerância à glicose. Uma vez que a concentração de mediadores pró-inflamatórios não foi alterada nos animais PAFR<sup>-/-</sup>-P e, sabendo que esses mediadores estão envolvidos na gênese da resistência à insulina, nossos dados evidenciam que o desenvolvimento de resistência à insulina pode ser dependente do aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios no tecido adiposo, como já demonstrado por outros pesquisadores (BARBARROJA et al., 2010; XU et al., 2003; UYSAL, et al., 1997).

A relação entre a inflamação e a obesidade é, atualmente, um assunto amplamente discutido na literatura, entretanto pouco se sabe sobre o papel fisiológico desse processo, embora haja alguns trabalhos propondo tal papel. UYSAL e

colaboradores (1998) demonstraram que a deleção dos dois receptores para o TNF $\alpha$  (TNFR1 e TNFR2), ainda que não tenham prevenido o ganho de peso em modelo genético de obesidade, preveniram o desenvolvimento de resistência à insulina. Em relação ao papel fisiológico da inflamação no tecido adiposo, há alguns estudos sugerindo que a inflamação, nesse tecido, participa do remodelamento do mesmo, promovendo angiogênese necessária para a expansão do tecido (NISHIMURA et al, 2007; 2008) além de fagocitar as células mortas. Outro trabalho demonstrou que uma das ações do TNF $\alpha$ , no tecido adiposo, seria promover resistência local à insulina e reduzir a adiposidade, sugerindo que o papel fisiológico do TNF- $\alpha$  ao induzir resistência à insulina é limitar a expansão da massa adiposa (XU et al., 2002), uma vez que sensibilidade normal à insulina estimula a lipogênese e inibe a lipólise (BERNE et al., 2005). Essa hipótese pode ser reforçada pela observação da associação entre algumas doenças relacionadas com marcante redução da massa do tecido adiposo e expressivo aumento do processo inflamatório, como na caquexia induzida pelo câncer, na sepse e em algumas alergias alimentares. (RYDEN & AMER, 2007; MEHTA et al., 2010; DOURADO et al, dados não publicados). Nessas doenças ocorrem aumento do infiltrado de macrófagos, secreção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de vias catabólicas e supressão de vias anabólicas no tecido adiposo. Nossos dados corroboram com a hipótese de que, o aumento de mediadores pró-inflamatórios, que ocorre no tecido adiposo durante o aumento da adiposidade, pode ser importante para promover o controle negativo da adiposidade.

A figura 11 ilustra esquematicamente a participação do receptor para o PAF e dos mediadores inflamatórios no controle da adiposidade. Em resumo, o conjunto de dados apresentados nesse trabalho sugere que o receptor do PAF atenua o aumento da adiposidade e a concentração de lipídeos no soro. Na ausência do receptor do PAF, há

marcante aumento da adiposidade e dislipidemia após estímulo com dieta palatável. Embora tenhamos observado aumento da adiposidade no grupo selvagem com a dieta palatável, ele foi bem menor que o apresentado pelo grupo PAFR<sup>-/-</sup>-P. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da adiposidade na ausência do receptor, observamos menor concentração de mediadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal e diminuição da taxa lipolítica em adipócito isolados. Desta forma, sugerimos que quando um estímulo para o aumento da adiposidade, como a dieta palatável, é acompanhado do aumento da concentração de mediadores inflamatórios ocorre diminuição da tolerância à glicose e menor hipertrofia dos adipócitos. Entretanto, quando o estímulo para o aumento da adiposidade não é acompanhado pelo aumento da concentração de mediadores inflamatórios, como visto no grupo com deleção do receptor para o PAF, a tolerância a glicose não é alterada, ao passo que, ocorre marcante hipertrofia dos adipócitos e dislipidemia.

Estímulo para aumento da adiposidade (Dieta palatável)

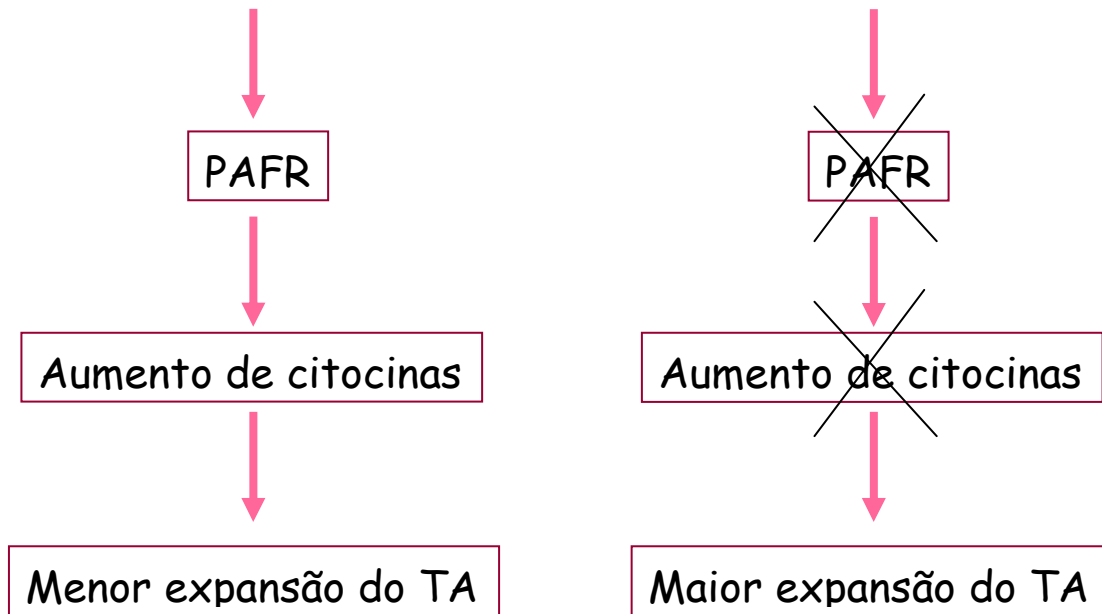


Figura 11: Representação esquemática da participação do receptor para o PAF e dos mediadores pró-inflamatórios no controle da adiposidade induzida por dieta palatável.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Para confirmar a participação do PAF como um mediador da lipólise em adipócitos isolados, avaliaremos a expressão das enzimas HSL e ATGL. Além disso, em cultura de adipócitos isolados de animais selvagens, será avaliado se o PAF, através do uso de análogos do receptor do PAF, é capaz promover lipólise e se esse efeito é dependente do aumento de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6.
- Para determinar quais as vias metabólicas envolvidas no aumento de adiposidade observado no grupo com deleção do receptor do PAF alimentados com a dieta palatável, avaliaremos a expressão de UCPs no músculo e tecido adiposo (avaliação da termogênese), bem como de CPT-1 (enzima chave para a oxidação de ácidos graxos).
- A fim de verificar se o PAF está aumentado nos animais alimentados com a dieta palatável, conforme sugerido por estudos realizados em humanos obesos e com sobrepeso, avaliaremos expressão das enzimas PAF-aciltransferase e PAF-acilhidrolase nos grupos selvagens que apresentam aumento de adiposidade.
- A concentração plasmática de insulina e a sensibilidade à mesma são avaliados para confirmação de que em animais alimentados com a dieta palatável também ocorre diminuição da sensibilidade à insulina, como já sugerido pelo teste de tolerância à glicose.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aepfelbacher M, Ziegler-Heitbrock H, Lux I, Weber P. Bacterial lipopolysaccharide up-regulates platelet-activating factor-stimulated Ca<sup>2+</sup> mobilization and eicosanoid release in human Mono Mac 6 cells. *J Immunol*;148:2186–2193, 1992.
- Alberti, K.G. The costs of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **14**, 7–9, 1997.
- Barbarroja N, López-Pedrera Ch, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, El Bekay R, Vidal-Puig A, Tinahones FJ. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochemical Journal Immediate Publication*, Manuscrito 2010.
- Barreto, S.A.J. & Cyrillo, D.C. Análise da composição dos gastos com alimentação no Município de São Paulo (Brasil) na década de 1990. *Revista de Saúde Pública*, 35:52-59, 2001.
- Bazan, H. E. P. Cellular and molecular events in corneal wound healing: significance of lipid signaling. *Experimental Eye Research*, vol. 4, pp. 453–463, 2005.
- Benveniste, J. Platelet activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* 249: 581–582, 1974.
- Berg, A. H., Scherer, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **96**, 939–949, 2005.
- Berne, R.M; Levi, M.N.; Koeppen, B.M.; Stanton, B.A. *Fisiologia*. Editora Elsevier, 5<sup>a</sup> Edição, 2004.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*; 46:3-10, 1997.
- Bottcher H, Furst P. Decreased white fat cell thermogenesis in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:439–444, 1997.
- Bougoulia M, Triantos A & Koliakos G. Effect of weight loss with or without orlistat treatment on adipocytokines, inflammation, and oxidative markers in obese women. *Hormones (Athens)* 5, 259–269, 2006.
- Bram I. Complications of obesity with special reference to high blood pressure; report on 125 cases. *Med Rec. Jun*;160 (6):350-3, 1947.
- Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Braquet, P., Touqui, L., Shen, T.Y. and Vargaftig, B. B. Perspectives in platelet-activating factor research - *Pharmacol. Rev.* 39, 97-145, 1987.
- Brasil. Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde*,



Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, v.272, p.685-688, 1996.

Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiøtt KM, Fain JN, Richelsen B. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jan;286(1):E8-13.

Camussi, G.; Tetta, C. and Baglioni, C. The role of platelet-activating factor in inflammation. *Clin Immunol Immunopathol.* , 57(3), 331-8, 1990.

Chao, W. & Olson, M.S. Platelet-activating factor: receptor and signal transduction. *Biochem J* 292: 617–629, 1993.

Chavey C, Lazennec G, Lagarrigue S, Clapé C, Iankova I, Teyssier J, Annicotte JS, Schmidt J, Matakı C, Yamamoto H, Sanches R, Guma A, Stich V, Vitkova M, Jardin-Watelet B, Renard E, Strieter R, Tuthill A, Hotamisligil GS, Vidal-Puig A, Zorzano A, Langin D, Fajas L. CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab*. Apr;9(4):339-49, 2009.

Chuang CC, Yang RS, Tsai KS, Ho FM, Liu, SH. Hyperglycemia Enhances Adipogenic Induction of Lipid Accumulation: Involvement of Extracellular Signal- Regulated Protein Kinase 1/2, Phosphoinositide 3-Kinase/Akt, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor\_ Signaling *Endocrinology*, September 2007, 148(9):4267–4275.

Corica, F.A., Allegra, A., Corsonello, M., Buemi, G., Calapai, A.R., Mauro, V. N. e Ceruso, D.. Relationship between plasma leptin levels and the tumor necrosis factor-alpha system in obese subjects. *Int. J. Obes*. 23:355–360, 1999.

Coupé, C., Perdereau, D., Ferré, P., Hitier, Y., Narkewicz, M., e Girard, J. Lipogenic enzyme activities and mRNA in rat adipose tissue at weaning. *Am. j Physiol*. 258, E126-E133, 1990.

De Plaen, I.G., Tan, X.D., Chang, H., Qu, X.W., Liu, Q.P. & Hsueh, W. Intestinal NF- $\kappa$ B is activated, mainly as p50 homodimers, by platelet-activating factor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1392, 185–192, 1998.

De Plaen, I.G., Tan, X.D., Chang, H., Wang, L., Remick, D.G. & Hsueh, W. Lipopolysaccharide activates nuclear factor kappaB in rat intestine: role of endogenous platelet-activating factor and tumor necrosis factor. *Br. J. Pharmacol.*, 129, 307–314, 2000.

Dillon ES, Trapnell JM Jr. Overweight as a contributing factor in the development of diabetes and its complications. *Trans Assoc Life Insur Med Dir Am*. 35:280-90, 1951.

DiPietro, L., Katz, L.D., Nadel, E.R. Excess abdominal adiposity remains correlated with altered lipid concentrations in healthy older women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 23:432–436, 1999.

Duncan BB, Schmidt MI. The epidemiology of low-grade chronic systemic inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2006 Feb;8(1):7-17. Review.

Elshourbagy, N., Near, J., Kmetz, P., Sathe, G., Southan, C., Strickler, J., Gross, M., Young, J., Wells, T., and Groot, P. Rat ATP citratelase. Molecular cloning and sequence analysis of a full-length cDNA and messenger RNA abundance as a function of diet, organ, and age. *J Blot. Chem.* 265, 1430-1435, 1990.

Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., Levy1, R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J lipids research* 49:1894-1903, 2008.

Erskine JM, Jensen DR, Eckel RH. Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranslational. *J Nutr.* 1994 Apr;124(4):500-7.

Esposito, K., Pontillo, A., Giugliano, F., Giugliano, G., Marfella, F., Nicoletti, G., Giugliano, D. Association of Low Interleukin-10 Levels with the Metabolic Syndrome in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(3):1055–1058, 2003.

Evans, R.D.; Ilic, V., Williamson, D.H. Metabolic effects of platelet-activating factor in rats in vivo: stimulation of hepatic glycogenolysis and lipogenesis. *Biochem. J.* 269,269-272, 1990.

Facchini FS, Hua NW, Reaven GM, Stoohs RA. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? *Free Radic Biol Med.* 2000 Dec 15;29(12):1302-6. Review.

Fernandes, E.S., Passos, G.F., Campos, M.M., Araujo, J.G.V.C., Pesquero, J.L., Avellar, M.C., Teixeira, M.M. & Calixto, J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.*, 139, 973–981, 2003.

Fisher, R. A., Shukla, S. D., DeBuysere, M. S., Hanahan, D. J. and Olson, M. S. The effect of acetylglycerol ether phosphorylcholine on glycogenolysis and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism in rat hepatocytes - *J. Biol. Chem.* 259, 8685-8688 (1984).

Fredrikson G, Stralfors P, Nilsson NO, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.*;356:6311–6320, 1981.

Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jun;280(6):E827-47. Review.

Galeazzi M.A.M; Domene S.M.A.; Sichieri R. Estudo multicêntrico sobre consumo alimentar. *Cad Debate.*; (Volume especial):11-60, 1997.

Galvez, J., Garrido, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Ramis, I., De Medina, F.S., Merlos, M., Zarzuelo, A.. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. *Inflamm. Bowel Dis.*, 9, 363–37, 2003.

Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* Apr 25;175(1-2):81-92, 2001.

Gountopoulou, A., Leondaritis, G., Galanopoulou, D., Macri-Vavayanni, M. TNF $\alpha$  is a potent inducer of platelet-activating factor synthesis in adipocytes but not in preadipocytes. *Differential regulation by PI3K.* *Cytokine* 41; 174-181, 2008.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48, 1905–1914, 2007.

Hanahan, D. J. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride - *Annu. Rev. Biochem.* 55, 483-509, 1986.

Hasegawa, S., Kohro, Y., Shiratori, M., Ishii, S., Shimizu, T., Tsuda, M., Inoue K. Role of PAF Receptor in Proinflammatory Cytokine Expression in the Dorsal Root Ganglion and Tactile Allodynia in a Rodent Model of Neuropathic Pain. *Plosone.* Vol. 5, Issue 5:10467. 2010.

Harrold, J.A., Williams, G., Widdowson, P.S. Early Leptin Response to a Palatable Diet Predicts Dietary Obesity in Rats: Key Role of Melanocortin-4 Receptors in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *J. Neurochem.* Vol. 74, No. 3, 2000.

Hofker, M.H.; Van Vlijmen, B.J.M.; Havekes, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APO-E in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.137, p.1-11, 1998.

Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239–254, 2001.

Hirayama, K., Yokoi, Y., Sakaguchi, T., Nakamura, T., Ashiwabara, H., Sunayama, K. & Nakamura, S. Platelet-activating factor, a critical mediator in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dis. Colon Rectum.*, 46, 100–110, 2003.

Hirosumi J; Tuncman G; Chang L; et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336, 2002.

Hogan, P., Dall, T. and Nikolov, P. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 26, 917–932, 2003.

Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 44(7121):860-7, 2006.

Hotter G, Closa D, Prats N, Pi F, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Free radical enhancement promotes leucocyte recruitment through a PAF and LTB<sub>4</sub> dependent mechanism. *Free Radic Biol Med.* 22(6):947-54, 1997.

Houstis N, Rosen ED & Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948, 2006.

Huber J, Kiefer FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* Aug;93(8):3215-21, 2008.

Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:599-609. Review.

Iyer, A; Fairlie, DP; Prins, JB; Hammock, BD; Brown, L. inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 71–82, 2010.

Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*;279:48968–75, 2004.

Jeong, S., Yoon, M. Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPAR $\alpha$  in high fat diet-induced obese mice. *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*, Vol. 41, No. 6, 397-405, 2009.

Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Kim KH, de Val S, Kang C, Sul HS. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med.* 2009 Feb;15(2):159-68.

Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R 2003 Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 228:1111–1117.

Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) [Review]. *Prog Lipid Res* 2003;42:93–114.

Kelley, W.H. Portal cirrhosis in the obese. *Southern Medical Journal* 39 (12): 978-981, 1946.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548–2556.

Khaodhiar, L., Ling, P.R., Blackburn, G. L., Bistrain, B. R. “Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity,” *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, vol. 28, no. 6, pp. 410–415, 2004.

Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004 Jul;45(7):1169-96. Epub 2004 Apr 21.

Kim O.K.: Ginseng saponin-Re and Coix lachrymajobi var. mayuen regulate obesity related genes expressions, TNF-alpha, leptin, lipoprotein lipase and resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Life Sci* 2007, 17:1523-1532.

Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 1999;19:6286-96.

Kleemann R, van Erk M, Verschuren L, van den Hoek AM, Koek M, Wielinga PY, Jie A, Pellis L, Bobeldijk-Pastorova I, Kelder T, Toet K, Wopereis S, Cnubben N, Evelo C, van Ommen B, Kooistra T. Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance. *PLoS One.* 2010 Jan 21;5(1):e8817.

Klein S, Wolfe RR. Whole-body lipolysis and triglyceridefatty acid cycling in cachectic patients with esophageal cancer. *J Clin Invest.* 1990;86:1403-1408.

Kudolo GB, Bressler P, DeFronzo RA. Plasma PAF acetylhydrolase in non-insulin dependent diabetes mellitus and obesity: effect of hyperinsulinemia and lovastatin treatment. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1997 Nov;17(2):97-113.

Krysiak R, Gdula-Dymek A, Bachowski R, Okopien B. Pleiotropic Effects Of Atorvastatin And Fenofibrate In Metabolic Syndrome And Different Types Of Prediabetes. *Diabetes Care.* 2010 Jun 29.

Langin, D. & Arner, P. Importance of TNF $\alpha$  and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 314–320 (2006).

Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):373-5.

Legaspi A, Jeevanandam M, Starnes HF Jr, Brennan MF. Whole body lipid and energy metabolism in the cancer patient. *Metabolism.* 1987;36:958-963.

Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab Brain Dis.* 2008 Dec;23(4):361-73.

Lindqvist A, de la Cour CD, Stegmark A, Håkanson R, Erlanson-Albertsson C. Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regul Pept.* 2005 Sep 15;130(3):123-32.

Lofredda S., Yang SQ, Lin HZ et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12:57-65 (1998).

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175–184, 2007.

Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1683-90.

Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(6):851-60.

Maedler K, Dharmadhikari G, Schumann DM, Størling J. Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Sep;9(9):1177-88. Review.

Martinez-Botas J, Andreson J, Tessler D, Lapillojonne A, Hung-Junn Chang B, Quast M, Gorenstein D, Chen K-H, Chan L. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Leprdb/db* mice. *Nature Genetics* 2000;26:474–479.

Mehta NN, McGillicuddy FC, Anderson PD, Hinkle CC, Shah R, Pruscino L, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Reilly MP. Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):172-81.

Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435.

Mimura K, Yukawa S, Mori Y, Okada K, Mune M, Nishikawa O, Hibino A, Sonobe M, Goto T, Nomoto H. Effect of platelet-activating factor on lipoprotein lipase and blood lipids. *Lipids*. 1991 Dec;26(12):1102-7.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Panahloo A, Goodrick S, Coppack SW, Yudkin JS. Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1997 May;14(5):376-80.

Mokdad AH. My personal perspective on the obesity epidemic. *Soz Praventivmed*. 2003;48(3):143-4.

Monteiro, C.A.; Mondini, L.; Costa, R.L. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). *Revista de Saúde Pública*, 34:251-258, 2000a.

Montrucchio, G.; Alloati G. and Camussi G. Role of Platelet-Activating Factor in Cardiovascular Pathophysiology *Physiol Rev* 80:1669-1699, (2000).

Naderali EK, Williams G. Effects of short-term feeding of a highly palatable diet on vascular reactivity in rats. *Eur J Clin Invest*. 2001 Dec;31(12):1024-8.

Neuzil, J.; Christison, J. K.; Iheanacho, E.; Fragonas, J.C.; Zammit, V.; Hunt, N.H.; Stocker, R. Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene Knock-out (apo-E<sup>-/-</sup>) mice: apo-E<sup>-/-</sup> mouse as a model for testing the role of tocopherol-mediated peroxidation in atherogenesis. *J.Lipid. Res.*, v.39, p.354-368, 1998.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., Sigiura, S. (2007) Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56, 1517–1526.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., Sigiura, S. (2008) In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 118, 710–721.

Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W 1997. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38:2125–2133.

Oita RC, Ferdinando D, Wilson S, Bunce C, Mazzatti DJ. Visfatin induces oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes in an Akt- and MAPK-independent, NFκB-dependent manner. *Pflugers Arch.* 2010 Mar;459(4):619-30.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH & Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461.

Perdereau, D., Narkewicz, M., Coup, C., Ferré, P., and Girard, J. (1990) Hormonal control of specific gene expression in the rat liver during the suckling-weaning transition. *Ads. Enzyme Regul.* 30. Q1-108.

Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes.* 1999 Mar;48(3):452-9.

Popkin, B.M. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World Development*, 27:1905-1916, 1999.

Popkin BM. Nutrition in transition: the changing global nutrition challenge. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2001;10 Suppl:S13-8.

Poubelle PE, Gingras D, Demers C, Dubois C, Harbour D, Grassi J, et al. Platelet-activating factor enhances the concomitant production of TNF- and IL-1 by subsets of human monocytes. *Immunology* 1991;72:181–187.

Prescott, S. M.; Zimmerman, G. A.; Stafforini, D. M. & McIntyre, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.*, 69, 419-45(2000).

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes.* 1997;46:1939-1944.

Plump, A.S.; Smith, J. D.; Hayek, T.; Aalto-Setälä, K.; Walsh, A; Verstuyft, J. G.; Rubin E. M.; Breslow, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, v.71, p.343-353, 1992.

Rayssiguier Y, Gueux E, Nowacki W, Rock E, Mazur A. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. *Magnes Res.* 2006 Dec;19(4):237-43.

Reaven, GM. Role of insulin resistance in human disease Diabetes. 1988 Dec;37 (12): 1595-607.

Rocha, V. Z., Libby, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 399–409 (2009).

Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem* 1964; 239: 375-380.

Roth M, Nauck M, Yousefi S, Tamm M, Blaser K, Perruchoud AP, et al. Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. *J Exp Med* 1996;184:191–201.

Ruis NM, Rose JK, Valone FH. Tumor necrosis factor release by human monocytes stimulated with platelet-activating factor. *Lipids* 1991;26:1060–1064.

Ryden M, Arner P. Fat loss in cachexia-is there a role for adipocyte lipolysis? *Clin Nutr.* 2007;26:1-6.

Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science.* 2008 Dec 5;322(5907):1539-43.

Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* **118**, 2992–3002 (2008).

Shukla, S. D., Buxton, D. B., Olson, M. S. and Hanahan, D. J. Acetylglycerol ether phosphorylcholine. A potent activator of hepatic phosphoinositide metabolism and glycogenolysis - *J. Biol. Chem.* 258, 10212-10214 (1983).

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):13740-6. Epub 2003 Jan 30.

Snyder, F. -Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 190, 125-135 (1989).



Snyder F. Metabolic processing of PAF. *Clin Rev Allergy*. 1994 Winter;12(4):309-27. Review.

Soares, A.C., Pinho, V.S., Souza, D.G., Shimizu, T., Ishii, S., Nicoli, J.R. & Teixeira, M.M. (2002). Role of the plateletactivating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with Gram negative bacteria. *Br. J. Pharmacol.*, 137, 621 – 628.

Somm E, Cettour-Rose P, Asensio C, Charollais A, Klein M, Theander-Carrillo C, Juge-Aubry CE, Dayer JM, Nicklin MJ, Meda P, Rohner-Jeanrenaud F, Meier CA. Interleukin-1 receptor antagonist is upregulated during diet-induced obesity and regulates insulin sensitivity in rodents. *Diabetologia*. 2006 Feb;49(2):387-93. Epub 2005 Dec 30.

Sorisky A, Magun R, Gagnon AM. Adipose cell apoptosis: death in the energy depot. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Nov;24 Suppl 4:S3-7.

Souza, D.G., Pinho, V., Soares, A.C., Shimizu, T., Ishii, S. & Teixeira, M.M. (2003). Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br. J. Pharmacol.*, 139, 733–740.

Stolk, R.P., Meijer, R., Mali, W.P., Grobbee, D.E., and van der Graaf, Y. 2003. Ultrasound measurements of intraabdominal fat estimate the metabolic syndrome better than do measurements of waist circumference. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:857–860.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., Obin, M.S. Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes*, 56:2910-2918. 2007.

Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 88, 1-7, (2010).

Tansey J, Sztalryd C, Gruia-Gray j, Roush D, Zeo J, Gavriloova O, Reitman M, Deng C-X, Ki C, Kimmel A, Londos C. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2001;98:6494–6499.

Tilg H, Wolf AM. Adiponectin: a key fat-derived molecule regulating inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2005 Apr;9(2):245-51. Review.

Travers, M.T., Vernon, R.G., Barber, M.C. Repression of the acetyl-CoA carboxylase gene in ovine adipose tissue during lactation: the role of insulin responsiveness. *Journal of Molecular Endocrinology* (1997) 19, 99–107.

Trayhurn P & Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60, 329–339.

Trayhurn P & Wood IS (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347–355.

Trayhurn P, Wood IS: Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5):1078-1081.

Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.* 2008 Aug;100 (2):227-35. Epub 2008 Apr 9.

Triggiani, M. Schleimer, R. P., Warner, J. A. and Chilton, F. H. Differential synthesis of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine and platelet-activating factor by human inflammatory cells. *J. Immunol.*, 146, 660-666 (1991).

Tsukui, S., T. Kanda, M. Nara, M. Nishino, T. Kondo, and I. Kabayashi. Moderate-intensity regular exercise decreases serum tumor necrosis factor-alpha and HbA(1c) levels in healthy women. *Int. J. Obes.* 24:1207–1211 (2000).

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. and Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* **389**, 610–614 (1997).

Venable, M. E.; Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res.*, 34(5), 691-702. (1993).

Vendrell J, Broch M, Villarassa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, Simon I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines: Relationship in obesity. *Obesity Res.* 2004;12:962-71.

Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2004;279:47066–75.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin invest.*;112(12):1796-808 (2003).

Wellen KE, Hotamisligil, GS. Inflammation, stress, and diabetes *J Clin Invest*, 115:1111-1119 (2005).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva; 149p, 2004.

Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation.* 2007 Feb 27;115(8):1029-38. Epub 2007 Feb 12.

Wu R, Lemne C, De Faire U, Frostegård J. Antibodies to platelet-activating factor are associated with borderline hypertension, early atherosclerosis and the metabolic syndrome. *J Intern Med.* 1999 Oct;246(4):389-97.

Xu, H., Hirosumi, J., Uysal, K.T., Guler, A.D., Hotamisligil, G.S. Exclusive action of transmembrane TNF $\alpha$  in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology* 143(4):1502–1511, 2002.

Xu, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112:1821-1830 (2003).

Ye R.D., Prossitz, E.R., Zuo A., and Cochrane, C.G. Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 105–111, (1991).

Yost, T. J., D. R. Jensen, B. R. Haugen, and R. H. Eckel. 1998. Effect of dietary macronutrient composition on tissue-specific lipoprotein lipase activity and insulin action in normal-weight subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 296–302.

Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and interleukin-1 beta release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2817-25.

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;372:425-31.

Zhang, S.H.; Reddick, R.L.; Pietrahita, J. A.; Maeda, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*,v.258, p.468-471, 1992.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004;306:1383–6.