

SOLANGE SILVEIRA PEREIRA

ASSOCIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA NA
SECREÇÃO DE ADIPOCINAS

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010

SOLANGE SILVEIRA PEREIRA

ASSOCIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA NA
SECREÇÃO DE ADIPOCINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline I. Alvarez Leite

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG.
2010

P436a Pereira, Solange Silveira.
Associação de estresse oxidativo e obesidade induzida por
dieta na secreção de adipocinas / Solange Silveira Pereira. – 2010.
75f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline I. Alvarez Leite.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Estresse oxidativo – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Tecido
adiposo – Teses. 4. Adipocinas – Teses. I. Alvarez Leite, Jacqueline
Isaura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Farmácia. III. Título.

CDD 612.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

SOLANGE SILVEIRA PEREIRA

**“ASSOCIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E OBESIDADE
INDUZIDA POR DIETA NA SECREÇÃO DE ADIPOCINAS”**

APROVADA EM 02 DE FEVEREIRO DE 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. DANUSA DIAS SOARES

Prof. Dr. VALBERT CARDOSO NASCIMENTO

Profa. Dra. JACQUELINE ISAURA ALVAREZ LEITE
Orientadora

AGRADECIMENTOS

- A Deus que é a força maior que rege todas as minhas realizações e por mais esta conquista;
- À Professora Jacqueline pela orientação neste trabalho, pela compreensão e paciência diante das minhas limitações e por ter me dado oportunidade de fazer parte do seu grupo o que me possibilitou grande aprendizado e aquisição de conhecimentos;
- À Professora Adaliene, pela fundamental colaboração para a realização deste trabalho, e também à Zélia pelo auxílio na realização do ELISA;
- Aos meus colaboradores Lílian, Edenil, Fabíola e Rafael, pela importante ajuda durante esses dois anos, que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho;
- A todos queridos amigos do LABIN que também colaboraram e me apoiaram sempre que foi necessário; obrigada também pela amizade, pelo agradável convívio, pelos conhecimentos adquiridos nas reuniões de grupo, e também pelos divertidos momentos de lazer;
- À Maria Helena, pelo cuidado com os animais utilizados nos experimentos;
- Aos funcionários e colegas de outros laboratórios que permitiram a utilização de equipamentos necessários para a realização de alguns experimentos;
- Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos da UFMG pelos conhecimentos transmitidos e pela contribuição em minha formação científica;
- Às secretárias do PPGCA Úrsula e Marilene pela competência nos serviços prestados;
- A CNPq pela bolsa concedida;
- À minha mãe, Elenice, que sempre, com seu amor, me apoiou nas minhas escolhas, o que contribuiu muito para essa conquista; obrigada também por ser essa mãe tão dedicada, amorosa, e meu maior exemplo de força e superação;
- Aos meus irmãos: Helinho, Mara, Márcia e Franci, por serem os meus melhores amigos, pelo amor, apoio, incentivo, por sempre acreditarem em mim e por estarem sempre presentes me amparando nos momentos difíceis durante esses dois anos, e por sempre fazerem minha vida mais feliz;
- Ao meu sobrinho Yuri, que me auxiliou prontamente em vários momentos com seus conhecimentos de informática;
- À minha cunhada Karla pela extrema boa vontade em me auxiliar no momento final desse trabalho;

-Às minhas primas e amigas: Dany, Thaísa, Renata e Marcinha por estarem sempre presentes nesse momento da minha vida, com sua amizade, carinho e apoio sempre que necessário;

-Às minhas Tias Ângela e Helen pelo amparo e carinho tão importantes nesse período;

- A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO	15
3.1.1 O sistema de defesa antioxidante	17
3.1.2 Estresse oxidativo na obesidade.....	18
3.2 OBESIDADE	20
3.2.1 O tecido adiposo na obesidade.....	22
3.3 ADIPOCINAS	24
3.3.1 Adiponectina.....	24
3.3.2 TNF α	26
3.3.3 IL6	27
3.3.4 Outras adipocinas.....	28
3.4 CAMUNDONGOS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS	31
3.4.1 Camundongo C57BL/6 como modelo de obesidade induzida por dieta.....	31
3.4.2 Camundongos deficientes do gene da apolipoproteína E (ApoE ^{-/-}) como modelo de estresse oxidativo e obesidade induzida por dieta.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.2 MATERIAL	34
4.2.1 Animais e Dietas.....	34
4.3 MÉTODOS	35
4.3.1 Ingestão alimentar.....	35
4.3.2 Evolução ponderal, Ganho de Peso Acumulado e Adiposidade...	35
4.3.3 Amostras de sangue.....	35
4.3.4 Determinação da glicose sérica.....	36
4.3.5 Teste de Tolerância Oral à glicose.....	36
4.3.6 Determinação das concentrações de triglicerídeos séricos.....	37
4.3.7 Determinação das concentrações de colesterol total.....	37
4.3.8 Determinação das concentrações de HDL colesterol.....	37
4.3.9 Determinação das frações aterogênicas e índice aterogênico.....	38
4.3.10 Amostras de tecidos.....	38
4.3.11 Avaliação da peroxidação lipídica- TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)	38
4.3.12 Dosagem da concentração de hidroperóxidos.....	39
4.3.13 Histologia do tecido adiposo.....	40

4.3.14	Extração do tecido adiposo e dosagem da atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG)	40
414.3.15	Extração do tecido adiposo e dosagem de adiponectina, TNF α e IL6 no tecido adiposo.....	41
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS.....	42
5.1	INGESTÃO ALIMENTAR, EVOLUÇÃO PONDERAL, GANHO DE PESO ACUMULADO, E ADIPOSIDADE.....	42
5.2	GLICEMIA, TRIGLICERÍDEOS, COLESTEROL TOTAL E HDL SÉRICOS, FRAÇÃO ATEROGÊNICA E ÍNDICE ATEROGÊNICO....	45
5.3	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	47
5.3.1	Fígado	48
5.3.2	Músculo.....	49
5.3.3	Tecido adiposo	50
5.4	ANÁLISES DO TECIDO ADIPOSO.....	51
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
8	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE TABELAS

1A	Composição das dietas (ingredientes)	34
1B	Composição química das dietas.....	35
2	Peso corporal inicial, Ingestão alimentar e calórica por animal/dia e peso do tecido adiposo visceral.....	43
3	Concentrações séricas de Triglicerídeos, Colesterol Total, HDLc, Fração Aterogênica e Índice Aterogênico de animais C57BL/6 e ApoE ^{-/-} alimentados com dieta comercial e hiperlipídica por 9 semanas.....	47

LISTA DE FIGURAS

1	Esquema representando o estresse oxidativo.....	16
2	Um modelo ilustrando como o aumento da produção espécies reativas de oxigênio (ERO) em gordura acumulada contribui para a síndrome metabólica.....	19
3	Mecanismos potenciais de inflamação induzida por obesidade.....	21
4	Tecido adiposo: componentes celulares e moleculares sintetizados.....	23
5	Evolução ponderal ao longo das nove semanas de experimento.....	44
6	Ganho de peso acumulado ao final de nove semanas.....	44
7	Adiposidade final em percentual de gordura visceral.....	45
8	Glicemia de jejum e Teste de Tolerância Oral à Glicose.....	46
9	Estresse oxidativo hepático.....	48
10	Estresse oxidativo muscular.....	49
11	Estresse oxidativo no tecido adiposo.....	50
12	Área do Adipócito do tecido adiposo epididimal (visceral).....	51
13	Avaliação indireta da infiltração de macrófagos ativados no tecido adiposo epididimal.....	52
14	Secreção de adiponectina avaliada pelo método ELISA.....	53
15	Secreção de TNF α avaliada pelo método ELISA.....	54
16	Secreção de IL6 avaliada pelo método ELISA.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-epi-PGF _{2α}	- 8-epi-prostaglandina- F _{2α}
ADIPOR	- receptor de adiponectina 8-epi-PGF _{2α}
AGT	- angiotensinogênio
AOX	- antioxidantes
ApoE	- apolipoproteína E
ApoE ^{-/-}	- deficiente para o gene da apolipoproteína E
BHT	- butilhidroxitolueno
BSA	- soroalbumina bovina
CCL2	- quimiocina com motivo ligante c-c 2
CLS	- estruturas semelhantes a coroas
CRP	- proteína C-reativa
CT	- controle
DCV	- doenças cardiovasculares
DM2	- <i>diabetes mellitus</i> tipo 2
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
ERO	- espécies reativas de oxigênio
GSH	- glutathiona reduzida
GSH-Px	- glutathiona peroxidase
HDL	- lipoproteína de alta densidade
HE	- hematoxilina-eosina
HIPER	- hiperlipídica
HRP	- peroxidase
ICAM-1	- molécula de adesão intracelular 1
IDL	- lipoproteína de densidade intermediária
IL-6	- interleucina 6
IMC	- índice de massa corporal
IRS-1	- substrato para receptor de insulina 1
JNK-1	- c-jun N-terminal quinase
LDL	- lipoproteína de baixa densidade

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

LPL	- lipase lipoproteica
MCP-1	- proteína quimiotática para monócitos
MDA	- malondialdeído
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAG	- n-acetil glicosaminidase
NFκB	- fator de transcrição nuclear κB
NO	- óxido nítrico
$\cdot\text{O}_2^-$	- ânion superóxido
$\cdot\text{OH}$	- radical hidroxil
OMS	- organização mundial da saúde
ONOO \cdot	- peroxinitrito
OPD	- o-fenilenodiamina
PAI-1	- inibidor do ativador de plasminogênio
PBS	- salina tamponada com fosfato
PPAR γ	- receptor ativado de proliferados de peroxissoma
PTN	- proteína
QM	- quilomícrom
QMr	- quilomícrom remanescente
RNA m	- ácido ribonucléico mensageiro
RNS	- substâncias reativas ao nitrogênio
SOC3	- supressor da sinalização de citocina tipo 3
SOD	- superóxido dismutase
TA	- tecido adiposo
TBA	- ácido tiobarbitúrico
TBARS	-substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	- ácido tricloroacético
TNF α	- fator de necrose tumoral α
TPP	- trifenilfosfina
UA	- unidades arbitrárias
UCP	- proteína desacopladora
VCAM-1	- molécula de adesão vascular 1
VLDL	- lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

Obesidade e ingestão energética aumentada exercem efeitos prejudiciais à saúde relacionados ao estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a contribuição de um estado pró-oxidativo e do aumento da adiposidade em diversas características do tecido adiposo visceral em animais controles (C57BL/6) ou com estresse oxidativo basal (ApoE^{-/-}). Animais de ambas as linhagens foram divididos em subgrupos: dieta comercial e hiperlipídica. Foram avaliados: estresse oxidativo, parâmetros de obesidade e secreção de adipocinas no tecido adiposo. Foi demonstrado que animais ApoE^{-/-} com dieta hiperlipídica apresentaram maior estresse oxidativo que os C57BL/6 com a mesma dieta. Os parâmetros de obesidade foram maiores em ambas as linhagens alimentadas com dieta hiperlipídica. As adipocinas pró-inflamatórias foram maiores no ApoE^{-/-} com dieta hiperlipídica demonstrando a importância do estresse oxidativo e obesidade associados na inflamação do tecido adiposo.

Palavras-Chave: estresse oxidativo; obesidade; tecido adiposo; adiposidade; adipocinas; ApoE.

ABSTRACT

ASSOCIATION OF OXIDATIVE STRESS AND DIET-INDUCED OBESITY IN ADIPOKINES SECRETION. Obesity and increased energy intake exert adverse health effects related to oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the contribution of a pro-oxidative state and increased adiposity in several characteristic lines of visceral adipose tissue in control animals (C57BL/6) or basal oxidative stress (ApoE^{-/-}). Animals of both strains were divided into subgroups: commercial and high-fat diet. We evaluated oxidative stress, parameters of obesity and adipokines in adipose tissue. It was shown that animals ApoE^{-/-} high-fat diet had higher oxidative stress than the C57BL/6 with the same diet. The parameters of obesity were higher in both strains fed high-fat diet. Inflammatory adipokines were higher in ApoE^{-/-} high-fat diet demonstrating the importance of oxidative stress and associated with obesity in adipose tissue inflammation.

Keywords: oxidative stress, obesity, adipose tissue, adiposity, adipokines, ApoE.

1- INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo sistêmico é o desequilíbrio entre a geração de oxidantes e mecanismos de defesa antioxidantes, que tem como resultado o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (RUDICH et al., 2007). Recentes estudos apontam que os mecanismos pelo qual a obesidade e a ingestão energética aumentada exercem efeitos prejudiciais à saúde estão relacionados à extraordinária capacidade em induzir estresse oxidativo (DINIZ et al., 2008). O estresse oxidativo tem sido implicado na aterosclerose e em complicações microvasculares do diabetes tipo 2. Evidências emergentes apontam o papel das ERO em várias formas de resistência à insulina (ERIKSSON, 2007). Estudos em humanos e modelos experimentais de obesidade mostram forte correlação entre adiposidade e marcadores do estresse oxidativo sistêmico (PAUSOVA, 2006).

A obesidade é caracterizada pela expansão do tecido adiposo com conseqüências significativas devido à perturbação de um complexo sistema de regulação energética (LENZ & DIAMOND Jr., 2008). O tecido adiposo é reconhecido hoje como uma importante fonte de hormônios e citocinas denominadas adipocinas, dentre elas: leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL-6), inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), angiotensinogênio, dentre outras (DE LORENZO et al., 2007). Na obesidade o tecido adiposo é acometido por uma infiltração de macrófagos, e o grau de infiltração correlaciona positivamente com a adiposidade corporal (PAUSOVA, 2006). A infiltração de macrófagos é maior no tecido adiposo visceral e guarda relação direta com marcadores de morbidades associadas à obesidade. Os macrófagos infiltrados são, provavelmente, a maior fonte de ERO e citocinas inflamatórias no tecido adiposo. (RUDICH et al., 2007).

A atividade proinflamatória das adipocinas e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo caracterizam a obesidade como um estado de inflamação crônica de baixo grau e têm importante relação com o aumento da resistência à insulina, diabetes tipo 2, aterosclerose, bem como outros componentes da síndrome metabólica que são eventualmente relacionados à inflamação (LENZ & DIAMOND Jr., 2008). A variação no volume do adipócito e na localização do acúmulo de tecido adiposo afeta a produção de determinadas adipocinas. Um aumento na massa de tecido adiposo está associado

ao aumento e superexpressão de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e PAI-1 e subexpressão de adiponectina. A elevação da IL-6 demonstrou estar diretamente relacionada com a resistência à insulina e foi considerada um fator preditivo para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (GREENBERG & OBIN, 2006). A expressão do $\text{TNF}\alpha$ está diretamente relacionada ao IMC. O $\text{TNF}\alpha$, como a IL-6, está envolvido no desenvolvimento da resistência à insulina e também na indução da aterogênese. A resistina, um polipeptídeo que demonstrou ter relação direta com a resistência à insulina tem uma expressão maior em tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo em roedores. O PAI-1 e a MCP-1, adipocinas implicadas na aterogênese, e o angiotensinogênio, adipocina implicada na hipertensão arterial têm sua expressão e secreção aumentadas na obesidade (YANAI et al., 2008). A leptina, hormônio relacionado ao controle do apetite e homeostase energética tem sua expressão e secreção aumentadas na obesidade. Tem sido sugerido que a hiperleptinemia pode estar envolvida na patogênese de doenças relacionadas à obesidade (STEFANOVIC et al., 2008). A adiponectina, adipocina relacionada à melhora na sensibilidade à insulina tem sua secreção e expressão reduzidas na obesidade. (KERSHAW & FLIER, 2004).

Portanto, deve-se considerar a forte correlação entre estresse oxidativo e obesidade, e também as adipocinas como importantes mediadores de inflamação e desordens metabólicas secundárias à obesidade. Dessa forma é importante avaliar a contribuição do estresse oxidativo e da obesidade induzida por dieta associados na secreção de adipocinas.

2- OBJETIVO GERAL

- Avaliar a contribuição de um estado pró-oxidativo e do aumento da adiposidade em características inflamatórias do tecido adiposo visceral em animais eutróficos ou com obesidade induzida por dieta.

2.1- Objetivos Específicos

- Induzir a expansão do tecido adiposo em camundongos deficientes na apolipoproteína E ($\text{ApoE}^{-/-}$) que possuem estresse oxidativo basal aumentado e de seus controles C57BL/6 pelo uso de dietas hiperlipídicas.

- Avaliar a extensão do tecido adiposo através do ganho de peso, adiposidade e área de adipócitos em ambas as linhagens de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.
- Determinar o perfil lipídico e glicemia em ambas as linhagens de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.
- Avaliar a estado oxidativo no fígado, músculo e tecido adiposo em ambas as linhagens de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.
- Determinar a presença de macrófagos ativados residentes no tecido adiposo pela determinação da atividade da enzima N-acetil-glicosaminidase e presença de estruturas semelhantes a coroas em ambas as linhagens de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.
- Avaliar a secreção de adiponectina, IL-6 e TNF α no tecido adiposo visceral em ambas as linhagens de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo intracelular de compostos reativos ao oxigênio e ao nitrogênio, principalmente as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Ocorre nas células como consequência de um desequilíbrio entre o sistema redox, por causa do excesso de ERO, depleção de antioxidantes (AOX) ou ambos (Figura 1) (ECHTAY, 2007; MATSUZAWA-NAGATA, 2008).

ERO é um termo utilizado para descrever uma variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron desemparelhado) derivadas do metabolismo do oxigênio (ECHTAY, 2007). Possuem meia vida extremamente curta, são altamente reativas, produzidas em todos os sistemas biológicos e reagem facilmente com moléculas que se localizam em torno do seu sítio de formação (ROBERTS & SINDHU, 2009). ERO incluem radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^\cdot) e radicais lipídicos, bem como espécies oxidantes não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (STREINBRENNER & SIES, 2009).

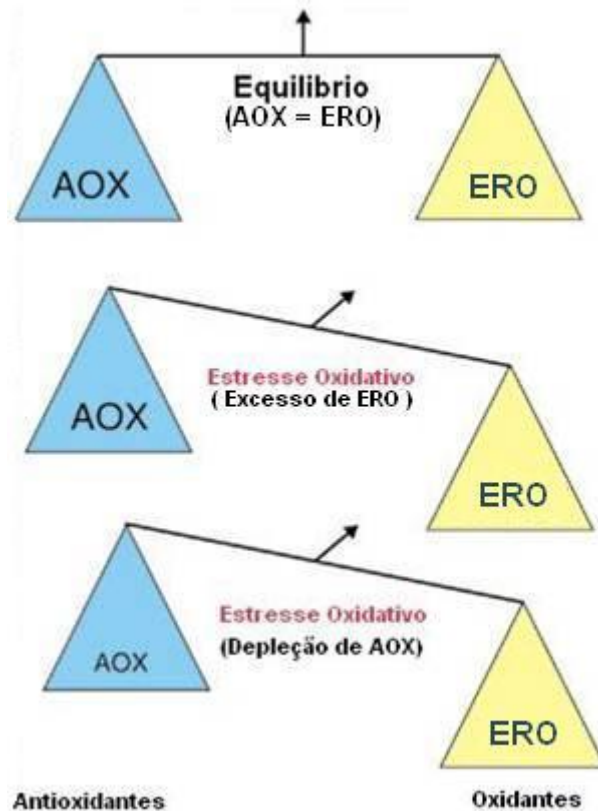


Figura 1- Esquema representando o estresse oxidativo

ERO podem ser produzidos por diferentes vias, entretanto, a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte por possuir vários centros redox, capazes de transferir um elétron da molécula de oxigênio para formar ânion superóxido (ECHTAY, 2007; ANGELOPOULOU et al., 2009). A mitocôndria também possui numerosas proteínas antioxidantes e desacopladoras (UCPs), bem como canais iônicos que modificam o gradiente de prótons; todos esses fatores se combinam para proporcionar um controle bem ajustado do estado *redox* celular. Outras enzimas, como as oxidases de membrana, são também importantes fontes de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) que podem se combinar para produzir peroxinitritos (ONOO') e que modificam a função mitocondrial (NUNN et al., 2009). Dentre elas destaca-se o complexo enzimático de membrana NADPH oxidase. Suas subunidades se unem sob ativação e formam uma enzima funcional, que após transferir elétron para o oxigênio molecular produz ânion superóxido. Outras fontes de ERO são: xantina oxidase, uma enzima

expressa na parede vascular e também circulante no plasma; mieloperoxidase, uma hemoproteína expressa em neutrófilos e monócitos que é secretada durante ativação dessas células, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que sob condições fisiológicas produz óxido nítrico (NO) que interage com ERO (WASSMANN et al., 2004).

3.1.1 - O sistema de defesa antioxidante

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo em remover essas espécies (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). O sistema de defesa antioxidante consiste em uma série de enzimas antioxidantes além de numerosos compostos antioxidantes endógenos e de origem dietética que reagem com as ERO neutralizando-as (ROBERTS & SINDHU, 2009). O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase. As SOD constituem o maior sistema de defesa do organismo contra o ânion superóxido por catalisar a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem três isoformas de SODs, a Mn-SOD mitocondrial, a Cu/Zn-SOD citoplasmática e a SOD extracelular (ROBERTS & SINDHU, 2009). O H_2O_2 formado pela dismutação do O_2^- pela SOD é convertido em H_2O e O_2 pela catalase, uma enzima antioxidante localizada em peroxissomos celulares. Além da catalase, a glutathiona peroxidase também remove H_2O_2 por acoplar sua redução com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A GSH-Px é uma enzima antioxidante que contém selênio e, além de reduzir efetivamente o H_2O_2 , reduz também peróxidos lipídicos a lipídios alcoólicos. Essas enzimas estão presentes no citoplasma em concentrações milimolares e também estão presentes na matriz mitocondrial (WASSMANN et al., 2004; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Ao lado das enzimas, existem os antioxidantes não enzimáticos que incluem a vitamina E, C e β -caroteno, que são parte de uma dieta saudável. A vitamina E é diretamente associada à neutralização de ERO, enquanto a vitamina C é necessária principalmente para a regeneração da vitamina E. Além das vitaminas existem também a glutathiona reduzida (GSH) e numerosos compostos fitoquímicos. As células devem manter os seus níveis de antioxidantes através da ingestão dietética e/ou síntese *de novo* (ANGELOPOULOU et al., 2009; ROBERTS & SINDHU, 2009).

O estresse oxidativo causa danos às macromoléculas celulares como os ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos e lipídios estruturais. Dentre estes alvos, a

peroxidação de lipídios é particularmente prejudicial porque seus produtos levam a uma fácil propagação de reações de radicais livres (ECHTAY, 2007).

Durante as últimas duas décadas, evidências consideráveis implicaram o estresse oxidativo em várias condições, incluindo, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e doença renal crônica (PENNATHUR & HEINECKE, 2007). No diabetes, o estresse oxidativo desregula a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo e diminui a secreção de insulina das células β -pancreáticas. O estresse oxidativo está implicado também em manifestações relacionadas à síndrome metabólica, como adiposidade e resistência à insulina, e na patofisiologia da hipertensão e da aterosclerose por afetar diretamente as células da parede vascular (FURUKAWA et al., 2004; ROBERTS & SINDHU, 2009). O estresse oxidativo aumentado é considerado o ambiente característico no organismo do indivíduo diabético bem como no obeso (RUDICH, 2007; ANDO & FUJITA, 2009).

3.1.2 - Estresse oxidativo na obesidade

A associação entre estresse oxidativo celular e obesidade está bem documentada. Em um estudo clínico populacional realizado em Framingham com 2828 indivíduos, foi encontrada associação positiva entre índices de obesidade, como o índice de massa corporal (IMC) e a relação cintura/quadril, com níveis urinários de 8-epi-PGF_{2 α} , (produto da oxidação do ácido araquidônico) um importante marcador de estresse oxidativo (KEANEY et al., 2003).

A ingestão de uma dieta altamente calórica resulta num estado pós-prandial de hipertrigliceridemia, hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, gerando um estado de estresse oxidativo (ESPOSITO & GIUGLIANO, 2005). Hiperglicemia leva ao aumento na produção de ERO na mitocôndria, por aumentar o gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial. Quando o gradiente excede o limiar, a transferência de elétrons no complexo III da cadeia respiratória é bloqueada, levando a um escape de elétrons da ubiquinona, com formação de ânion superóxido (CHOI et al., 2008). O aumento nos níveis de ácidos graxos livres nos tecidos e na circulação também relaciona a obesidade à produção aumentada de ERO. Ácidos graxos livres são conhecidos como ativadores da produção de superóxido dependente de NADPH oxidases em várias células, inclusive as fagocíticas (SCHÖNFELD & WOJTCZACK, 2008). Estudos recentes têm demonstrado

que o estresse oxidativo, induzido por elevadas concentrações de glicose e ácidos graxos livres, ambos característicos da obesidade, desenvolve um papel significativo no desenvolvimento da resistência à insulina e na disfunção das células β (STEFANOVIC, 2008).

O estresse oxidativo no tecido adiposo de obesos é acompanhado por elevação na circulação de citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF}\alpha$ e IL-6, importantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes (ESPOSITO & GIUGLIANO, 2005). FURUKAWA et al. (2004) demonstraram que o aumento de ERO no tecido adiposo de camundongos KK (modelo de obesidade) está associado ao aumento na expressão de NADPH oxidase, e expressão reduzida de enzimas antioxidantes como a SOD e a catalase; e que o estresse oxidativo aumentado no tecido adiposo está fortemente correlacionado com aumento de marcadores inflamatórios, desregulação de adipocinas e resistência à insulina (Figura 2). A resistência à insulina é considerada um fator central na patogênese de comorbidades que acompanham a obesidade, incluindo diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares apontando dessa forma o possível mecanismo que relaciona obesidade à síndrome metabólica (RUDICH et al., 2007).



Figura 2 - Um modelo ilustrando como o aumento da produção espécies reativas de oxigênio (ERO) em gordura acumulada contribui para a síndrome metabólica (Adaptado de FURUKAWA et al., 2004).

Dados emergentes sustentam a hipótese que o estresse oxidativo representa um papel causal na resistência à insulina e está ligado à adiposidade visceral (PENNATHUR & HEINECKE, 2007). O estresse oxidativo no tecido adiposo visceral é considerado atualmente um marcador precoce da síndrome metabólica em animais e humanos e pode ser considerado, portanto, um novo alvo terapêutico para essa desordem (HOOPS et al., 2010).

3.2- OBESIDADE

A obesidade é considerada atualmente um dos maiores problemas mundiais de saúde pública e é amplamente reconhecida como causa de um elevado risco cardiometabólico para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) (MARINOU et al., 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2005 aproximadamente 1,6 bilhões de adultos maiores de 15 anos tinham sobrepeso e mais de 400 milhões eram obesos. Estima-se que em 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos (BRAY et al., 2009).

Obesidade é definida como a presença excessiva de gordura corporal, tem forte predisposição genética e resulta do desequilíbrio energético, em que a ingestão de energia é excedente em relação ao consumo pelo organismo (HAJER et al., 2008; MARINOU et al., 2010). Estudos epidemiológicos indicam uma forte correlação entre o aumento no consumo de alimentos densamente energéticos e a dramática elevação na incidência e prevalência de obesidade (ZOU & SHAO, 2008).

A obesidade visceral, correlacionada com a circunferência da cintura, é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina, isto é, reduzida sensibilidade à ação da insulina, passo fundamental para o desenvolvimento do DM2 (ZEYDA & STULNIG, 2007). Além da resistência à insulina, outros fatores estão associados à obesidade visceral, dentre eles, dislipidemia, hipertensão arterial e trombose, levando a um agrupamento de riscos para DCV, denominado síndrome metabólica (ANTUNA-PUENTE et al., 2008). A utilização da medida da circunferência da cintura, para avaliar a obesidade central (visceral), é considerada um critério diagnóstico essencial devido às fortes evidências que associam a circunferência da cintura a outras comorbidades metabólicas; e a obesidade central é o provável fator

desencadeador das etapas iniciais da cascata etiológica da síndrome metabólica (MAURY & BRICHARD, 2010).

Complicações relativas à obesidade demonstram relação direta com a expansão da massa de tecido adiposo, e trouxe elucidções da influência deste tecido no balanço energético e na gênese de alterações metabólicas e inflamatórias (TRAYHURN, 2007). A obesidade é considerada atualmente um estado de inflamação crônica de baixo grau, devido às alterações inflamatórias que ocorrem no tecido adiposo. Essas alterações estão associadas ao aumento de macrófagos no tecido adiposo e ao aumento na produção de citocinas e quimiocinas proinflamatórias que induzem a resistência à insulina em tecidos periféricos e aumentam o risco para aterosclerose (Figura 3).

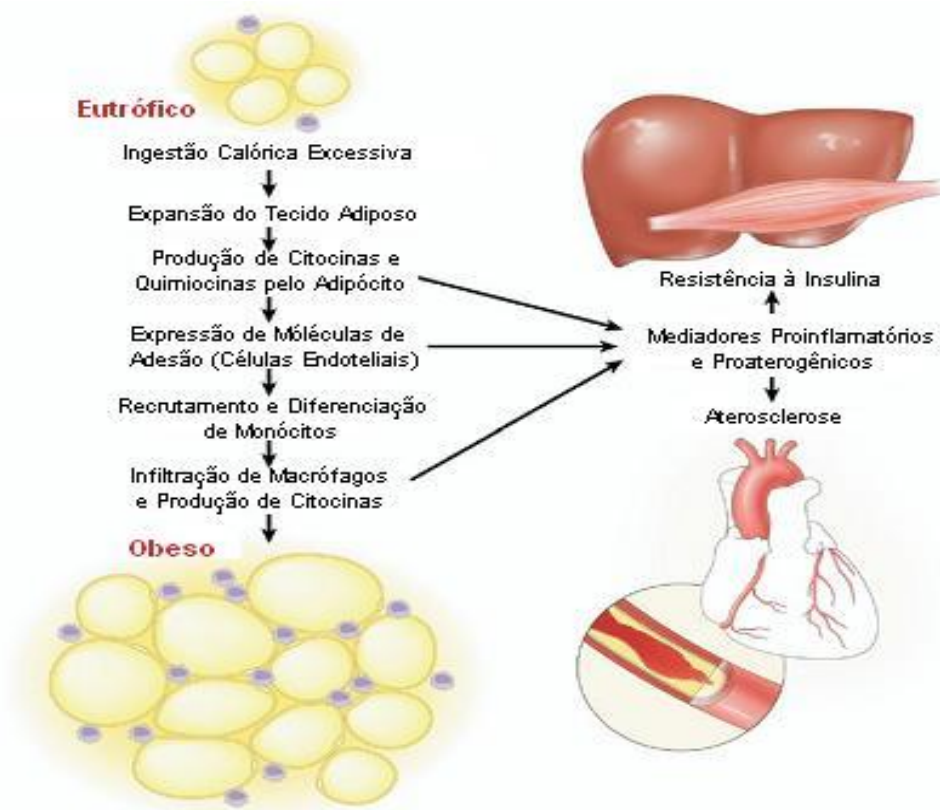


Figura 3 – Mecanismos potenciais de inflamação induzida por obesidade. O acúmulo de lipídeos no tecido adiposo e a expansão da massa levam ao início de um processo inflamatório. Este processo é iniciado através da produção de citocinas proinflamatórias e quimiocinas pelo adipócito incluindo $TNF\alpha$, IL6 e MCP-1. Células endoteliais respondem com o aumento na expressão de moléculas de adesão que juntamente às quimiocinas recrutam células imunes incluindo macrófagos derivados de monócitos para o tecido adiposo. Esses fatores juntos criam um ambiente inflamatório que promove a resistência local à insulina. Mediadores proinflamatórios e proaterogênicos entram na circulação e promovem resistência à insulina em tecidos periféricos e aumentam o risco para aterosclerose. Adaptado de SHOELSON et al., 2007.

Assim, as alterações que ocorrem no tecido adiposo associado à adiposidade aumentada, como aumento no tamanho do adipócito, presença aumentada de macrófagos e desregulação de mediadores proinflamatórios e proaterogênicos, podem estar implicados na patofisiologia cardiovascular, e são capazes de modificar o risco para DCV (MARINO et al., 2010; LIONETTI et al., 2009).

3.2.1- O tecido adiposo na obesidade

O tecido adiposo já foi considerado, há poucas décadas, apenas como um órgão para estoque de triglicerídeos. Entretanto, é bem reconhecido hoje seu papel como órgão endócrino que secreta numerosos hormônios e citocinas envolvidos no metabolismo lipídico e de glicose, inflamação, coagulação, pressão sanguínea e comportamento alimentar, afetando dessa forma o metabolismo e função de alguns órgãos e tecidos como músculos, fígado, vasos sanguíneos e cérebro (HEILBRONN & CAMPBELL, 2008; HAJER et al., 2008). As moléculas sintetizadas no tecido adiposo são coletivamente chamadas de adipocinas. De forma notável incluem a leptina, adiponectina, resistina, interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) (HALBERG et al., 2008).

O tecido adiposo possui diferentes tipos celulares dentre eles: adipócitos e células do estroma vascular que incluem: fibroblastos, células endoteliais, preadipócitos e células do sistema imunológico, como os macrófagos. Além disso, o tecido adiposo visceral e subcutâneo apresentam diferenças na capacidade metabólica e no padrão de adipocinas secretada (SURMI & HASTY, 2008; HAJER et al., 2008; MAURY & BRICHARD, 2010).

Na obesidade, o tecido adiposo é caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia do adipócito, infiltração de macrófagos e ativação de células endoteliais. O tamanho do adipócito está relacionado à expressão e secreção desregulada de adipocinas. A expressão de adiponectina, uma adipocina implicada na melhora da sensibilidade à insulina, está diminuída na obesidade. Adicionalmente há uma regulação positiva na expressão de adipocinas proinflamatórias como a IL6 e o $TNF\alpha$, que contribuem para o aumento da resistência à insulina em tecidos periféricos (MARINO et al., 2010). Outra adipocina que tem secreção aumentada pelo adipócito hipertrófico é a MCP-1, potente quimiotática para infiltração de monócitos/macrófagos no tecido adiposo (MAURY & BRICHARD, 2010). Tem sido demonstrado que a inflamação no tecido adiposo de

camundongos e humanos obesos é atribuída em grande parte às ações pró-inflamatórias de macrófagos infiltrados que se encontram em torno de adipócitos mortos, formando elementos morfológicos característicos, denominados “estrutura semelhante à coroa”. Algumas citocinas que têm importante papel na patogênese da resistência à insulina, como $TNF\alpha$, IL6 e resistina, são expressas de forma abundante em macrófagos residentes no tecido adiposo (CINTI et al., 2005; MURANO et al., 2008). (Figura 4)

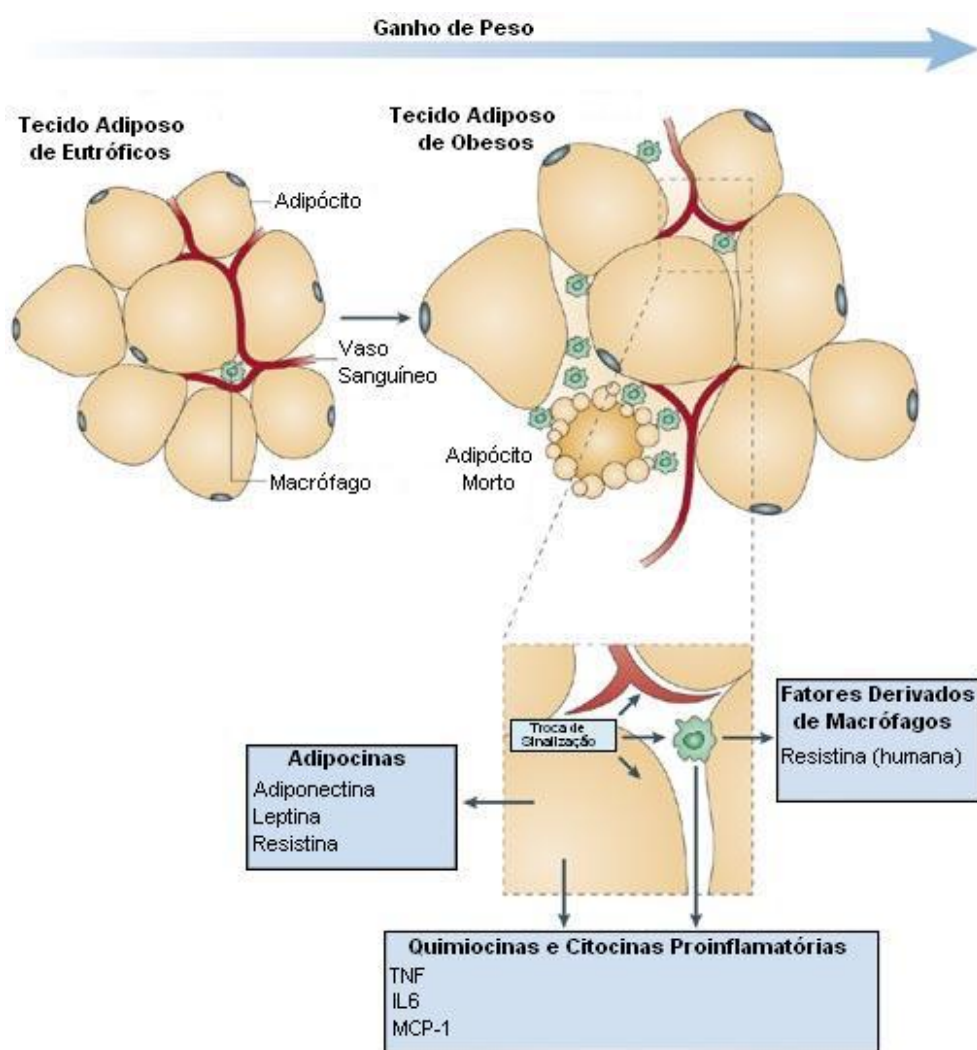


Figura 4 - Tecido adiposo: componentes celulares e moleculares sintetizados. A expansão do tecido adiposo durante o ganho de peso leva ao recrutamento de macrófagos através de vários sinais, que podem incluir quimiocinas sintetizadas por adipócitos, como a MCP-1. Esses macrófagos são encontrados principalmente em torno de adipócitos mortos. Vários mediadores sintetizados pelo adipócito e por macrófagos residentes podem contribuir para a inflamação local e sistêmica. Adaptado de TILG & MOSCHEN, 2006.

A associação de obesidade e infiltrado de macrófagos no tecido adiposo foi descrita pela primeira vez por WEISBERG et al. (2003) e trouxe novos esclarecimentos no entendimento da inflamação relacionada à obesidade. Em humanos a infiltração de macrófagos está relacionada com o tamanho do adipócito e com o aumento na adiposidade visceral; e é reduzida após perda de peso induzida por cirurgia em indivíduos morbidamente obesos (CANCELLO et al., 2006; RUDICH et al., 2007). Além do aumento no número de macrófagos, a obesidade também induz uma mudança fenotípica na polarização do macrófago no tecido adiposo. Macrófagos que migram para o tecido adiposo de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, diferem dos que residem no tecido adiposo de animais alimentados com dieta normal. Macrófagos residentes ou M2 (ativados alternativamente) são caracterizados por expressão e produção de citocinas antiinflamatórias, enquanto os macrófagos recrutados ou M1 (ativados classicamente), em consequência de obesidade induzida por dieta, produzem altos níveis de citocinas proinflamatórias como $TNF\alpha$ e IL6 (LUMENG et al., 2007).

Macrófagos ativados no tecido adiposo de obesos secretam ERO, e a resposta celular às citocinas proinflamatórias também podem induzir mudanças no estado *redox*, sugerindo que a inflamação pode ser uma fonte do estresse oxidativo aumentado no tecido adiposo (RUDICH et al., 2007). Foi demonstrado por FURUKAWA et al. (2004), que o tecido adiposo de camundongos obesos apresenta elevados níveis de marcadores do estresse oxidativo e níveis reduzidos de enzimas antioxidantes; e que essas alterações estão correlacionadas à desregulação de adipocinas. De fato, fatores como o adipócito hipertrófico, acompanhado da infiltração de macrófagos e aumento no estresse oxidativo levam ao aumento na expressão e secreção de adipocinas proinflamatórias e proaterogênicas, e queda na expressão e secreção da adiponectina, uma adipocina antiinflamatória (MAURY & BRICHARD, 2010). Portanto, indivíduos obesos são caracterizados por um estado de inflamação crônica de baixo grau que pode ser um fator causal no desenvolvimento de resistência à insulina e outras desordens associadas à obesidade, que culminam com a síndrome metabólica (GUALILLO et al., 2007).

3.3- ADIPOCINAS

3.3.1- Adiponectina

A adiponectina é uma proteína secretada exclusivamente pelo adipócito. Estruturalmente está relacionada ao fator C1q do sistema de complemento e também compartilha homologia estrutural com o colágeno VIII e X. Circula abundantemente no plasma em várias formas multiméricas: como trímeros de baixo peso molecular até dodecâmeros de alto peso molecular. Um corpo crescente de evidências sugere que a forma complexa de alto peso molecular é a forma mais ativa e contribui para a maioria dos efeitos metabólicos periféricos da adiponectina (GALIC et al., 2009).

Em contraste à maioria das adipocinas a expressão de adiponectina diminui com o aumento da adiposidade e é altamente expressa no tecido adiposo subcutâneo (LENZ & DIAMOND Jr., 2008). Existe uma forte correlação negativa entre níveis plasmáticos de adiponectina com eventos cardiovasculares, desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (ROCHA & LIBBY, 2009). Os mecanismos relativos à regulação negativa na produção de adiponectina podem envolver um ambiente hormonal anormal, juntamente com elevado estresse oxidativo e um estado proinflamatório que prevalece na obesidade e síndrome metabólica (FURUKAWA et al., 2004; MAURY & BRICHARD, 2010).

A adiponectina tem um amplo espectro de efeitos metabólicos e antiinflamatórios e age principalmente via dois receptores: o ADIPOR1 encontrado no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo e o ADIPOR2 encontrado no fígado e tecido adiposo (BONET et al., 2009; LAGO et al., 2009; BRAY et al., 2009). Os efeitos metabólicos da adiponectina devem-se à melhora na sensibilidade à insulina, inibição na entrada de ácidos graxos não esterificados, oxidação de ácidos graxos e redução na secreção de glicose no fígado; e aumento na captação de glicose e adipogênese no tecido adiposo. No músculo estimula o metabolismo da glicose e acelera a oxidação de ácidos graxos livres (GREENBERG & OBIN, 2006; ANTUNA-PUENTE et al., 2007; LENZ & DIAMOND Jr., 2008; BONET et al., 2009). Seu efeito antiinflamatório e antiaterogênico devem-se à inibição do crescimento de precursores de macrófagos e sua diferenciação em células espumosas, inibição da adesão de monócitos na parede vascular por reduzir a expressão de moléculas de adesão e inibição na remodelagem e proliferação de células musculares da parede vascular (KERSHAW & FLIER, 2004; BRAY et al., 2009). BARB et al. (2007) demonstraram em um estudo *in vitro* que a adiponectina suprimiu a atividade fagocítica de macrófagos maduros e a produção de fator de necrose tumoral (TNF α). Estudos de caso-controle indicaram que concentrações de adiponectina circulante *in vivo* estão associadas inversamente ao risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer relacionados à obesidade

incluindo, câncer de mama, próstata e endométrio (BARB et al., 2007). Todos estes estudos, juntamente, sugerem que a adiponectina é o único hormônio derivado do adipócito que possui propriedades antiinflamatórias, antiaterogênicas e antidiabetes.

3.3.2- TNF α

O TNF α é sintetizado como uma proteína transmembrana de 26kDa, que quando submetida à clivagem por metaloproteinases é secretada na circulação como uma molécula solúvel de 17kDa. Anteriormente, sugeriu-se que o adipócito fosse a principal fonte de TNF α na obesidade. Entretanto, recentemente tem sido reconhecido que macrófagos do tipo M1 são a principal fonte de TNF α derivada do tecido adiposo de obesos (WEISBERG et al., 2003; GALIC et al., 2009).

O TNF α foi descrito como o primeiro fator derivado do tecido adiposo que representa uma associação entre obesidade, inflamação e diabetes. HOTAMISLIGIL et al. (1993) demonstraram aumentada expressão de RNAm de TNF α na obesidade e desde então tem sido fortemente implicado na patogênese da resistência à insulina.

Além de estar envolvido no aumento da resistência à insulina, o TNF α é também uma citocina proinflamatória e proaterogênica. Tem ação parácrina e autócrina e influencia substancialmente a síntese de adipocinas, através da ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B, aumentando a expressão de adipocinas proinflamatórias como IL6, MCP-1, e o próprio TNF α , e diminuindo a expressão de adiponectina (GUALILLO et al., 2007; BRAY et al., 2009). A expressão aumentada de RNAm de TNF α no tecido adiposo é altamente induzida por obesidade, e é maior no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (ZOU & SHAO, 2008; MAURY & BRICHARD, 2010).

A ação proaterogênica do TNF α se deve à indução no aumento da expressão da molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), e MCP-1 na parede vascular e por induzir a expressão de receptores *scavengers* e captação de LDL oxidada por macrófagos (BRAY et al., 2009; MAURY & BRICHARD, 2010).

O TNF α também está implicado em mediar a resistência à insulina em adipócitos através da interferência na expressão de várias proteínas implicadas na via de sinalização de insulina (ZOU & SHAO, 2008). Um dos possíveis mecanismos é a

atenuação na ativação do substrato para receptor de insulina 1 (IRS-1) através da fosforilação de um resíduo de serina mediado pela c-Jun N-terminal quinase 1 (JNK1) (ANTUNA-PUENTE, et al., 2008; RABE et al., 2008; ZOU & SHAO, 2008). Outro mecanismo descrito é a inibição da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento na mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo na corrente sanguínea, que acarreta resistência à insulina em tecidos periféricos como o fígado e músculos. (HERMSDORFF et al., 2008; GUILHERME et al., 2008). Estudos demonstraram que triglicerídeos e ácidos graxos livres exercem forte influência na expressão de $TNF\alpha$. Roedores tratados com uma dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão de $TNF\alpha$ e alteração da via de sinalização insulínica in vivo; anticorpos anti $TNF\alpha$ melhoraram a sensibilidade à insulina em roedores obesos. Estudos sugerem também que elevados níveis de $TNF\alpha$ na obesidade suprimem a expressão de adiponectina por mecanismos parácrinos e autócrinos, portanto prejudicando a sensibilidade à insulina de outros tecidos através da regulação negativa de adiponectina circulante (GREENBERG & OBIN, 2006; ZOU & SHAO, 2008).

3.3.3- IL- 6

A IL6 humana é uma cadeia polipeptídica única de 185 aminoácidos que formam um feixe de quatro α -hélices. Seu peso molecular varia entre 21 e 28 kDa dependendo do estado de glicosilação (HOENE & WEIGERT, 2007). IL-6 é uma citocina próinflamatória que está envolvida em múltiplos processos fisiológicos incluindo inflamação, injúria tecidual e defesa do hospedeiro. 10 a 35% da IL6 circulante é sintetizada pelo tecido adiposo, e aproximadamente 90% da IL6 sintetizada no tecido adiposo é proveniente de células do estroma vascular como macrófagos, células endoteliais e preadipócitos (BRAY et al., 2009).

Os níveis circulantes de IL6 e a produção pelo tecido adiposo estão positivamente correlacionados com obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina, e possui correlação negativa com os níveis de adiponectina. A hipertrofia do adipócito e estímulos inflamatórios como o $TNF\alpha$ promovem produção aumentada de IL6. Elevados níveis plasmáticos de IL6 são preditivos para DM2, síndrome metabólica e DCV. A expressão pelo tecido adiposo e os níveis circulantes diminuem com a perda de peso. (KERSHAW & FLIER, 2004; HOENE & WEIGERT, 2007; HERMSDORFF et al., 2008; MAURY & BRICHARD, 2010). A produção de IL6 pelo tecido adiposo visceral

é três vezes maior em comparação ao subcutâneo, e fornece potencial ligação entre gordura visceral e resistência à insulina, bem como gordura visceral e inflamação (SHOELSON et al., 2007; MAURY & BRICHARD, 2010).

Uma importante ação relativa à função inflamatória da IL6 é a indução na produção hepática de proteínas inflamatórias, como a Proteína C-reativa (PCR). A associação positiva entre níveis de IL6 do tecido adiposo e níveis circulantes de PCR é um importante fator de risco cardiovascular (ANTUNA-PUENTE et al., 2008).

Os mecanismos que associam IL6 com resistência à insulina assemelham-se aos descritos para o $TNF\alpha$, como a atenuação na sinalização na ativação do IRS-1 através da fosforilação do resíduo de serina, e inibição na LPL e consequente aumento na liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo. No fígado a IL6 reduz a síntese hepática de glicogênio dependente de insulina por suprimir a via de transdução de sinal SOCS-3 (supressor da sinalização de citocina tipo 3). A resultante inibição da fosforilação do IRS-1 pode levar à resistência hepática à insulina (HERMSDORFF et al., 2008; BRAY et al., 2009; GALIC et al., 2009).

Em contraste, a IL6 pode sensibilizar células musculares para os efeitos da insulina como a síntese de glicogênio e captação de glicose. A diferença nas vias de sinalização utilizada pela IL6 pode fornecer explicações para os controversos resultados na ação da insulina em diferentes órgãos periféricos, como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (HOENE & WEIGERT, 2007).

3.3.4-Outras adipocinas

Leptina é um hormônio peptídeo não glicosilado de 16 kDa, constituído de 167 aminoácidos. (GUALILLO et al., 2007). É codificada pelo gene *ob* e produzida principalmente pelo tecido adiposo, particularmente por adipócitos maduros diferenciados. Possui ação no cérebro, principalmente hipotálamo, e em outros tecidos periféricos como células β -pancreáticas, fígado e sistema imunológico (BRAY et al., 2009; MAURY & BRICHARD, 2010). A leptina desempenha um importante papel na homeostase energética (ZOU & SHAO, 2008). Os efeitos metabólicos incluem redução na ingestão energética, estímulo na captação de glicose pelo músculo esquelético, na lipólise no adipócito, na oxidação de ácidos graxos em diferentes tecidos (músculo, fígado e tecido adiposo), na expressão de proteínas desacopladoras (UCPs) em diversos tecidos, na termogênese no tecido adiposo marrom e inibição na

gliconeogênese e lipogênese hepática (VÁZQUEZ-VELA, et al., 2008; BONET et al., 2009). A concentração e expressão de leptina estão diretamente associadas à adiposidade, mudanças no peso corporal e estado nutricional. A insulina é um potente ativador da expressão e secreção de leptina. É estimulada também por glicocorticóides, $TNF\alpha$ e estrógenos (KERSHAW & FLIER, 2004). Em humanos a expressão do RNAm de leptina é maior no tecido adiposo subcutâneo que no visceral (ZOU & SHAO, 2008; BRAY et al., 2009).

Na obesidade, a hiperleptinemia está frequentemente associada com resistência à leptina, uma condição em que a capacidade de estoque de gordura está aumentada em relação à capacidade de oxidação. A resistência à leptina acarreta esteatose hepática, e acúmulo de gordura ectópica no músculo, coração e pâncreas. A leptina tem sido considerada uma citocina proinflamatória. Tem sido sugerido também possuir ação quimiotática e pode iniciar o recrutamento de monócitos e macrófagos no tecido adiposo (TILG & MOSCHEN, 2006; SURMI & HASTY, 2008). Portanto, a hiperleptinemia seguida da resistência à leptina pode ser uma importante causa da disfunção do adipócito e suas consequências, e da sobrecarga de lipídeos em tecidos periféricos na obesidade, fator favorável ao desenvolvimento de resistência à insulina (VÁZQUEZ-VELA et al., 2008).

Resistina é um polipeptídeo de aproximadamente 12 kDa e foi identificada pela primeira vez em 2001, como produto da secreção de adipócitos de ratos, durante a adipogênese (ZOU & SHAO, 2008; BONET et al., 2009). É expressa por adipócitos em roedores e por macrófagos em humanos e sua produção está aumentada na obesidade (GALIC et al., 2009). Sua principal ação é desregular a sensibilidade à insulina em roedores, inibindo a sinalização da insulina e promovendo intolerância à glicose (GUALILLO et al., 2007). Tem sido implicada no desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 associadas à obesidade em modelos murinos. Obesidade genética (camundongos *ob/ob* e *db/db*) está associada com alta concentração sérica de resistina. O consumo crônico de gordura (45% do total de energia) aumenta a concentração sérica de resistina, desregula a sensibilidade à insulina e diminui a tolerância à glicose (VÁZQUEZ-VELA et al., 2008). Possui também propriedades proinflamatórias, sugerindo seu papel no processo inflamatório (BRAY et al., 2009). Em humanos, os níveis plasmáticos de resistina correlacionam diretamente com marcadores de inflamação em várias condições patológicas dentre elas a aterosclerose e suas complicações. Como outras citocinas proinflamatórias, a resistina estimula a

sinalização intracelular por meio da ativação do NF κ B, promovendo dessa forma a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias incluindo o TNF α , IL-6, MCP-1 e moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1) (SHOELSON et al., 2007). Tem sido sugerido que a resistina pode representar um elo entre inflamação e a resistência à insulina (BONET et al., 2009).

Proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) conhecida também como CCL2, é uma proteína que recruta células do sistema imune aos sítios de inflamação e sua expressão é aumentada em lesões ateroscleróticas (KANDA et al., 2006; SHOELSON et al., 2007). É produzida principalmente por macrófagos e células endoteliais (KANDA et al., 2006). Os níveis circulantes e no tecido adiposo estão aumentados na obesidade. No tecido adiposo sua expressão é maior em células do estroma vascular em relação aos adipócitos, e no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (MAURY & BRICHARD, 2010). De acordo com SHOELSON et al. (2007) a MCP-1 é regulada positivamente pela leptina, e sua expressão no tecido adiposo está aumentada em camundongos geneticamente obesos diabéticos (*db/db*) e camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (KANDA et al., 2006). Foi observado também, que o aumento na expressão de MCP-1, induziu aumento na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, na resistência à insulina, e aumentou o conteúdo hepático de triglicérides em camundongos. Adicionalmente, a deleção do gene para MCP-1 diminuiu a extensão do acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, a resistência à insulina e a esteatose hepática associada à obesidade (KANDA et al., 2006). Portanto, a MCP-1 associa obesidade e resistência à insulina por meio da indução de uma resposta inflamatória no tecido adiposo, e desempenha um importante papel na patogênese da síndrome metabólica (BOURLIER & BOLOUMIE, 2009).

PAI-1 é um inibidor de serino-proteases e é o mais importante inibidor fisiológico da ativação do plasminogênio. PAI-1 aumentado leva à hipofibrinólise e a um estado pró-trombótico (MAURY & BRICHARD, 2010). É secretado principalmente por plaquetas e endotélio vascular, entretanto, é produzido também no fígado e no tecido adiposo por macrófagos infiltrados e adipócitos, o que contribui para elevados níveis dessa proteína de fase aguda na obesidade. A síntese de PAI-1 no tecido adiposo é regulada positivamente por estresse oxidativo, TNF α , ácidos graxos livres e outras citocinas (ALESSI et al., 2007; BRAY et al., 2009; MAURY & BRICHARD, 2010). Níveis de PAI-1 possuem forte correlação com IMC e parâmetros da síndrome metabólica, e

sua produção estão diretamente associados à adiposidade visceral (KERSHAW & FLIER, 2004; DE TAEYE, 2005). Em humanos níveis elevados de PAI-1 favorecem a instabilidade da placa aterosclerótica, e tem sido identificado como importante fator preditivo para o infarto do miocárdio (ALESSI et al., 2007). Sua concentração também correlaciona com resistência periférica à insulina em indivíduos obesos com DM2 (SHOELSON et al., 2007). Fortes evidências emergem, portanto, considerando o importante papel da elevação do PAI-1 no desenvolvimento do fenótipo obeso e suas consequências metabólicas (MAURY & BRICHARD, 2010).

Angiotensinogênio (AGT) é o precursor da angiotensina I que após a conversão em angiotensina II desempenha um importante papel na regulação da pressão sanguínea (ANTUNA-PUÉNTE et al., 2008). AGT é produzido principalmente pelo fígado, entretanto, o tecido adiposo é a principal fonte extra-hepática, e pode contribuir para o aumento dos níveis circulantes em indivíduos obesos. Adipócitos são uma importante fonte de AGT e a expressão de RNAm de AGT é maior no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (MAURY & BRICHARD, 2010). Uma variedade de hormônios são capazes de regular a expressão de RNAm de AGT em adipócitos, dentre eles, glicocorticóides e andrógenos. Em adipócitos humanos isolados, elevadas concentrações de insulina aumentaram a expressão de AGT; e ácidos graxos livres também têm sido examinados como reguladores do AGT no adipócito (THATCHER et al., 2009). Camundongos AGT- *knockout*, submetidos a uma dieta hiperlipídica, com superexpressão seletiva de AGT no tecido adiposo, desenvolveram obesidade e especialmente hipertensão; compatível com o envolvimento do AGT secretado pelo tecido adiposo na gênese desse fenótipo (ANTUNA-PUÉNTE et al., 2008). Em humanos, estudos demonstraram que as concentrações plasmáticas de AGT e a pressão sanguínea correlacionam positivamente com o IMC, sustentando a relação entre AGT no tecido adiposo na obesidade e hipertensão sistêmica (THATCHER et al., 2009).

3.4- CAMUNDONGOS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS

3.4.1- Camundongo C57BL/6 como modelo de obesidade induzida por dieta

Vários modelos de animais transgênicos têm sido utilizados para o estudo da obesidade e suas complicações. No entanto, eles têm a grande desvantagem de não representarem fatores envolvidos na etiologia atual da doença, dentre eles a ingestão calórica excessiva. Modelos animais de obesidade induzida por dieta têm sido muito importantes por mostrar o papel específico da dieta no desenvolvimento da obesidade (VÁZQUEZ-VELA et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que o camundongo C57BL/6 é uma linhagem suscetível ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta e resistência à insulina, e tem sido considerado o padrão ouro para modelo de obesidade induzida por dieta. Ele produz um fenótipo obeso quando ofertadas dietas hiperlipídicas e hipercalóricas *ad libitum*, enquanto C57BL/6 submetido a uma dieta pobre em lipídeos e calorias permanece normal (BUETNER et al., 2007; REUTER, 2007). BUETNER et al. (2007) demonstraram em um estudo de metanálise que a linhagem C57BL/6 é também o modelo ideal para estudos das desordens metabólicas relativas à obesidade, inclusive estudo do perfil de adipocinas. Portanto, camundongos C57BL/6 se aproximam bastante das formas mais comuns da obesidade humana (REUTER, 2007).

3.4.2. Camundongos deficientes do gene da apolipoproteína E (Apo E^{-/-}) como modelo de estresse oxidativo e obesidade induzida por dieta

A apoE foi descrita primeiramente como produto de hepatócitos, e é componente estrutural de superfície das lipoproteínas quilomícrons (QM) e seu remanescente (QMr), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Atualmente sabe-se que apoE é altamente expressa nos adipócitos e no tecido adiposo (HUANG et al., 2006). A ausência da apoE acarreta redução na razão VLDL/LDL e significativamente reduz o transporte reverso de colesterol para o fígado (KATO et al., 2009). Camundongos Apo E^{-/-} possuem o mesmo background genético do C57BL/6, porém com a deleção do gene para apoE. São camundongos que desenvolvem hipercolesterolemia espontânea e rápido desenvolvimento de aterosclerose, o que os faz modelos preferenciais para o estudo dessas desordens (KATO et al., 2009).

Recentemente tem sido atribuída à apoE a função de moduladora do estresse oxidativo, caracterizando-a como importante antioxidante (SACRE et al., 2003). Camundongos deficientes em apoE (ApoE^{-/-}) possuem um estado basal pró oxidante

devido à retirada da apoE. TARNUS et al., (2009) demonstraram em um estudo *in vitro*, que o aumento de ERO no meio, estimulou o aumento na expressão de apoE, e adicionalmente, a apoE diminuiu a formação de radicais livres e reduziu o acúmulo de proteínas carboniladas em adipócitos submetidos ao H₂O₂.

Existem estudos que utilizam o camundongo ApoE^{-/-} como modelos satisfatórios para o estudo da obesidade induzida por dieta (SCHREYER et al., 2002, HUANG et al., 2006; LOHMAN et al., 2009). Porém, estudos que investigam a influência do estado pró oxidativo secundário à deficiência de apoE nas alterações no tecido adiposo ainda são escassos (TARNUS et al., 2009).

Tem sido atribuído ao estresse oxidativo, várias comorbidades associadas à obesidade e síndrome metabólica como: resistência à insulina, diabetes e aterosclerose. Estudos apontam que essas comorbidades têm como fator causal a desregulação de adipocinas no tecido adiposo (FURUKAWA et al., 2004; ESPOSITO & GIUGLIANO, 2005). Assim, o uso do animal ApoE^{-/-}, que possui estado basal pró oxidativo, pode ser relevante para o estudo de características do tecido adiposo, secundárias à obesidade induzida por dieta, em comparação a animais com a mesma dieta, porém, sem estado basal pró oxidativo. Dessa forma camundongos ApoE^{-/-} constituem relevante modelo experimental, não só para aterosclerose, como também para estresse oxidativo.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-}, foram distribuídos de forma homogênea quanto ao peso e divididos em dois subgrupos por linhagem. Os quatro subgrupos foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo controle C57BL/6 com dieta comercial (CT);
- Grupo controle C57BL/6 com dieta Hiperlipídica para indução de obesidade (HIPER);
- Grupo suscetível ao estresse oxidativo (ApoE^{-/-}) com dieta comercial (CT);
- Grupo suscetível ao estresse oxidativo (ApoE^{-/-}) com dieta Hiperlipídica para indução de obesidade (HIPER).

4.2-MATERIAL

4.2.1- Animais e Dietas

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (n=40) e ApoE^{-/-} (n=36) com idade entre 6-7 semanas obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas e no Biotério Ênio Cardillo Vieira da Universidade Federal de Minas Gerais, respectivamente. Os animais tiveram livre acesso à dieta e água e foram mantidos em gaiolas coletivas (3 animais por gaiola), em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas e temperatura controlada em torno de 22°C. Os animais foram mantidos no Biotério Enio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) com o número de protocolo 221/2008.

Por um período de 9 semanas, os animais foram alimentados com dietas específicas (tabelas 1 A e B) e após este período, foram sacrificados por exanguinação da artéria femoral e posterior deslocamento cervical.

Tabela 1A- Composição (g/kg) da dieta Hiperlipídica

Ingredientes	Dieta hipercalórica e hiperlipídica ¹
Xarope de Groselha	309,80
Banha de porco	355,0
Caseína (99%)	200,0
Amido de milho	59,3
Celulose	50,0
Mix minerais	35,0
Óleo de soja	20,0
BHT	0,014
Mix vitaminas	10,0
Bitartarato de colina	2,5
Metionina	3,0

¹ Adaptado de AKAGIRI et al. (2007)

Tabela 1B- Composição química das dietas

	Controle *	Hiperlipídica
Carboidrato	50%	25%
Proteína	42%	15%
Gordura total	8%	60%
Calorias / g dieta	2,2 kcal/g	5,5 kcal/g

* Ração comercial Labina®. Composição fornecida pelo fabricante

4.3-MÉTODOS

4.3.1- Ingestão alimentar

A quantificação da ingestão alimentar foi obtida pesando-se a dieta ofertada no início e no final de cada semana. A diferença entre a dieta ofertada e o restante não consumido foi considerada o consumo de dieta semanal. Para o cálculo do consumo calórico, o consumo semanal (em gramas) foi multiplicado pela densidade calórica da dieta.

4.3.2 - Evolução ponderal, Ganho de peso acumulado e Adiposidade

Os animais foram pesados semanalmente em balança semi-analítica para avaliar a evolução ponderal. No dia que antecedeu ao sacrifício os animais foram pesados para a aquisição do peso corporal final. O ganho de peso acumulado foi obtido pela diferença entre os pesos final e inicial de cada animal. Após o sacrifício, o tecido adiposo foi retirado e pesado. Para o cálculo da adiposidade, utilizou-se a fórmula:

$$\text{Adiposidade} = \frac{\text{Peso do tecido adiposo}}{\text{Peso corporal final}} \times 100$$

4.3.3- Amostras de sangue

No início do experimento, após jejum noturno, foram retiradas amostras de sangue da veia caudal. Ao final de 9 semanas, após o mesmo período de jejum e sob

anestesia (kentamina (70mg/Kg) e xilazina (11,5 mg/Kg), intraperitonealmente), todos os animais foram sacrificados por exanguinação pela artéria femoral sem uso de anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 6.000 rpm durante 5 minutos em centrífuga de mesa Fanem Centrimicro 243 para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas à -75°C , para posterior análise.

4.3.4- Determinação da glicose sérica

A concentração de glicose sérica foi avaliada ao término das 9 semanas de experimento e foi medida através de um sistema enzimático, utilizando o kit comercial PAP Liquiform, da Labtest Diagnóstica SA, Brasil. O método consiste na oxidação da glicose pela glicose oxidase, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este último reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando um composto chamado antipirilquinonimina cuja intensidade de cor róseo avermelhada é proporcional à concentração de glicose na amostra.

O sangue retirado no sacrifício foi separado utilizando fluoreto com antiglicolítico, sendo $2\mu\text{L}$ de soro transferidos para uma microplaca de 96 poços e adicionados a $200\mu\text{L}$ do reagente de cor. Após incubação de 15 minutos a 37°C , a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

Para a determinação do padrão foram substituídos $2\mu\text{L}$ da amostra por $2\mu\text{L}$ de padrão. Para o cálculo das concentrações de glicose em mg/mL foi utilizada a fórmula indicada pelo Kit Labtest: Média da absorbância da amostra / média da absorbância do padrão x 100.

4.3.5- Teste de Tolerância Oral à Glicose

O teste de tolerância oral à glicose é utilizado para estimar a resistência à insulina. Após um jejum de 6 horas os animais receberam solução de D-glicose, 2g/Kg de peso corporal, por gavagem. Antes da gavagem (tempo zero) e 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem foi feita a leitura da glicemia, com auxílio de fitas e glicosímetro Accu Chek Advantage[®], de uma gota de sangue caudal. A glicemia foi dada em mg/mL em cada tempo avaliado e depois feita a curva.

4.3.6- Determinação das concentrações de triglicerídeos séricos

As concentrações de triglicerídeos séricos foram medidas de acordo com o método enzimático colorimétrico (FOSSATI & PRENCIPE, 1982), utilizando kit comercial Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise de triglicerídeos do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol), e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com máximo de absorção a 500nm. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas. A diluição utilizada foi de 5 μ L de soro em 245 μ L de água destilada.

4.3.7-Determinação das concentrações de colesterol total

As concentrações de colesterol foram medidas de acordo com o método da colesterol oxidase (ALLAIN et al., 1974) utilizando-se kit comercial Doles (Brasil). O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 500nm.

As concentrações de colesterol no soro foram determinadas por um ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com FAZIO et al. (1997). 5 μ L das amostras de soro foram diluídas em água destilada (1:200), afim de que as leituras de absorbância sejam adequadas à variação linear do teste. 100 μ L de reagente de colesterol total foram adicionados a 100 μ L do soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37° C a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

4.3.8- Determinação das concentrações de HDL colesterol

As concentrações de colesterol HDL no soro foram dosadas por meio do kit enzimático Doles, Brasil. O princípio se baseia na precipitação seletiva de LDL e VLDL por polietilenoglicol tamponado (PEG 6000), restando apenas a fração HDL no sobrenadante.

O sobrenadante foi separado em uma microplaca de 96 poços, sendo 10µL da amostra adicionados a 200µL do reagente de cor Colesterol 250 Doles/ Colesterol Enzimático Líquido Doles. Após incubação de 15 minutos a 37° C, a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

Para a determinação do padrão, foi substituído 10µL de sobrenadante de HDLc por 10µL de padrão. Para o cálculo das concentrações de HDLc foi feita a determinação do fator de Calibração através da seguinte equação: F (Fator de calibração) = 40/média da Absorbância do Padrão; HDLc= Absorbância da amostra x Fator de calibração.

4.3.9- Determinação das frações aterogênicas e índice aterogênico

O colesterol das frações aterogênicas (LDLc, VLDLc e IDLc) foi calculado pela diferença entre o colesterol total e HDL (HDLc) e o índice aterogênico obtido pela divisão dos valores de colesterol da fração aterogênica pelo HDLc.

4.3.10- Amostras de tecidos

O fígado, o músculo gastrocnêmio e o tecido adiposo visceral dos animais foram retirados, perfundidos com salina tamponada com fosfato (PBS) e acondicionados a -75°C para as análises posteriores.

4.3.11- Avaliação da peroxidação lipídica- TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, que são geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído é o principal. A formação do malondialdeído, pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, é um conveniente método para se determinar o grau de peroxidação lipídica.

A mensuração dos metabólitos, reativos ao ácido tiobarbitúrico, foi realizada em microplacas pelo método descrito por BUEGE et ali. (1978). O fígado, músculo e tecido adiposo (100mg de tecido mais 1,0 ml de PBS 1X) foram triturados com um homogeneizador (Euro Turraz T20b, IKA labortechnik) e mantidos em gelo. Um volume

de 500 μ L do homogenato de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio e foi adicionado 1 ml de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCL 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionadas aos tubos 1,5 ml de ácido butílico, e depois vigorosamente agitadas. Após uma centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e plaqueado em duplicata e a leitura foi realizada a 535 nm. O resultado foi normalizado por dosagem de proteínas pela técnica de Lowry (1951), segundo o qual a concentração de proteínas nas amostras é calculada através de uma curva padrão, feita com albumina.

4.3.12 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos

O ensaio da oxidação ferrosa do Xilenol *Orange* consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994; BANERJEE et al., 2002). O indicador utilizado é o Xilenol *Orange*, que se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado. No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX-2 (preparado pela dissolução do xilenol *Orange* e do sulfato ferroso amoniacal em 250 mM de H_2SO_4 para uma concentração final de 1 e 2,5 mM, respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol grau-HPLC contendo 4,4 mM de BHT, obtendo-se o reagente FOX-2.

Para as dosagens foram retirados 20 μ L do homogenato preparado para a análise de TBARS e, acrescido a este, 180 μ L do reagente para FOX-2 diretamente na microplaca, em duplicata. Para fazer o branco foi utilizado 20 μ L de água deionizada no lugar do homogenato. Em seguida, estas misturas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente a absorbância foi lida a 560 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Adicionalmente, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com Trifenilfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos (não- H_2O_2), já que a presença ou a ausência de TPP indica o teor de H_2O_2 da amostra (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994; BANERJEE et al., 2002).

Em 15 μ L do homogenato preparado para a análise de TBARS foi adicionado 5 μ L de TPP a 10 mM (a TPP foi diluída em metanol) diretamente na microplaca, em

duplicata, e foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foi acrescido 180µL do reagente para FOX-2 em cada poço. Para fazer o branco foram utilizados 15µL de água deionizada no lugar do homogenato. Em seguida, estas misturas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi lida a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

O Xilenol *Orange* ao se ligar aos íons férricos produz um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção de $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ a 560 nm. A concentração de hidroperóxidos pode ser estimada uma vez que o coeficiente de extinção dos hidroperóxidos é de $4,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ a 560 nm. Concentrações inferiores a 1µM podem ser detectadas.

Para quantificar os hidroperóxidos da amostra foram subtraídas as dosagens com TPP das sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra) que pode ser expressa em absorbância ou em µmolar.

4.3.13- Histologia do tecido adiposo

O tecido adiposo epididimal (visceral) retirado no sacrifício foi lavado em solução salina e fixado em solução de *Bouin* (água destilada saturada de ácido pícrico (70% do volume), formol a 10% (25 % do volume) e de ácido acético glacial (5% do volume). Após 24h o tecido foi transferido para uma solução de etanol 70% e, posteriormente, foi feita inclusão em parafina. Após a inclusão, foram feitos cortes de 7µm de espessura em micrótomo e montagem em lâminas de vidro. Cada lâmina continha 2 cortes retirados do bloco de parafina com uma distância mínima de 20 µm. As lâminas foram coradas pelo método HE (hematoxilina-eosina). A análise foi feita em microscópio acoplado à câmera digital em um aumento de 100x. A área do adipócito foi calculada pelo valor médio de 100 adipócitos por animal. O número de estruturas semelhantes a coroas (CLS), formadas por macrófagos infiltrados no tecido adiposo, foi determinado pela média de dez campos para cada animal. Os cortes foram analisados com auxílio do software Image-Pro Plus versão 6.3 (Bethesda, Maryland - USA).

4.3.14- Extração do tecido adiposo e dosagem da atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG)

Infiltração de células mononucleares foi quantificada medindo-se a atividade da enzima lisossomal N-acetilglicosaminidase (NAG) presente em níveis elevados em macrófagos ativados (BAILEY et al., 1988). Para tanto, 100mg de tecido foram homogeneizadas e maceradas em 2,0 mL de salina 0,9%/Tritonx-100 0,1% v/v, e em seguida, centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos a 4°C. 100µl do infranadante resultante foram incubados por 10 min. com 100µl de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida 2,24 mM (Sigma), diluído em tampão citrato 0,1 M / fosfato (pH 4,5). A placa foi incubada a 37°C por 10 minutos.

Para interromper a reação, foram adicionados 100µL de tampão glicina (0,2M, pH 10,6). A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400nm. O resultado foi multiplicado pela quantidade de tecido adiposo (em gramas), para ser expresso como valor absoluto da atividade de NAG no tecido adiposo.

4.3.15- Extração do tecido adiposo e dosagem de adiponectina, TNFα e IL6 no tecido adiposo

Para a dosagem das adipocinas adiponectina, TNFα e IL6 foi utilizado método ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) de captura (Kit R&D Systems). O ensaio foi realizado em amostras de 100mg de tecido adiposo homogeneizadas em 1 mL de solução para extração de proteínas (5% BSA em PBS estéril, pH 7,2-; 0,017% fenilmetil sulfonil fluorida, 0,048% cloreto de benzetônio, 0,37% EDTA, 0,002% aprotinina). O homogenato foi centrifugado a 10000rpm durante 10 minutos a 4°C. O infranadante resultante foi utilizado para o ensaio. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-camundongo adiponectina, TNFα e IL6 (anticorpo de captura- R&D Systems) e incubadas *overnight* em câmara úmida em temperatura ambiente. Após este período os poços foram lavados por três vezes com água Twen 20[®] 0,05%. Posteriormente a placa foi bloqueada para evitar ligações inespecíficas com 100µl de solução de bloqueio (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) e incubada 1 hora em temperatura ambiente. Terminado este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima.

Após o bloqueio foram adicionados 100µl das amostras diluídas 1:3 em reagente de diluição (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) e colocadas novamente em câmara úmida e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. As amostras foram plaqueadas em duplicata e foi colocado 100µl de solução de diluição em um poço para caracterização do branco. Após este período as placas foram lavadas como descrito previamente.

Após a lavagem adicionou-se 100µl do anticorpo de detecção (anti camundongo adiponectina, TNF α , IL6 - R&D Systems) previamente diluídos em reagente de diluição (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) em cada poço. A placa ficou incubada em temperatura ambiente por 1h. Os poços foram lavados novamente como descrito acima. Posteriormente adicionou-se 100µl de streptoavidina-HRP por poço. A placa ficou incubada no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima. Posteriormente 100µl da solução de substratos (reagente de cor A-H₂O₂ e reagente de cor B-OPD 1:1) foi adicionada por poço seguido da incubação de 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50µl de H₂SO₄(2N) por poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm. O resultado foi multiplicado pela quantidade de tecido adiposo (em gramas), para ser expresso como valor absoluto no tecido adiposo

4.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. O teste de D'Agostino e Pearson foi utilizado para verificar a distribuição normal das amostras. Foi utilizado o teste de Grubbs para detecção de *outliers* no caso de distribuição normal. Para detectar diferenças entre os quatro grupos foi feita ANOVA *One-way*, seguida do pós teste de Newman-Keuls. Como o peso inicial foi diferente entre as linhagens, foi usado o teste t de *Student*, para comparar dados relativos ao peso, dos subgrupos dentro da mesma linhagem. Um nível de significância de 5% foi estabelecido. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

5- RESULTADOS

5.1- INGESTÃO ALIMENTAR, EVOLUÇÃO PONDERAL, GANHO DE PESO ACUMULADO, E ADIPOSIDADE

O peso inicial foi similar entre animais de uma mesma linhagem. Embora a quantidade de dieta ingerida não tenha sido diferente entre as linhagens, a ingestão calórica diária foi maior nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica (HIPER). Como esperado, o peso do tecido adiposo foi maior no grupo HIPER das duas linhagens (Tabela 2).

Tabela 2: Peso Corporal Inicial, Ingestão Alimentar e Calórica por animal/dia e Peso do Tecido Adiposo Visceral.

PARÂMETRO	C57BL/6		ApoE ^{-/-}	
	CT	HIPER	CT	HIPER
Peso Inicial (g)	20.77 ± 0.36 ^a	20,78 ± 0.38 ^a	16.88 ± 0.92 ^b	16.82 ± 0.89 ^b
Ingestão Alimentar (g)	4.13 ± 0.07 ^a	3.00 ± 0.06 ^a	3.88 ± 0.16 ^a	3.07 ± 0.10 ^a
Ingestão Calórica (kcal)	11.58 ± 0.20 ^a	15.90 ± 0.35 ^b	10.89 ± 0.46 ^a	16.94 ± 0.55 ^b
Tecido Adiposo (g)	0.39 ± 0.03 ^a	1.21 ± 0.16 ^b	0.48 ± 0.02 ^a	1.18 ± 0.14 ^b

Os valores representam média ± erro padrão; n=18 por grupo; letras diferentes significam diferença estatística; p < 0,05. Teste t de *Student*

Em relação à evolução ponderal, os animais C57BL/6 HIPER já apresentaram peso maior em relação aos CT a partir da sexta semana experimental (Figura 5A). Entre os animais ApoE^{-/-}, a diferença entre os grupos HIPER e CT surgiu mais tardiamente, na última semana do experimento (Figura 5B).

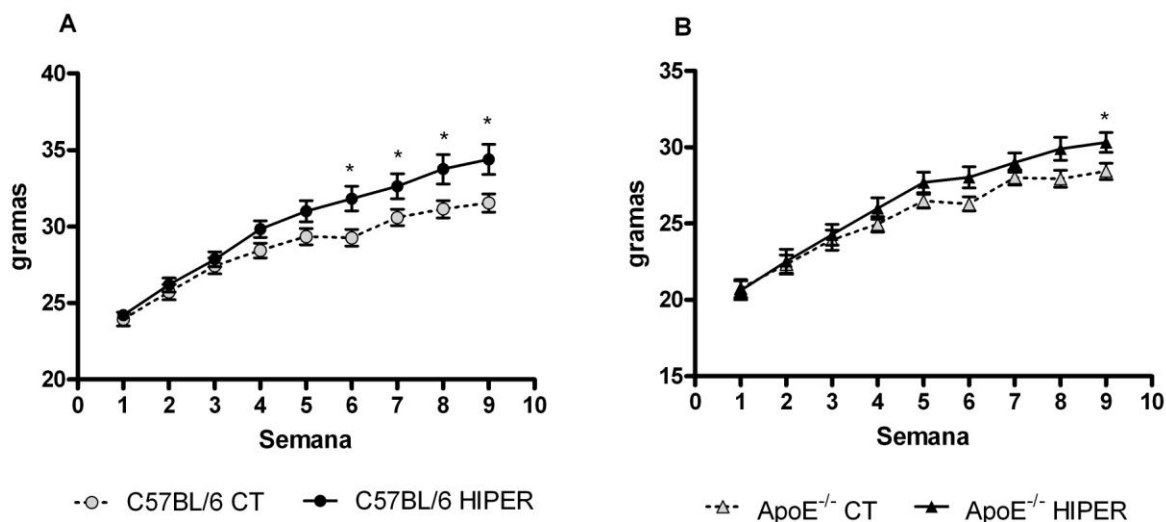


Figura 5- Evolução ponderal ao longo das nove semanas de experimento. Camundongos C57BL6 (A) e ApoE^{-/-} (B). Os pontos nos gráficos representam média ± erro padrão, n = 18 por grupo; * p<0,05. Teste t de *Student*

Ao final de nove semanas de experimento, o ganho peso acumulado nos animais C57BL/6 (Figura 6A), e nos animais ApoE^{-/-} (Figura 6B) alimentados com dieta hiperlipídica foi maior em relação aos seus respectivos controles.

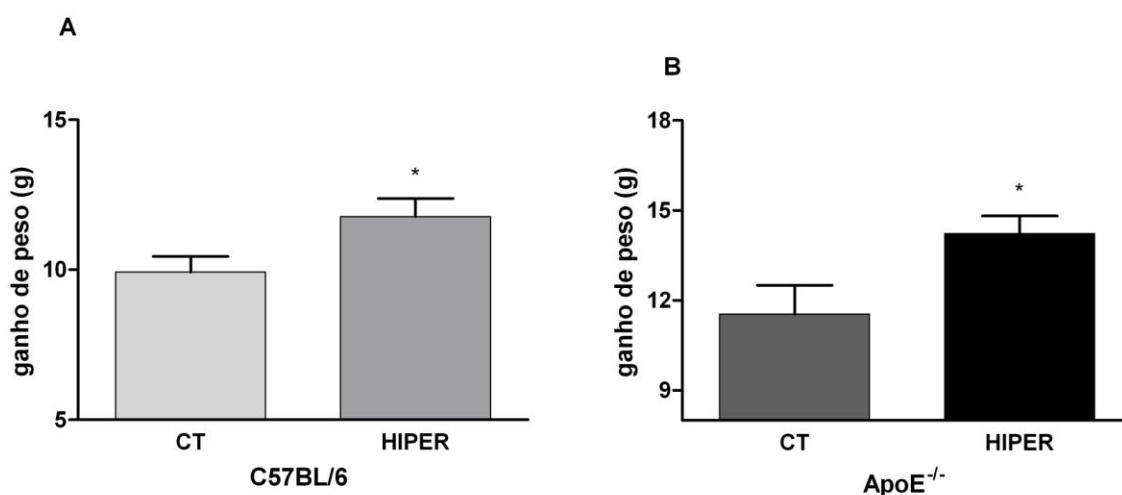


Figura 6: Ganho de peso acumulado ao final de nove semanas. Camundongos C57BL6 (A) e ApoE^{-/-} (B). As barras representam média ± erro padrão; n = 18 por grupo; * p<0,05. Teste t de *Student*

A adiposidade foi maior nos animais HIPER em relação aos CT em ambas as linhagens (Figura 7).

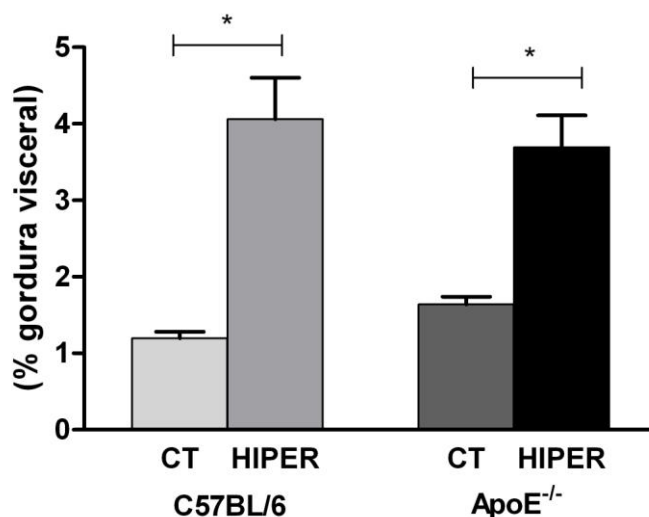


Figura 7- Adiposidade final em percentual de gordura visceral. As barras representam média \pm erro padrão; n = 18 por grupo; * p < 0,05; ANOVA *one-way*, pós-teste Newman-Keuls.

5.2- GLICEMIA, TRIGLICERÍDEOS, COLESTEROL TOTAL E HDL SÉRICOS, FRAÇÃO ATEROGÊNICA E ÍNDICE ATEROGÊNICO

Foi avaliada a presença de resistência à insulina de forma indireta, pela glicemia de jejum (Figura 8A) e pelo teste de tolerância oral à glicose (Figura 8B). Não foi observada resistência à insulina em nenhum grupo. Os resultados foram similares em ambos os grupos, independente da dieta ou linhagem estudada (Figura 8A e B).

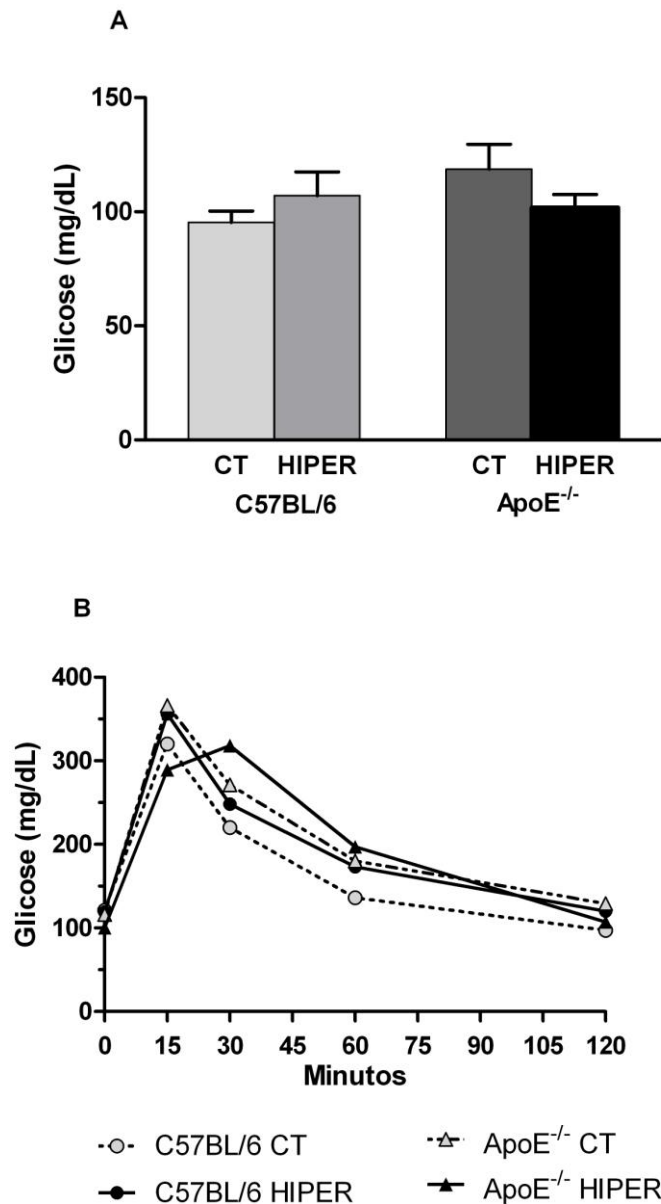


Figura 8- Glicemia de jejum (A) e Teste de Tolerância Oral à Glicose (B). As barras representam média \pm erro padrão; (A) n=10-12 por grupo; (B) n=6 por grupo; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls.

Nos animais C57BL/6, a dieta hiperlipídica empregada neste estudo não foi suficiente para alterar os níveis séricos tanto de triglicerídeos como do colesterol total e suas frações. Quando animais ApoE^{-/-} foram comparados aos animais C57BL/6, foi confirmado o esperado aumento dos triglicerídeos e colesterol total com a concomitante redução do HDLc, aumentando sua susceptibilidade à aterosclerose, como sugerido pelo alto índice aterogênico (Tabela 3). Quando os dois grupos ApoE^{-/-} foram comparados, a dieta hiperlipídica foi responsável por um perfil ainda mais aterogênico, caracterizado por níveis ainda elevados de colesterol total, resultando em

um aumento de quase duas vezes na fração aterogênica no HIPER em relação ao CT (Tabela 3). Porém, houve uma redução nos triglicerídeos circulantes que, nos animais do grupo ApoE^{-/-} HIPER (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações Séricas de Triglicerídeos, Colesterol Total, HDLc, Fração Aterogênica e Índice Aterogênico de animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} alimentados com dieta comercial (CT) hiperlipídica (HIPER) por 9 semanas.

Parâmetros séricos (mg/dL)	C57BL/6		ApoE ^{-/-}	
	CT	HIPER	CT	HIPER
Triglicerídeos	39 ± 0.8 ^a	43 ± 2.7 ^a	93 ± 7.4 ^b	63 ± 3.5 ^c
Colesterol Total	80 ± 1.6 ^a	76 ± 2.0 ^a	168 ± 2.3 ^b	274 ± 6.7 ^c
HDL colesterol	64 ± 3.9 ^a	57 ± 1.6 ^a	32 ± 2.4 ^b	30 ± 1.6 ^{b, c}
Fração Aterogênica	16 ± 4.0 ^a	21 ± 1.5 ^a	134 ± 3.3 ^b	240 ± 4.6 ^c
Índice aterogênico	0,25 ± 0.1 ^a	0,37 ± 0.0 ^a	4,1 ± 0.3 ^b	8,0 ± 0.3 ^c

Os valores representam média ± erro padrão; n=10-12 por grupo; letras diferentes significam diferença estatística; p< 0,05. ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls

5.3- AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A fim de se avaliar o estresse oxidativo, foram feitas dosagens de dois de seus importantes marcadores no fígado, músculo e tecido adiposo. Foram quantificadas as concentrações de malondialdeído (MDA), uma das principais substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e também de hidroperóxidos, importante produto da peroxidação lipídica.

5.3.1- Fígado

Foram observados resultados semelhantes em ambos os testes de avaliação de estresse oxidativo. Este foi significativamente maior nos camundongos ApoE^{-/-} em comparação aos C57BL/6. A dieta, por sua vez, foi capaz de aumentar, em ambas as linhagens, a concentração de MDA (Figura 9A) e concentração de hidroperóxidos no fígado (Figura 9B).

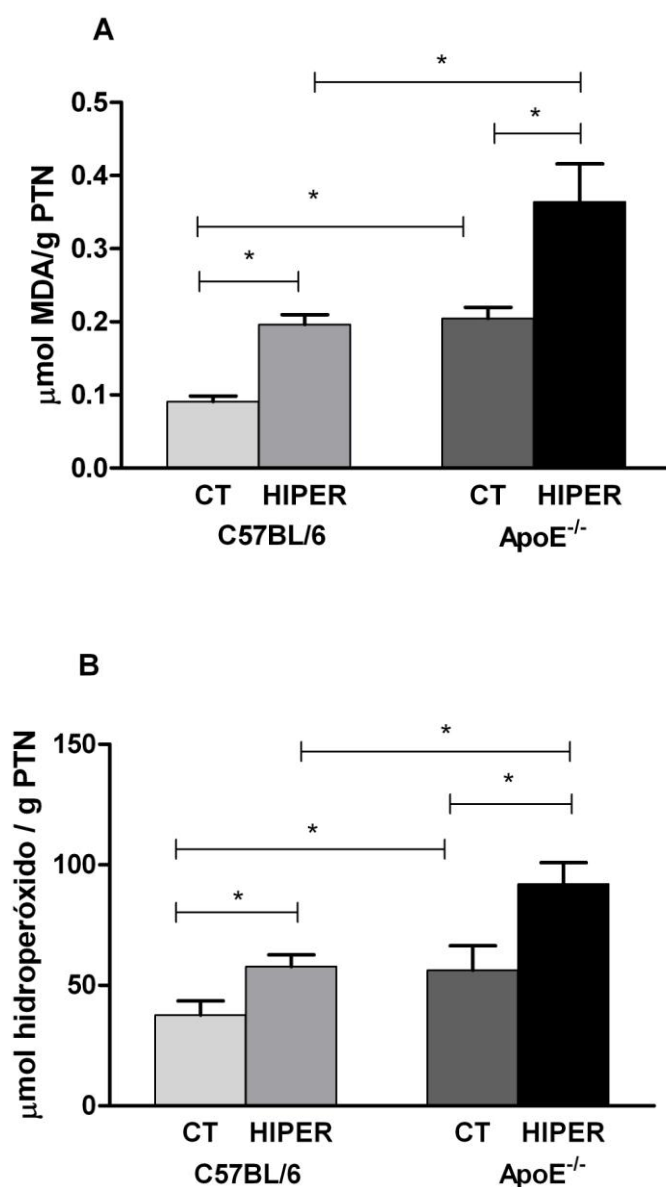


Figura 9- Estresse oxidativo hepático. Avaliado através da dosagem de TBARS (A) e concentração de hidroperóxidos (B). As barras representam média \pm erro padrão; n=10-12 por grupo; *p< 0,05; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls.

5.3.2-Músculo

Como visto no fígado, a peroxidação lipídica, avaliada pela concentração de MDA (Figura 10A) e concentração de hidroperóxidos (Figura 10B) no músculo também foi maior nos camundongos ApoE^{-/-} comparados aos C57BL/6. Foi observado que a dieta hiperlipídica, por si só, não alterou este perfil em ambas as linhagens.

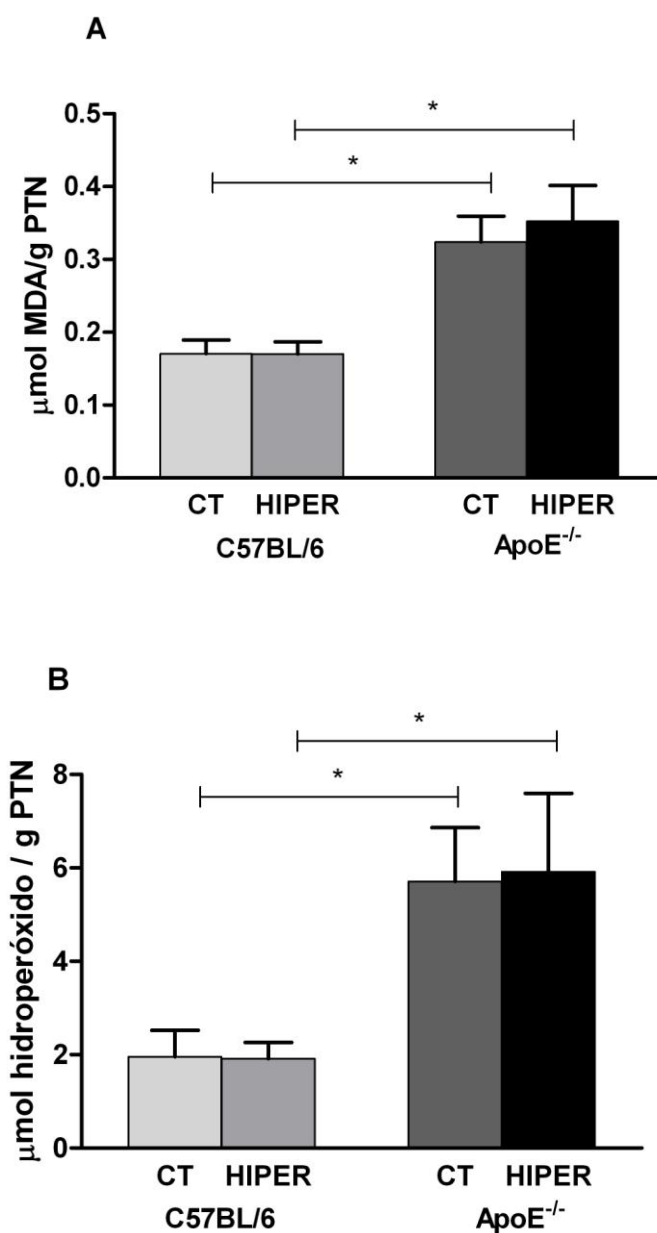


Figura 10- Estresse oxidativo muscular. Avaliado através da dosagem de TBARS (A) e concentração de hidroperóxidos (B). As barras representam média \pm erro padrão; n=10-12 por grupo; *p < 0,05; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls.

5.3.3-Tecido Adiposo

O estado basal pró-oxidativo do animal ApoE^{-/-} foi demonstrado no fígado e no músculo, observado pelo aumento na concentração de MDA e hidroperóxidos em relação ao C57BL/6, independente da dieta. No tecido adiposo não foi encontrada diferença entre os quatro grupos para a dosagem de MDA (Figura 11A). Entretanto, na dosagem de hidroperóxidos, pode-se notar que o grupo ApoE^{-/-} HIPER apresentou maior concentração de hidroperóxidos quando comparado a todos os demais (Figura 11B)

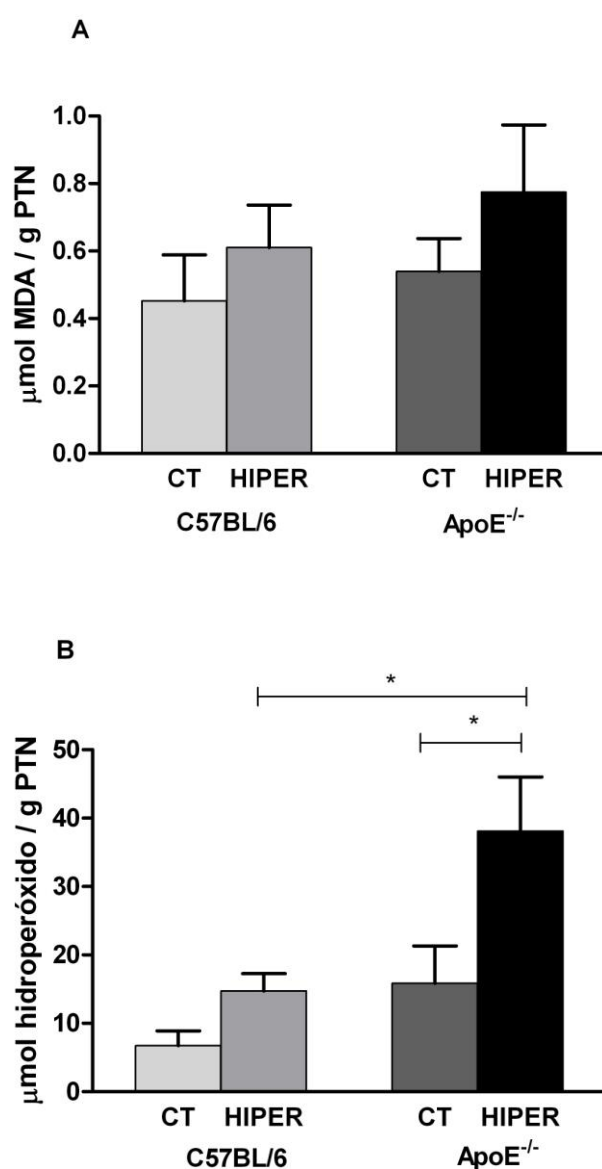


Figura 11- Estresse oxidativo no tecido adiposo. Avaliado através da dosagem de TBARS (A) e concentração de hidroperóxidos (B). As barras representam média \pm erro padrão; n=10-12 por grupo; *p< 0,05; ANOVA *one-way*, pós-teste Newman-Keuls.

5.4- ANÁLISES DO TECIDO ADIPOSO

Foi avaliada também a influência das dietas e da linhagem sobre a área adipócito visceral. Em concordância com os resultados de adiposidade, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram área de adipócito maior que os respectivos CT. Adicionalmente, camundongos C57BL/6 HIPER apresentaram área de adipócitos 20% maior do que a observada em camundongos ApoE^{-/-} HIPER (Figura 12A).

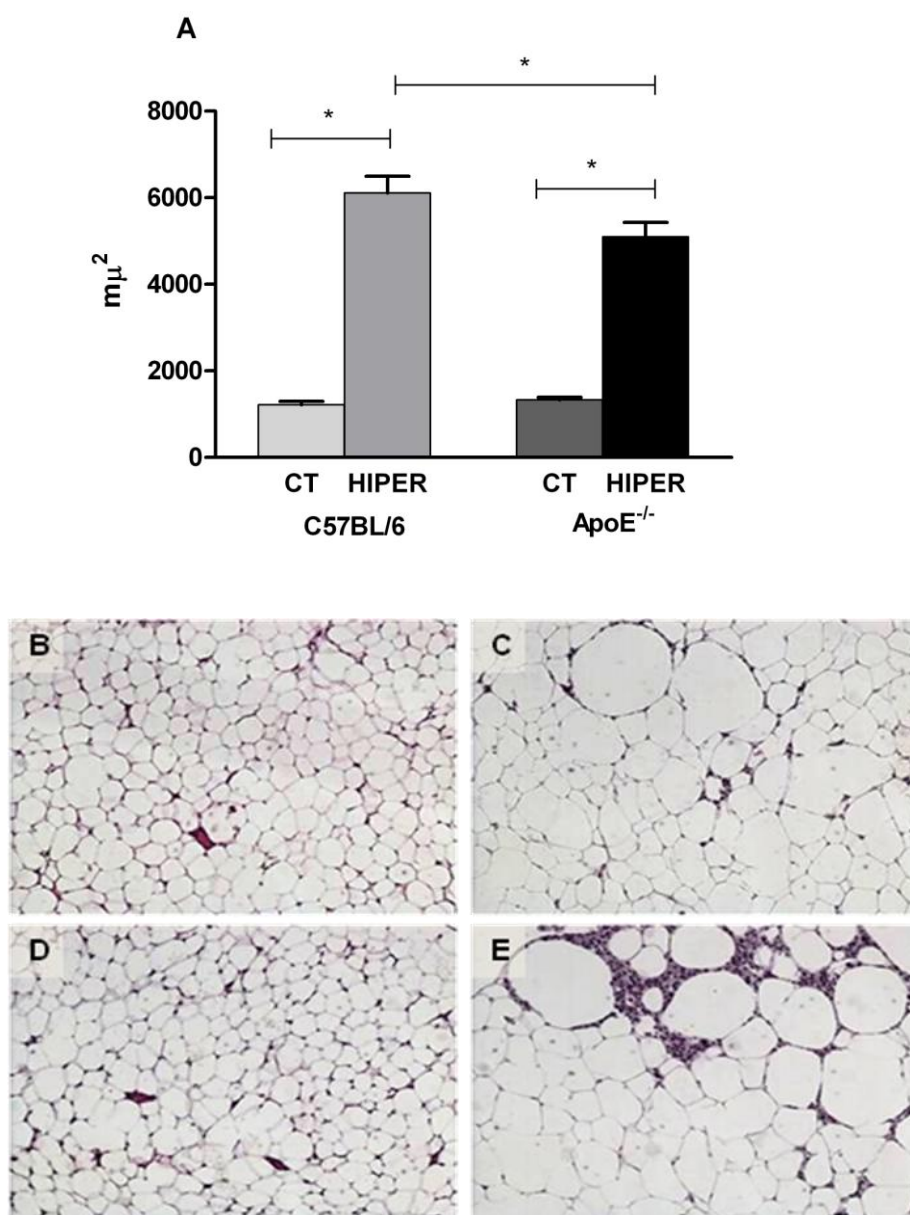


Figura 12- Área do Adipócito (A) do tecido adiposo epididimal (visceral) corados com hematoxilina/eosina. Camundongos C57BL/6 CT (B) e HIPER (C) e ApoE^{-/-} CT (D) e HIPER (E) ApoE^{-/-}. As barras representam média \pm erro padrão; n = 6 por grupo; * p < 0,05; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls. As fotos foram analisadas com aumento de 100X.

A infiltração de macrófagos no tecido adiposo foi avaliada pela atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Foi encontrado aumento no ApoE^{-/-} HIPER em relação ao CT, demonstrando a influência da adiposidade na ativação de macrófagos nessa linhagem (Figura 13A). Os animais ApoE^{-/-} HIPER apresentaram maior atividade de NAG em relação ao grupo C57BL/6 HIPER, reforçando mais uma vez, a influência da linhagem nesses resultados (Figura 13A). A fim de confirmar os resultados da atividade de NAG, foi analisada a presença de estruturas semelhantes a coroas (CLS), formadas por macrófagos em torno de adipócitos. Foi observado que a presença de CLS foi mais frequente em ApoE^{-/-} recebendo dieta hiperlipídica comparados com camundongos C57BL/6 recebendo a mesma dieta (Figura 13B).

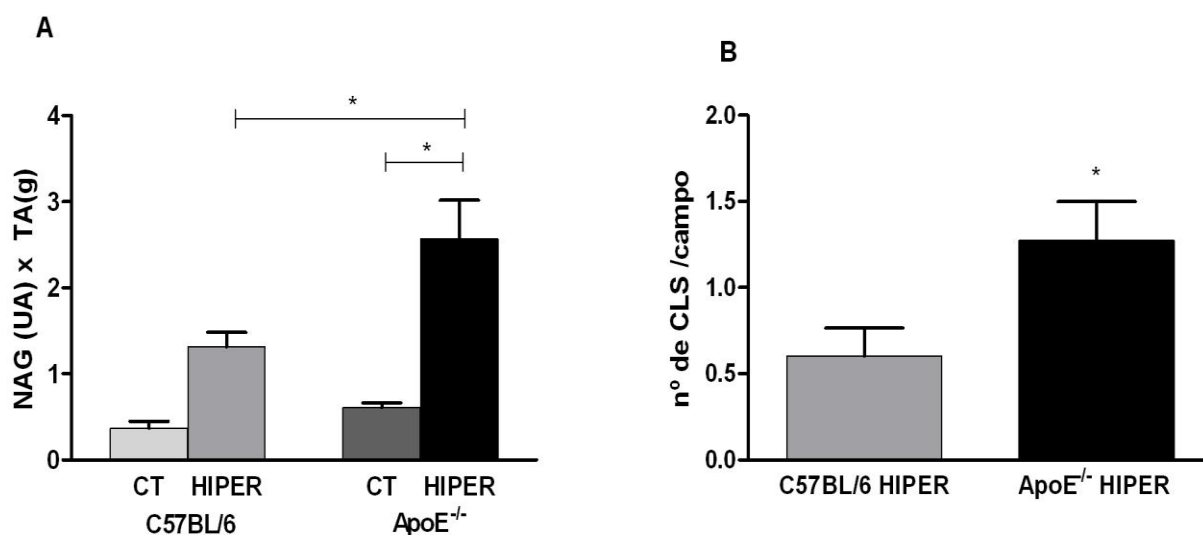


Figura 13- Avaliação indireta da infiltração de macrófagos ativados no tecido adiposo epididimal pela atividade de NAG (A) ou pela frequência de CLS (B). A atividade de NAG no tecido adiposo epididimal foi calculada pelo seu valor em unidades arbitrárias (UA) x peso total deste tecido. A frequência CLS foi determinada pela média de sua visualização em 10 campos, para cada animal. As barras representam média \pm erro padrão; (A) n=9 por grupo; (B) n=5 por grupo; *p< 0,05; ANOVA *one-way* pós-teste Newman-Keuls (A); teste t de *Student* (B).

O perfil de adipocinas secretadas possibilita a caracterização do estado inflamatório do tecido adiposo. Quando considerada por grama de tecido adiposo, os dados encontrados revelam a concentração de adiponectina menor nos grupos HIPER em comparação aos seus controles (Figura 14 A). Porém, como ocorreu também

expansão do tecido adiposo em animais com dietas hiperlipídicas, a secreção total de adiponectina pelo tecido adiposo visceral de animais HIPER ainda é maior comparada aos respectivos controles (figura 14B). Quando os dois grupos alimentados com a mesma dieta são comparados, não há diferenças entre o teor de adiponectina quando os animais estão em dieta controle. Por outro lado, quando os grupos HIPER são comparados, animais ApoE^{-/-} HIPER apresentaram maior produção de adiponectina em relação ao C57BL/6 HIPER (figura 14B).

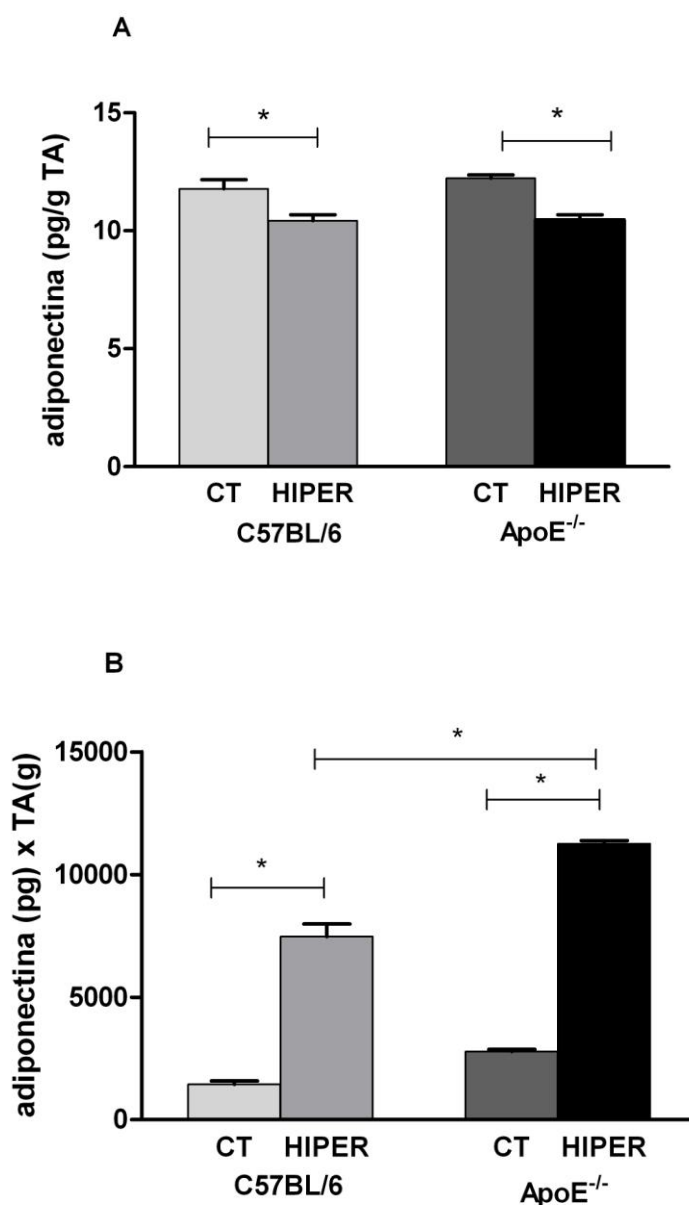


Figura 14- Secreção de adiponectina avaliada pelo método ELISA. Valor de adiponectina expresso por grama de tecido adiposo (A); Valor absoluto expresso em pg x tecido adiposo epididimal em gramas (B). As barras representam média \pm erro padrão; n=5 por grupo; * p< 0,05; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls.

Em relação à produção de $\text{TNF}\alpha$ não foi encontrada diferença entre ambos os grupos C57BL/6 (figura 15), entretanto o grupo $\text{ApoE}^{-/-}$ HIPER apresentou maior produção de $\text{TNF}\alpha$ comparado ao controle. Estes níveis foram estatisticamente maiores que os vistos em C57BL/6 HIPER (Figura 15).

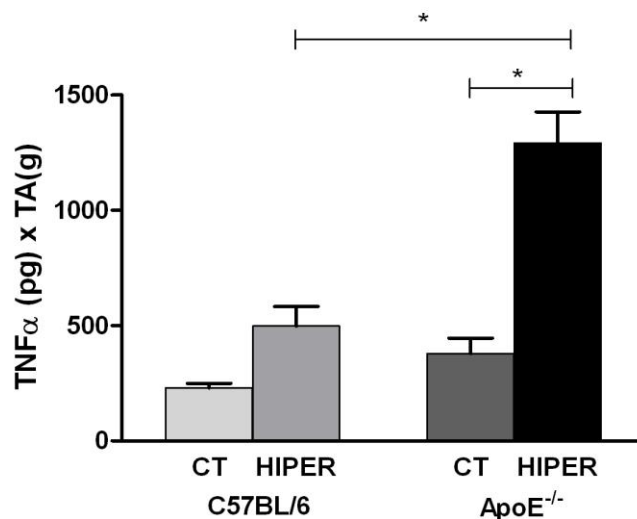


Figura 15- Secreção de $\text{TNF}\alpha$ avaliada pelo método ELISA. Valor absoluto expresso em pg x tecido adiposo epididimal em gramas. As barras representam média \pm erro padrão; n=5 por grupo; * $p < 0,05$; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls.

A secreção de IL6 foi maior em animais HIPER de ambas as linhagens comparadas aos seus controles. Novamente, o grupo $\text{ApoE}^{-/-}$ HIPER apresentou maior produção de IL6 em relação ao C57BL/6 HIPER (figura 16).

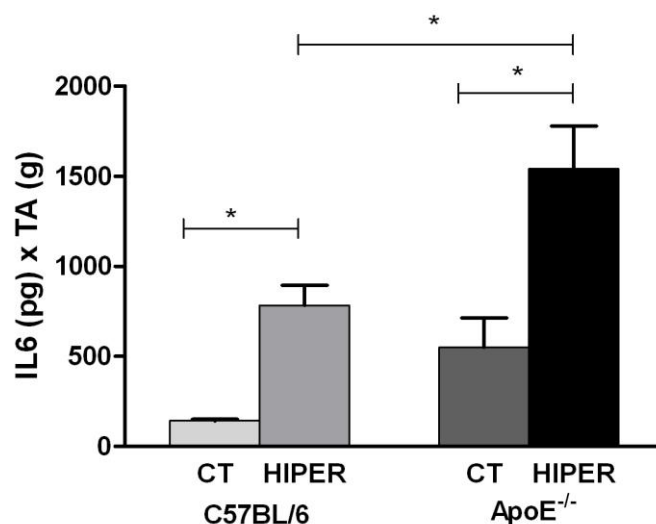


Figura 16- Secreção de IL6 avaliada pelo método ELISA. Valor absoluto expresso em pg x tecido adiposo epididimal em gramas. As barras representam média \pm erro padrão; n=5 por grupo; * $p < 0,05$; ANOVA *one-way*; pós-teste Newman-Keuls.

6-DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados camundongos deficientes em apoE, que desenvolvem hipercolesterolemia e estresse oxidativo, para testar o efeito da dieta hiperlipídica na inflamação induzida pela obesidade. Além de seu papel no transporte de lipídios, a apoE apresenta propriedades antioxidantes no plasma e no cérebro, sendo altamente produzida pelos adipócitos, principalmente em resposta ao estresse oxidativo (TARNUS et al., 2009). Para ser o controle deste modelo de alto estresse oxidativo basal, caracterizado pelo camundongo ApoE^{-/-}, foram utilizados camundongos C57BL/6, que possuem apoE e são resistentes à hipercolesterolemia.

O peso corporal inicial foi maior nos camundongos C57BL/6, em comparação ao camundongo ApoE^{-/-}. A ingestão calórica foi semelhante entre as duas linhagens, refletindo no peso final e adiposidade também semelhante. Entretanto, o C57BL/6 HIPER demonstrou peso maior em relação ao seu controle já na sexta semana de experimento, enquanto nos camundongos ApoE^{-/-} HIPER o aumento de peso em relação ao seu controle só ficou evidente na nona semana, demonstrando a resistência desse animal em ganhar peso. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente, quando ambas as linhagens foram alimentadas com dieta diabetogênica por várias semanas (SCHREYER et al., 2002). Quando se avaliou a área do adipócito, os camundongos controles apresentaram tamanho semelhante em ambas as linhagens, e

a área dos adipócitos foi 20% maior no C57BL/6 HIPER, em comparação ao ApoE^{-/-} HIPER, evidenciando os efeitos mais proeminentes do consumo de gordura elevada na linhagem C57BL/6. GAO et al. (2007) também demonstraram adipócitos menores em animais ApoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica em comparação a animais ApoE^{+/+}. Como está bem descrito que a adiposidade e o tamanho do adipócito são parâmetros que se relacionam com comorbidades da obesidade, então, pode-se supor que a inflamação relacionada à obesidade será mais intensa em camundongos C57BL/6 em virtude da maior área de adipócito em relação ao animal ApoE^{-/-}.

Como a expansão da gordura corporal está relacionada com a resistência à insulina, a glicemia foi analisada nos quatro grupos experimentais. No entanto, não foi encontrada qualquer diferença entre os grupos. O mesmo resultado foi descrito anteriormente em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica durante seis semanas (SCHAALAN et al., 2009). Em outro estudo comparando camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} alimentados por oito semanas com dieta diabetogênica, também foi observada a resistência do camundongo ApoE^{-/-} no desenvolvimento de hiperglicemia em resposta à dieta (SCHREYER et al., 2002). Nesse mesmo estudo, camundongos ApoE^{-/-} mostraram um declínio nos níveis séricos de triglicerídeos em resposta à dieta, fato observado também no presente estudo e em outros (SCHREYER et al., 2002, MESENKAMP et al., 1999). A redução de triglicerídeos séricos pode resultar de várias causas. SCHREYER et al. (2002) demonstraram que a deficiência de apoE reduziu a secreção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), a principal carreadora de triacilgliceróis, em 60%. A causa pode ser ter sido devido ao fato de que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica aumentaram a oxidação de ácidos graxos em relação aos controles alimentados com dieta padrão. Além disso, no fígado dos camundongos obesos, os níveis de proteína desacopladora 2 (UCP2) estão aumentados, resultando na depleção de ATP e liberação de energia na forma de calor (SCHREYER et al., 2002).

Como esperado, o colesterol total foi maior nos animais ApoE^{-/-} e o HDLc foi menor em relação ao C57BL/6, refletindo dessa forma, no aumento da fração aterogênica e no índice aterogênico no animal ApoE^{-/-} em relação ao C57BL/6. A dieta hiperlipídica não alterou o perfil lipídico no animal C57BL/6 em concordância com outros estudos (MESENKAMP et al., 1999; SCHREYER et al., 2002). Assim, confirma a resistência desse animal em desenvolver dislipidemia secundária à dieta, ao contrário do animal ApoE^{-/-} que, sob dieta hiperlipídica, exacerbou ainda mais seu estado dislipidêmico já previamente existente em função da ausência da ApoE.

Neste estudo o estado basal pró-oxidativo no camundongo ApoE^{-/-} foi demonstrado pela produção de MDA e hidroperóxidos no fígado e nos músculos. Porém, no tecido adiposo não foram observadas diferenças entre os grupos controles de ambas as linhagens. Entretanto, associando a dieta às diferentes linhagens, animais ApoE^{-/-} aumentaram a concentração de hidroperóxidos de forma significativamente maior em relação aos animais C57BL/6 alimentados com a mesma dieta, deixando claro a susceptibilidade de animais deficientes em apoE para fatores pró-oxidantes como a dieta. O aumento do estresse oxidativo não pode ser comprovado pela técnica de TBARS no tecido adiposo, mesmo em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Estes dados de estresse oxidativo nos diferentes tecidos são consistentes com estudos anteriores que mostram que a produção de ERO é diferente em diferentes tecidos, devido às diferenças na atividade metabólica, consumo de oxigênio e níveis de antioxidantes (FURUKAWA et al., 2004; LIMÓN-PACHECO & GOSENBATT, 2009). Outro fator a considerar são os marcadores utilizados para avaliação de estresse oxidativo, que podem ter especificidade diferente dependendo do tecido avaliado (VESKOUKIS et al., 2009). Deve-se considerar que a produção de MDA é menos específica do que a produção de hidroperóxidos como resultado da peroxidação lipídica. MDA pode ser produto da degradação de outras moléculas existentes em tecidos biológicos, como resultado da formação de endoperóxidos e não necessariamente da peroxidação lipídica (CHERUBINI et al., 2005). Entretanto, a concentração de hidroperóxidos é resultado específico de peroxidação lipídica causada por ação de radicais livres (HERMES-LIMA et al., 1995). Portanto, o fato de ter sido observada diferença no estresse oxidativo do tecido adiposo somente pela dosagem de hidroperóxidos, talvez tenha sido influenciada pela composição lipídica do tecido. A apoE é altamente expressa no tecido adiposo e possui propriedades antioxidantes. A presença de apoE no tecido adiposo diminui a oxidação intracelular em adipócitos (TARNUS et al., 2009). Provavelmente, a presença de apoE no tecido adiposo desempenhou papel antioxidante capaz de minimizar o efeito oxidante da dieta hiperlipídica no C57BL/6 HIPER, impedindo dessa forma, uma elevação significativa no estresse oxidativo em relação ao controle observado nesse estudo. Esse fato fica mais evidente quando foi observado o efeito maior da dieta no animal ApoE^{-/-} HIPER em relação ao seu controle e em relação ao C57BL/6, demonstrado pela concentração de hidroperóxidos.

A infiltração de macrófagos é um evento chave na resposta inflamatória do tecido adiposo (WAISBERG et al., 2003; KANDA et al., 2006). Os resultados

encontrados neste estudo estão em conformidade com a idéia de que a ingestão elevada de gordura promove a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, como demonstrado pela maior atividade da NAG principalmente no ApoE^{-/-} HIPER. Acredita-se que a extensão do acúmulo de macrófagos no tecido adiposo correlaciona com o grau de adiposidade (SUBRAMANIAN et al., 2009). Com os resultados observados foi possível demonstrar que a atividade de NAG está aumentada em animais com maior adiposidade em ambas as linhagens, porém com resultado significativo somente no ApoE^{-/-} HIPER. Curiosamente, apesar de adipócitos maiores serem vistos no camundongo C57BL/6, a infiltração macrófagos ativados no tecido adiposo foi significativamente maior nos ApoE^{-/-} HIPER, em comparação aos C57BL/6 HIPER. Além disso, quando alimentados com dieta hiperlipídica, o animal ApoE^{-/-} teve a infiltração de macrófagos triplicada neste tecido, bem como aumento de macrófagos formando estruturas "semelhantes a coroas" (CLS), destacando o efeito deletério da dieta nesse animal. O recrutamento de macrófagos em camundongos ApoE^{-/-} pode ser também devido ao seu perfil lipídico característico. Sabe-se que a hipercolesterolemia e estresse oxidativo são fatores para ativação de monócitos, potencializando ainda mais a infiltração de macrófagos e inflamação, já presentes no tecido adiposo (LOHMAN et al., 2009). Consistente com os dados encontrados, um estudo comparando camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentaram aumento da expressão de MCP-1, TNF α e infiltração de macrófagos no tecido adiposo de ApoE^{-/-} comparados com os C57BL/6 (LOHMAN et al., 2009).

Quando avaliados na quantidade total de tecido adiposo visceral, além do infiltrado de macrófagos, foi observado neste estudo, aumento das adipocinas pró-inflamatórias TNF α e IL6, e curiosamente, da adiponectina, descrita como adipocina antidiabetes e antiinflamatória. Porém, quando avaliada a produção de adiponectina por grama de tecido adiposo, esta estava reduzida, como sugerido pela literatura. A adiponectina é sintetizada em quantidade reduzida no tecido adiposo de obesos e está inversamente proporcional à resistência à insulina (HERMSDORFF *et al*, 2008). Entretanto, a adiponectina expressa em maior quantidade no tecido adiposo subcutâneo em relação ao visceral (KERSHAW and FLIER, 2004; LENZ and DIAMOND Jr., 2008). Assim, pode-se sugerir que os valores maiores de adiponectina encontrados em toda extensão do tecido adiposo nos animais com adiposidade aumentada, talvez seja porque neste estudo as análises foram feitas somente no tecido adiposo visceral, isto é, o tecido adiposo subcutâneo não foi avaliado. Talvez a

produção de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo poderia apresentar um padrão de secreção diferente, e contribuir com um balanço final de produção de adiponectina diverso do encontrado. Tem sido demonstrado que a adiponectina possui correlação inversa significativa com a resistência à insulina, independente da obesidade (AL-DAGHRI, et al., 2009). Como observado, os animais com dieta hiperlipídica não apresentaram glicemia alterada demonstrada pela glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose. Provavelmente, a secreção elevada de adiponectina nos animais com maior adiposidade visceral neste estudo, possa ter relação com a glicemia normal desses animais. Camundongos deficientes em adiponectina desenvolveram intolerância à glicose, sustentando a idéia de que a adiponectina protege contra a resistência à insulina induzida por dieta (GUERRE-MILLO, 2008).

O tecido adiposo de obesos é caracterizado por elevado estresse oxidativo, inflamação crônica e infiltrado de macrófagos. ERO e citocinas proinflamatórias são potentes inibidores da expressão gênica de adiponectina em adipócitos de cultura (GUERRE-MILLO, 2008). No presente estudo, foi observado estresse oxidativo, infiltrado de macrófagos e aumento de TNF α no tecido adiposo no grupo C57BL/6 HIPER, porém, não resultou em diferença estatística em relação ao seu controle. Talvez, o aumento mais modesto desses fatores possa ter sido insuficiente para inibir a produção e acarretar a redução da adiponectina nesse grupo. Porém, quando observado o grupo ApoE^{-/-} HIPER, a dosagem de hidroperóxidos no tecido adiposo e todos os marcadores proinflamatórios estão aumentados em relação ao seu controle e também em relação ao C57BL/6 HIPER. Neste caso, talvez outros fatores, possivelmente relativos à deficiência de ApoE, possa ter influenciado na produção de adiponectina de forma a mantê-la aumentada. Tem sido descrito que a deficiência de apoE produz resistência a algumas alterações fenotípicas relacionadas à obesidade incluindo hiperinsulinemia e hiperglicemia (GAO et al., 2007). É relevante considerar também, que os mecanismos que aumentam a expressão gênica de adiponectina ainda são apenas parcialmente elucidados (FURUKAWA et al., 2004; GUERRE-MILLO, 2008).

O TNF α e IL6 são citocinas proinflamatórias sintetizadas no tecido adiposo pelo adipócito e por células do estroma vascular, e está relacionada à expansão do tecido, hipertrofia do adipócito e aumento do infiltrado de macrófagos (HEILBRONN et al., 2008). Um aumento na gordura corporal está relacionado a uma rede de resposta inflamatória no tecido adiposo que resulta da secreção de fatores inflamatórios no tecido adiposo, secreção pelo tecido adiposo de fatores que estimulam outros tecidos

na produção de fatores inflamatórios e queda na produção de fatores antiinflamatórios (BAYS et al., 2009). Foi demonstrada no presente estudo secreção aumentada de TNF α e IL6 nos animais ApoE^{-/-} HIPER em relação ao seu controle e em relação ao C57BL/6. Esse resultado está em concordância com os resultados de NAG e com estudos que descrevem a produção dessas citocinas principalmente por macrófagos ativado infiltrado no tecido adiposo (LUMENG et al., 2007; SUBRAMANIAN et al., 2009). Entretanto, o animal C57BL/6 HIPER apresentou IL6 aumentada em relação o seu controle, resultado não observado para o TNF α e para o NAG. Provavelmente, nesse animal, o adipócito possa ter tido contribuição maior que o macrófago na secreção de IL6 colaborando para essa diferença. Macrófagos são a principal fonte de TNF α no tecido adiposo e adipócitos contribuem com aproximadamente um terço da concentração de IL6 circulante de obesos (TILG & MOSCHEN, 2006). O aumento do TNF α e IL6 está relacionado à resistência à insulina em obesos (BOURLIER & BOULOUMIE, 2009). Entretanto, nos animais HIPER não foi observada resistência à insulina, demonstrada pela glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose nesses animais. Possivelmente a adiponectina aumentada pode ter colaborado nessa interação melhorando a sensibilidade à insulina nesses animais.

O acúmulo de ERO está relacionado também, ao infiltrado de macrófagos no tecido adiposo por ser um fator para ativação de monócitos circulantes (DEGASPERI et al., 2009). Foi feito um estudo transversal em Framingham com 1250 participantes a fim de avaliar a associação entre obesidade visceral, estresse oxidativo e inflamação. Foi encontrada associação entre obesidade visceral com isoprostano urinário (marcador de estresse oxidativo), MCP-1, IL6 e receptor de TNF α (POU et al., 2007). A produção aumentada de TNF α também estimula aumento dos níveis de ERO no tecido adiposo (ERIKSSON, 2007). Os resultados encontrados no presente estudo sustentam essa idéia, já que foi observada concentração de hidroperóxidos elevada no animal ApoE^{-/-} HIPER, que também tem NAG, TNF α e IL6 aumentados em relação aos outros grupos. Isso demonstra a importância da associação da obesidade com o estresse oxidativo na produção do perfil proinflamatório nesse animal, uma vez que o grupo ApoE^{-/-} HIPER apresentou obesidade e alto estresse oxidativo em todos os órgãos avaliados dentre eles o tecido adiposo. A força dessa associação fica mais evidente quando comparado o grupo C57BL/6 HIPER, que apresentou adiposidade aumentada, porém não apresentou aumento significativo na concentração de hidroperóxidos no tecido adiposo, com o ApoE^{-/-} HIPER que apresentou esses dois parâmetros associados. A presença de adiposidade aumentada de forma isolada, representada pelo C57BL/6 HIPER, não

foi suficiente para induzir infiltrado de macrófagos e produção de TNF α significativamente maior que seu controle. Já no ApoE^{-/-} HIPER, o aumento do estresse oxidativo associado à obesidade desencadeou uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento de todos os marcadores proinflamatórios avaliados neste estudo.

Vários estudos atribuem o aumento de estresse oxidativo em indivíduos obesos ao aumento de ácidos graxos livres e glicose sérica, e que estes fatores induzem inflamação no tecido adiposo de obesos por aumentar potencialmente o estresse oxidativo (SHOELSON et al., 2007; SCHÖNFELD & WOJTCZAK, 2008). No presente estudo não foi observada hiperglicemia ou hipertrigliceridemia, descartando, portanto, a interferência desses dois fatores no aumento do estresse oxidativo. Porém, é bem estabelecido também que a hipercolesterolemia está associada ao estresse oxidativo e ao aumento de NADPH oxidase importante fonte de ânion superóxido (O_2^-) (WASMMAN et al., 2004). Neste estudo foi observada hipercolesterolemia marcante no grupo ApoE^{-/-} HIPER, secundária à dieta em associação à deficiência da ApoE. LOHMANN et al. (2009) demonstraram que os níveis séricos de colesterol possuem correlação com infiltrado de macrófagos no tecido adiposo. Foi observado que o grupo ApoE^{-/-} HIPER possui infiltrado de macrófagos elevado em relação aos outros grupos em concordância com os níveis séricos de colesterol que também é maior em relação aos outros grupos. Entretanto, o grupo ApoE^{-/-} CT que também possui colesterol sérico aumentado não apresentou infiltrado de macrófagos aumentado. Sugere-se, portanto, que a hipercolesterolemia somente, não é suficientemente capaz de induzir aumento no infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, e é possível sugerir que fatores como obesidade e estresse oxidativo elevado juntos, interferem de forma determinante neste evento, demonstrado pelo animal ApoE^{-/-} HIPER. Sabe-se que macrófagos são fontes de ERO, TNF α e IL6 (LAGO et al., 2009; GUMMERSBACH et al., 2009). O TNF α tem importância significativa na troca de sinalização entre adipócitos e macrófagos infiltrados no tecido adiposo, mediando sua amplificação sinérgica de inflamação sistêmica e local (LAGO et al., 2009). Macrófagos ativados, juntamente com adipócitos e outras células presentes no tecido adiposo, podem perpetuar um ciclo vicioso de recrutamento de macrófagos e produção de citocinas proinflamatórias e ERO (TILG & MOSCHEN, 2006). Dessa forma o aumento do infiltrado de macrófagos possivelmente também tem participação no estresse oxidativo aumentado no tecido adiposo do animal ApoE^{-/-} HIPER. Está bem documentada a correlação direta entre tamanho do adipócito e marcadores proinflamatórios no tecido adiposo (BAYS et al., 2009). Foi observado que o adipócito do C57BL/6 HIPER é maior que do ApoE^{-/-} HIPER. Se fosse levado em

consideração esse resultado isolado, seria razoável supor que os parâmetros pró-inflamatórios avaliados, NAG, TNF α e IL6, estivessem aumentados no animal C57BL/6 HIPER em relação ao ApoE^{-/-} HIPER. Porém, esse resultado não foi observado. Mais uma vez é possível sugerir o aumento da inflamação no tecido adiposo em consequência da associação de obesidade e estresse oxidativo, bem representados no animal ApoE^{-/-} HIPER, que apesar de possuir adipócito menor, apresentou perfil pró-inflamatório mais acentuado que o C57BL/6 HIPER. Entretanto, a produção de adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, tem produção aumentada no ApoE^{-/-} HIPER que possui área de adipócito menor que o C57BL/6 HIPER, fator que talvez tenha tido influência na produção dessa adipocina, resultando na diferença entre estes dois grupos.

Ainda não são totalmente elucidados os mecanismos que unem obesidade, estresse oxidativo e inflamação. Algumas proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, dentre elas o NF κ B, um fator de transcrição nuclear é regulado também por citocinas pró-inflamatórias produzidas no tecido adiposo, e possui a habilidade de regular positivamente genes responsáveis por processos de inflamação e morte celular (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). Tem sido fortemente debatido que a produção desregulada de adipocinas no tecido adiposo de obesos está criticamente envolvida na patogênese da síndrome metabólica; e que adiposidade aumentada tem forte correlação com marcadores do estresse oxidativo (FURUKAWA et al., 2004). No presente estudo foi constatado aumento de adiposidade nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, entretanto, não foi observada a presença de síndrome metabólica. A dieta hiperlipídica foi capaz de induzir aumento no estresse oxidativo hepático e no tecido adiposo principalmente do ApoE^{-/-} HIPER. Foi possível caracterizar que o grupo ApoE^{-/-} HIPER possui associação de obesidade e estresse oxidativo, e que os marcadores inflamatórios estão aumentados somente nesse grupo, coerente com idéia de que associação de estresse oxidativo e obesidade é importante para a produção do perfil inflamatório no tecido adiposo de obesos.

Está bem aceito atualmente que na obesidade o tecido adiposo exibe um estado de inflamação crônica de baixo grau. E que macrófagos ativados no tecido adiposo secretam ERO, e a resposta celular às citocinas pró-inflamatórias também podem induzir mudanças *redox*, sugerindo que a inflamação pode ser uma fonte de estresse oxidativo aumentado no tecido adiposo (RUDICH et al., 2007). No presente estudo foi possível observar a associação de estresse oxidativo e obesidade na produção de marcadores pró-inflamatórios no tecido adiposo de animais ApoE^{-/-} alimentados com

dieta hiperlipídica. Entretanto, mais estudos são necessários para se avaliar as vias de produção desses marcadores e estabelecer a relação de causa ou consequência que o estresse oxidativo desempenha no desenvolvimento da inflamação observada no tecido adiposo desses animais.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível comprovar a eficiência da dieta hiperlipídica em induzir obesidade em animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} por meio dos dados de evolução ponderal, ganho de peso acumulado, adiposidade e área do adipócito. A dieta hiperlipídica não foi capaz de alterar o perfil lipídico de animais C57BL/6, entretanto, aumentou a dislipidemia pré-existente no animal ApoE^{-/-}. A glicemia não foi alterada pela dieta hiperlipídica em ambas as linhagens. O estado basal pró-oxidativo do animal ApoE^{-/-} foi demonstrado no fígado e músculo, e aumento do estresse oxidativo secundário à dieta foi demonstrado no fígado de ambas as linhagens e no tecido adiposo do animal ApoE^{-/-} grupo HIPER. O animal ApoE^{-/-} HIPER apresentou estresse oxidativo maior que o C57BL/6 HIPER nos três órgãos avaliados, evidenciando a associação de estresse oxidativo e obesidade apenas nesse grupo. A presença de macrófagos ativados no tecido adiposo foi significativamente maior no ApoE^{-/-} HIPER em relação ao seu controle e em relação ao C57BL/6 HIPER. Os animais com dieta hiperlipídica e adiposidade aumentadas apresentaram adiponectina e IL6 maior que seus controles em ambas as linhagens. O aumento do TNF α foi demonstrado somente no grupo ApoE^{-/-} HIPER em relação ao seu controle, e não foi encontrada diferença nos animais C57BL/6, assim como o infiltrado de macrófagos representado pela dosagem de NAG. O animal ApoE^{-/-} HIPER apresentou adiponectina, TNF α , IL6 e infiltrado de macrófagos ativados maior que o C57BL/6.

8- CONCLUSÃO

O estresse oxidativo e a obesidade juntamente estão implicados no aumento do perfil inflamatório no tecido adiposo de obesos. Foi possível observar no presente estudo que apenas os animais ApoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram adiposidade e estresse oxidativo aumentados no tecido adiposo, que por sua vez, apresentou secreção aumentada de marcadores proinflamatórios em relação aos outros grupos. Conclui-se então que a associação de estresse oxidativo e obesidade, representada pelo ApoE^{-/-} HIPER foi determinante para o desenvolvimento de inflamação no tecido adiposo de animais obesos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAGIRI, S.; NAITO, Y.; ICHIKAWA, H.; MIZUSHIMA, K.; TAKAGI, T.; HANDA, O.; KOKURA, S.; YOSHIKAWA, T. A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue precedes the development of fatty liver and insulin resistance in high-fat diet-fed male KK/Ta mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, v. 42, p.150-157, 2008.
- AL-DAGHRI, N.M.; AL-ATTAS, O.S.; SALLAM, R. Adipocytokine profiles as influenced by insulin resistance in obese subjects. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. v3, n.2, p.79-83, 2009.
- ALESSI, M.C.; POGGI, M.; JUHAN-VAGHE, I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insuline resistance. *Curr. Opin. Lipidol.* v18, p.240-245, 2007.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, v. 20, p.470- 475, 1974.
- ANDO K.; FUJITA, T. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* v. 47, n.3, p. 213-218, 2009.
- ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G.; MANOLAKOU, P. ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reproductive Toxicology*. v.28, n.2, p.167-171, 2009.
- ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, J.P. Adipokines: The missing link between insuline resistance and obesity. *Diabetes and Metabolism*. v. 34, p. 2-11, 2008.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*. v.162, p. 327-334, 1988.

- BANERJEE, D.; KUMAR, P.A.; KUMAR, B.; MADHUSOODANAN, U.K.; NAYAK, S.; JACOB, J. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science*, v. 83, n. 10, p. 1193-1194, 2002.
- BARB, D.; WILLIAMS, C.J.; NEUWIRTH, A.K.; MANTZOROS, C.S. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* v.86(supl.), p. 858S-866S, 2007.
- BAYS, H.E.; GONZÁLEZ-CAMPOY, J.M.; BRAY, G.A.; KITABCHI, A.E.; BERGMAN, D.A.; SCHORR, A.B.; RODBARD, H.W.; HENRY, R.R. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased adiposity. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* v.6, n.3, p.343-368, 2008.
- BONET, M.L.; RIBOT, J.; PALOU. Citocinas y control metabólico. *Revista Española de Obesidad.* v.7, n.1, p.22-47, 2009
- BOURLIER, V.; BOULOUMIE, A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insuline resistance. *Diabetes & Metabolism.* v.35, p.251-260, 2009.
- BRAY, G.A.; CLEARFIELD, M.B.; FINTEL, D.J.; NELINSON, D.S. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risks. *Clinical Cornerstone.* v.9, n.4, p. 30-42, 2009.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Mlcrosomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymol.* v. 52, p. 302-310, 1978
- BUETNER, R.; SCÖLMERICH, J.; BOLHEIMER, L.C. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* v.15, p.798-808, 2007.
- CANCELLO, R.; TORDJMAN, J.; POTTOU, C.; GUILHERM, G.; BOUILLOT, J.C.; HUGOL, D.; COUSSIEU, C.; BASDEVANT, A.; HEN, A.B.; BEDOSSA, P.; GUERRE-MILLO, M.; CLÉMENT, K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*, v.55, p.1554-1561, 2006.

- CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M.C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic. Biol. Med.* v. 39, p. 841-852, 2005.
- CHOI, S.; BENZIE, I.F.F.; MA, S.; STRAIN, J.J.; HANNIGAN, B.M. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? *Free Radic. Biol. Med.* v. 44, p. 1217-1231, 2008.
- CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G.; MURANO, I.; CERESI, E.; FALOIA, E.; WANG, S.; FORTIER, M.; GREEMBERG, A.S.; OBIN, M.S. Adipocyte death defines macrophages localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research.* v.46, p. 2347-2355, 2005.
- DE LORENZO, A.; DEL GOBBO, V.; PREMROV, M.G.; BIGIONI, M.; GALVANO, F.; DI RENZO, L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am. J. Clin. Nutr.*, v.80, p. 40-45, 2007.
- DE TAEYE, B.; SMITH, L.H.; VAUGHAN, D.E., Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology.* v.5, p.149-154, 2005.
- DEGASPERI, G.R.; DENIS, R. G. P.; MORARI, J.; SOLON, C.; GELONEZE, B.; STABE, C.; PAREJA, J. C.; VERCESI, A. L. E.; VELLOSO, L. A. Reactive oxygen species production is increased in the peripheral blood monocytes of obese patients. *Metabolism Clinical and Experimental.* v.58, p.1087–1095. 2009.
- DINIZ, Y.S.; BURNEIKO, R. M.; SEIVA, F.R.F.; ALMEIDA, F.Q.A.; GALHARDI, C.M.; NOVELLI FILHO, J.L.V.B.; MANI, F.; NOVELLI, E.L.B. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *International Journal of Cardiology*, v. 124, p. 93-99, 2008.
- ECHTAY, K. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* v. 43, p. 1351-1371, 2007.

- ERIKSSON, J.W. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation – A hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Letters*, v.581, p. 3734-3742, 2007.
- ESPOSITO, C.; GIULIANO, D. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. *European Heart Journal*, v.27, p. 15-20, 2006.
- FAZIO, S.; BABAEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B.; LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, n. 9, p.4647-4652, 1997.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, v.28, n.10, p.2077-2080, 1982.
- FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, O.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, L. Increased oxidative stress in obesity and impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* v. 114, p. 1752-1761, 2004.
- GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v.316, n2, p.129-139, 2009.
- GAO, J; KATAGIRI,H; ISHIGAKI, Y; YAMADA, T.; OGIHARA, T.; IMAI, J.; UNO, K.; HASEGAWA, Y.; KANZAKI, M.; YAMAMOTO, T.T.; ISHIBASHI, S.; OKA, Y. Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation an insulin resistance. *Diabetes*. v.56, p.24-33, 2007.
- GREENBERG, A.S.; OBIN, M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.83(supl), p. 461S-465S, 2006.
- GUALILLO, O., GONZÁLEZ-JUANATEY, J.R., LAGO, F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc. Med.* v. 17, p. 275-283, 2007.

- GUERRE-MILLO, M. Adiponectin: an Update. *Diabetes & Metabolism*. v.34, p.12-18, 2008.
- GUILHERME, A.; VIRBASIOUS, J.V.; PURI, V.; CZECH, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insuline resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews-Molecular Cell Biology*. v.9, p.367-377, 2008.
- GUMMERSBACH, C.; HEMMRICH, K.; KRÖNCKE, K.; SUSCHEK, C.V.; FESHEL, K.; PALLUA, N.. New aspects of adipogenesis: Radicals and oxidative stress. *Differentiation*. doi:10.1016/j.diff.2008.09.009, 2008.
- HAJER, G.R.; van HAEFTEN, T.W.; VISSEREN, F.L.J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes and vascular diseases. *European Heart Journal*. v. 29. p.2959-2971, 2008.
- HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P.E. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* v. 37, p.753-768, 2008.
- HEILBRONN, L.K.; CAMPBELL, L.V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insuline resistance in human obesity. *Current Pharmaceutical Design*. v. 14, p. 1225-1230, 2008.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) Xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* v. 19, n.3, p. 271-280, 1995.
- HERMSDORFF, H.H.M.; ZULET, A.; BRESSAN, J.; MARTÍNEZ, J.A. Efecto de la restricción calórica y del perfil de los macronutrientes sobre las citoquinas como biomarcadores de inflamación. *Revista Española de Obesidad*. v.6, n.1, p.9-20, 2008.
- HIVERT, M.; SULLIVAN, L.M.; FOX, C.S.; NATHAN, D.M., D'AGOSTINO, R.B.; WILSON, P.W.F.; MEIGS, J.B. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insuline resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v.93, p.3165-3172, 2008.

- HOENE, M.; WEIGERT, C. The role of interleukin-6 in insuline resistance, body fat distribution and energy balance. *Obesity Reviews*. v.9, p20-29, 2007.
- HOPPS, E.; NOTO, D.; CAIMI, G.; AVERNA, M.R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr. Metab. & Cardiovasc. Dis.* v.20, n.1, p.72-77, 2010.
- HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insuline resistance. *Science*. v.259, n.5091, p.87-91, 1993.
- HUANG, Z.H.; REARDON, C.A.; MAZZONE, T. Endogenous ApoE expression modulates adipocyte triglyceride content and turnover. *Diabetes*. v.55, p. 3394-3402, 2006.
- KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y. ; KO, K. HIASA, K.; KITAZAWA, R. ; KITAZAWA, S. ; MIYACHI, H. ; MAEDA, S. ; EGASHIRA, K. ; KASUGA. M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. v.116, p.1494-505, 2006.
- KATO, R.; MORI, C.; KITAZATO, K.; ARATA, S.; OBAMA, T.; MORI, M.; TAKAHASHI, K.; AIUCHI, T.; TAKANO, T.; ITABE, H. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v.29, p.33-39, 2009.
- KEANEY, J.F.; LARSON, M. G.; VASAN, R.S.; WILSON, P.W.F.; LIPINSKA, I.; COREY, D.; MASSARO, J.M.; SUTHERLAND, P.; VITA, J.A.; BENJAMIN, E.J. Obesity and systemic oxidative stress- Clinical correlates of oxidative stress in The Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 23, p. 434-439, 2003.
- KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 89, p 2548-2556, 2004.

- LAGO, F.; GÓMEZ, R.; GÓMEZ-REINO, J.J.; DIEGUEZ, C.; GUALILLO, O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*. v. 34, n.10, p. 500-510, 2009.
- LENZ, A.; DIAMOND JR, F.B. Obesity: the hormonal milieu. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes*. v. 15, p. 9-20, 2008.
- LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. v.674, p. 137-147, 2009.
- LIONETTI, L.; MOLLICA, M.P.; LOMBARDI, A.; CAVALIERE, G.; GIFUNI, G.; BARLETTA, A. From chronic overnutrition to insuline resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutrition, metabolism and cardiovascular Diseases*. v. 19, p. 146-152, 2009.
- LOHMANN C.; SCHÄFER, N.; von LUKOWICZ, T.; STEIN, M.A.S.; BORÉN, J.; RÜTTI, S.; WAHLI, W.; DONATH, M.Y.; LÜSCHER, T.F.; MATTER, C.M. Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periadventitial and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets. *Atherosclerosis*. v.207, n.2, p.360-367, 2009.
- LUMENG, C.N.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. v. 117, p.175-184. 2007.
- LUMENG, C.N.; DeYOUNG, S.M.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. Increased Inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. v.56, p.16-23, 2007.
- MARINOU, K.; TOUSOULIS, D.; ANTONOPOULOS A.S.; STEFANADI, E.; STEFANADI, C. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *International Journal of Cardiology*. v.138, n1, p. 3-8, 2010.
- MATSUSAWA-NAGATA, N.; TAKAMURA, T.; ANDO, H.; NAKAMURA, S.; KURITA, A.; MISU, H.; OTA, T.; YOKOYAMA, M.; HONDA, M.; MIYAMOTO, K.; KANEKO, Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin

- resistance and obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 57, p. 1071-1077, 2008.
- MAURY, E.; BRICHARD, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 314, p. 1-16, 2010.
- MURANO, I.; BARBATELLI, G.; PARISANI, V.; LATINI, C.; MUZZONIGRO, G.; CASTELLUCCI, M.; CINTI, S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research*. v.49, p. 1562-1568, 2008.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal. Biochem.*, v. 220, n.2, p. 403-409, 1994.
- NUNN, A.V.W.; GUY, G.W.; BELL, J.D., Endocannabinoids, FOXO and the metabolic syndrome: Redox, function and tipping point- The view from two systems. *Immunobiology*. doi.10.1016/j.imbio.2009.03.005,2009.
- PARK, J.; CHUNG, J.J.; KIM, J.B. New evaluations of redox regulating system in adipose tissue of obesity. *Diabetes Research and Clinical Practice*. v.77s, p.S11-S16, 2007.
- PAUSOVA, Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 15, p. 173-178, 2006.
- PENNATHUR, S.; HEINECKE, J.W. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. v.9, n° 7, p.955-969, 2007.
- POU, K.M.; MASSARO, J.M.; HOFFMANN, U.; VASAN, R.S.; MAUROVICH-HORVAT, P.; LARSON, M.G.; KEANEY Jr., J.F.; MEIGS, J.B.; LIPINSKA, I.; KATHIRESAN, S.; MURABITO, J.M.; O'DONNELL, C.J.; BENJAMIN, E.J.; FOX, C.S. Visceral and

- subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress. The Framingham Heart Study. *Circulation*. v.116, p.1234-1241, 2007.
- RABE, K.; LEHRKE, M.; PARHOFER, K.G.; BROEDL, U.C. Adipokines and insuline resistance. *Mol.Med*. v.14, n. 11-12, p. 741-751, 2008.
- REUTER, T.Y. Diet-induced models of obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models*. v. 4, n.1, p. 3-8, 2007.
- ROBERTS, C.K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. v. 84, p. 705-712, 2009.
- ROCHA. V.Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews-Cardiology*. v.9, p.399-409, 2009.
- RUDICH, A.; KANETY, H.; BASHAN, N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. *Trends in Endocrinology and Metabolism.*, v. 18, n.18, p. 291-299, 2007.
- SACRE, S.M.; STANNARD, A.K.; OWEN, J.S. Apolipoprotein E (apoE) isoform differentially induce nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS Lett.*, v. 540, p. 181-187, 2003.
- SCHÖNFELD, P.; WOJTCZACK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med*. v. 45, p. 231-241, 2008.
- SCHREYER, S.A.; VICK, C.; LYSTIG, T.C.; MYSTOWSKI, P.; LEBOUF, R.C. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. v.282, p. E207-E214, 2002.
- SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insuline resistance. *Gastroenterology*. v. 132, p. 2169-2180, 2007.

- STEFANOVIC, A.; KOTUR-STEVLJEVIC, J.; SPASIC, S.; BOGAVAC-STANOJEVIC, N.; BUJISIC, N.; The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*. v. 79, p. 156-163, 2008.
- STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*.v.1790, n11, p.1478-1485 , 2009.
- SUBRAMANIAN, S.; CHAIT, A. The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. v.44, p. 20-39, 2009.
- SURMI, B.K.; HASTY, A.H. Macrophage infiltration into adipose tissue. *Future Lipidol.* v. 3, n.5, p. 545-556, 2008.
- TARNUS, E. ; WASSEF, H. ; CARMEL, J. F. ; RONDEAU, P. ; ROCHE, M. ; DAVIGNON, J. ; BERNIER, L. ; BOURDON. E. Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. *FEBS Letters*. v.583, p.2042-2048, 2009.
- THATCHER, S.; YIANNIKOURIS, F.; GUPTE, M.; CASSIS, L. The adipose renin-angiotensin system: Role in cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v.302, n.2, p.111-117, 2009
- TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews- Immunology*. v.6, p. 772-783. 2006.
- TRAYHURN, P. Adipocyte biology. *Obesity reviews*, v. 8 (suppl.1), p.41-44, 2007.
- VAN GAAI, L.F.; MERTENS, I.L.; DE BLOCK, C.E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. v.444, n.14, p.875-880, 2006
- VÁZQUEZ-VELA, M.E.; TORRES, N.; TOVAR, A.R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arquives of Medical Research*. v.39, p.715-728, 2008.

- VESKOUKIS, A.S.; NIKOLAIDIS, M.G.; KYPAROS, A., KOURETAS, D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic. Biol. Med.* v.47, n10, p.1371-1374, 2009.
- WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* v.44, p. 381-386. 2004.
- WEISBERG, S.P.; McCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE Jr, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* v. 112, p. 1796-1808, 2003.
- YANAI, H.; TOMONO, Y.; ITO, K.; FURUTANI, N.; YOSHIDA, H.; TADA, N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutrition Journal*, v. 7, p. 10-17, 2008.
- ZEYDA, M.; STULNIG, T.M. Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters.* v. 112, p. 61-67, 2007.
- ZOU, Z.; SHAO, J. Role of adipocytokines in obesity-associated insuline resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry.* v. 19, p. 277-286, 2008.