

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e UEPG)

ELISANGELA GUEIBER MONTES

O EFEITO DA ESPLENECTOMIA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR  
GLUTAMATO MONOSSÓDICO(MSG)

PONTA GROSSA

2013

ELISANGELA GUEIBER MONTES

O EFEITO DA ESPLENECTOMIA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR  
GLUTAMATO MONOSSÓDICO(MSG)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (área de Concentração Biologia Evolutiva)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Grassioli

PONTA GROSSA  
2013

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Montes, Elisangela Gueiber

M772 O efeito da esplenectomia sobre a  
obesidade induzida por glutamato  
monossódico (MSG)/ Elisangela Gueiber  
Montes. Ponta Grossa, 2013.  
102f.

Dissertação (Mestrado em Biologia  
Evolutiva - Área de Concentração: Biologia  
Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta  
Grossa e Universidade Estadual do  
Centro-Oeste.

Orientadora: Profª Drª Sabrina  
Grassiolli.

1. Baço. 2. Inflamação. 3. Ilhotas.  
I. Grassiolli, Sabrina. II. Universidade  
Estadual de Ponta Grossa. Universidade  
Estadual do Centro-Oeste. Mestrado em  
Biologia Evolutiva. III. T.

CDD: 616



### Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



#### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 16/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **ELISANGELA GUEIBER MONTES**.

Aos vinte e nove dias do mês de maio de dois mil e treze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr<sup>a</sup> Sabrina Grassioli em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **ELISANGELA GUEIBER MONTES**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr<sup>a</sup> Sabrina Grassioli (Orientadora UEPG), Dr<sup>a</sup> Dionizia Xavier Scomparin (UNINGÁ – Maringá) e Dr. Julio Cezar de Oliveira (UEM). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"O Efeito da Esplenectomia sobre a Obesidade Induzida por Glutamato Monossódico (MSG)"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 29 de maio de dois mil e treze.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sabrina Grassioli

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dionizia Xavier Scomparin

Prof. Dr. Julio Cezar de Oliveira

Dedico este trabalho a Deus, a meus filhos Gabriela e Rafael, ao meu esposo Isaías e a meus pais Cornélio e Ester, por todo o amor e carinho demonstrados em mais esta batalha.

## AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, pelo imenso amor a mim dedicado e por permitir que eu desse cada passo nesta jornada. Por ter me carregado em seus braços nos momentos mais difíceis em que andar sozinha era difícil. Por andar ao meu lado no caminho, para que eu não me desviasse dele. Por ensinar-me a ter fé e não desistir dos objetivos, confiando Nele acima de tudo.

Aos meus filhos Gabriela e Rafael, meus maiores presentes. Por serem capazes de entender, apesar de tão pequenos, cada momento que estive ausente. Por tanto amor e carinho, sem jamais cobrar nada e por do seu jeitinho participarem de cada etapa.

Ao meu esposo Isaías pelo apoio incondicional e pelo amor que tantas vezes me fizeram levantar e começar de novo. Sem ele tenho certeza que não seria possível chegar aqui.

A meus pais Cornélio e Ester por toda a ajuda e carinho, cuidando de minha família em todos os momentos em que eu estive ausente, sem restrição de dia e de hora. Por me ensinarem o caminho e me ajudarem a andar por ele.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Sabrina Grassioli, por toda a paciência e pelos inúmeros ensinamentos. Pela capacidade de nos conduzir e despertar à vontade de novas descobertas na vida científica. Por ter a serenidade e disponibilidade de me orientar neste trabalho e também por acreditar na minha capacidade e na minha força de vontade, me incentivando a continuar.

Às minhas amigas e colegas de mestrado Claudia e Stefani, bem como a todos os acadêmicos que estiveram envolvidos neste trabalho, pela imensa ajuda e por mostrar a importância do trabalho em equipe.

A todos os meus colegas e amigos do DECLIN pelo incentivo e o apoio durante o tempo em que estive envolvida nesta pesquisa.

Aos professores Dra. Marcia Helena Appel e Dr. Gilson Cesar Nobre Franco pelas importantes contribuições apresentadas em minha qualificação.

Entrega o teu caminho ao Senhor, confia  
Nele e o mais Ele fará.

(Salmos 37.5)

## RESUMO

**Introdução:** O excesso de tecido adiposo está associado a instalação da síndrome metabólica (SM), reunindo diversas alterações fisiológicas, tais como, intolerância a glicose, dislipidemia, hipertensão e resistência a insulina, um quadro intimamente ligado ao desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Indivíduos obesos e/ou diabéticos também apresentam um baixo grau de inflamação crônica interligando os diferentes sintomas clínicos e fisiopatológicos da SM. Recentemente o baço, um dos principais órgãos linfoides do nosso corpo, tem sido apontado como órgão participante do processo inflamatório na obesidade. **Objetivo:** O presente trabalho investigou os efeitos da esplenectomia na SM induzida pelo tratamento neonatal com glutamato monossódico (MSG). **Metodologia:** Ratos Wistar machos receberam durante os 5 primeiros dias de vida injeções de MSG (4g/Kg). Controles (CON) receberam salina equimolar. Os animais foram desmamados aos 21 dias e aos 60 dias metade dos animais foram submetidos a esplenectomia (ESPL) para retirada do baço, formando-se quatro grupos experimentais: CON-NO (não-operado); CON-ESPL; MSG-NO; MSG-ESPL). Dos 21 aos 90 dias foram avaliados consumo alimentar, hídrico e peso corporal. Aos 90 dias ilhotas pancreáticas foram isoladas pela técnica da colagenase e incubadas com glicose (5,6; 8,3 e 16,7mM) ou glicose (11.1mM) mais L-NAME (2,5; 5,0 e 10,0mM) inibidor da enzima produtora de óxido nítrico (iNOS). A insulina foi dosada por radioimunoensaio. O sangue foi coletado e plasma separado para dosagens bioquímicas de glicose, triglicerídeos e colesterol total. A resistência a insulina foi avaliada pelo teste de tolerância a insulina (1U/Kg). Análise automatizada do hemograma também foi realizada. Os depósitos de gordura branco e marrom, bem como, o pâncreas e o baço foram retirados para procedimentos histológicos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (epm), Análise de Variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) foi usado. **Resultados e Discussão:** Ratos MSG-NO apresentaram resistência à insulina, aumento de aproximadamente 78% nos níveis de insulina, triglicerídeos e colesterol. Adicionalmente o conteúdo de gordura corporal foi cerca de 215% maior neste grupo em relação aos ratos CON-NO, sem modificar o controle alimentar. O tamanho dos adipócitos e das ilhotas pancreáticas do grupo MSG-NO foi aproximadamente 115% maior, enquanto o número de adipócitos e de ilhotas pancreáticas foi cerca de 58% menor neste grupo comparado aos ratos CON-NO. Ilhotas pancreáticas de ratos MSG-NO apresentam hipersecreção de insulina, acompanhado de alterações na responsividade ao bloqueador da iNOS. O hematócrito e o número de leucócitos foi cerca de 50% maior nos ratos MSG-NO comparados ao grupo CON-NO. A ESPL aboliu a hiperinsulinemia, a resistência a insulina e reduziu a ingestão alimentar nos ratos MSG. Todavia, a ESPL elevou aproximadamente 21% o nível de triglicerídeos e colesterol no grupo MSG-ESPL. Ratos MSG-ESPL apresentaram alteração no perfil de linfócitos e granulócitos após a cirurgia. A ESPL reduziu aproximadamente 25% e 63% respectivamente a hipertrofia dos adipócitos e das ilhotas pancreáticas de ratos MSG, bem como normalizou a hipersecreção de insulina. Finalmente a ESPL normalizou a responsividade ao bloqueador da iNOS. **Conclusões:** A esplenectomia reduz a obesidade, a hiperinsulinemia e a resistência a insulina em ratos MSG, alterações que podem estar relacionadas a redução do processo inflamatório oriundo do baço.

**Palavras chave:** Baço, Inflamação, Ilhotas



## ABSTRACT

**Introduction:** Adipose tissue excess is associated to the metabolic syndrome (MS), resulting in several physiological changes, such as, glucose intolerance, dyslipidemia, hypertension and insulin resistance, a set of symptoms intimately linked to the development of type II Diabetes Mellitus (DM2). Obese and/or diabetic people also present a low degree of chronic inflammation intertwining the different MS clinical and physiopathological symptoms. Recently, the spleen, one of the main lymphoid organs in our body, has been appointed as the active organ in the obesity inflammatory process.

**Objective:** This study investigated the effects of splenectomy in SM induced through the neonatal treatment with monosodium glutamate (MSG). **Methodology:** Wistar male rats received MSG injections (4g/kg) from the first to the fifth day of life, while de control group (CON) received equimolar saline. The animals were weaned on the 21<sup>st</sup> day and on day 60 half of the animals were submitted to splenectomy (ESPL) and the spleen was removed. Four experimental groups were formed. CON-NO (not operated); CON-ESPL; MSG-NO; MSG-ESPL. From day 21 to day 90, food and water consumption as well as body weight were evaluated. On day 90, pancreatic islets were isolated using the collagenase technique and incubated in glucose (5,6; 8,3; and 16,7mM) or glucose (11.1 mM) plus L-NAME (2,5; 5,0 and 10,0nM) inhibitor of the nitric oxide producing enzyme (iNOS). The insulin was dosed through radioimmunoassay. Blood was collected and plasma separated for glucose, triglycerides and total cholesterol biochemical dosages. Insulin resistance was evaluated using the insulin tolerance test (1U/Kg). Hemogram automated analysis was also carried out. White and brown fat depots, as well as pancreas and spleen were removed for histological procedures. Data was expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (sem). Variance analysis (ANOVA), with Bonferroni post-test ( $p < 0,05$ ) were employed. **Results and Discussion:** Rats MSG-NO presented insulin resistance, increase of about 78% in the insulin, triglycerides and cholesterol levels. Additionally, the content of body fat was around 215% higher in this group in relation to the CON-NO rats, without changing the food control. The size of adipocytes and pancreatic islets was around 58% smaller in this group when compared to CON-NO rats. Pancreatic islets of MSG-NO rats presented insulin hypersecretion, followed by alterations in the response to the iNOS blocker. The hematocrit and number of leucocytes was around 50% higher in MSG-NO rats when compared to the CON-NO group. The ESPL abolished hyperinsulinaemia, insulin resistance and reduced the food ingestion in MSG rats. However, ESPL elevated approximately 21% the level of triglycerides and cholesterol in the MSG-ESPL. MSG-ESPL rats presented alteration in the lymphocyte and granulocyte profile after surgery. The ESPL reduced approximately 25% and 63%, respectively, the hypertrophy of adypocytes and pancreatic islets in MSG rats, as well as normalized the insulin hypersecretion. Finally, SPL normalized the response to the iNOS blocker. **Conclusions:** Splenectomy reduces obesity, hyperinsulinaemia and resistance to insulin in MSG rats, such alterations might be related to reduction in the inflammatory process originated in the spleen.

**Key words:** Spleen, Inflammation, islets.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina.....	34
Figura 2. Esquema morfológico e funcional do baço.....	39
Figura 3. Avaliação do crescimento, do consumo de ração e água.....	56
Figura 4. Avaliação do conteúdo de tecido adiposo branco e marrom em ratos esplenectomizados.....	58
Figura 5. Secreção de insulina estimulada por glicose.....	59
Figura 6. Efeito do L-NAME sobre a secreção de insulina.....	60
Figura 7. Análise histológica do tecido adiposo branco em animais esplenectomizados.....	62
Figura 8. Análise histológica do tecido adiposo marrom em animais esplenectomizados.....	64
Figura 9. Análise histológica do pâncreas evidenciando ilhotas de Langherans em animais esplenectomizados.....	65
Figura 10. Avaliação do tamanho e do número de ilhotas pancreáticas.....,	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros biométricos e peso de órgãos em animais esplenectomizados.....	52
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e $K_{IT}$ .....	53
Tabela 3. Parâmetros hematológicos.....	54
Tabela 4. Parâmetros relativos aos depósitos de gordura.....	63

## LISTA DE SIGLAS

ABHD5	<i>AB-hydrolase-containing 5</i>
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGL	Ácido graxo livre
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
AKT	Quinase serina-treonina
Alfa-MSH	Hormônio alfa-melanócito estimulador
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ARQ	Núcleo arqueado do hipotálamo
ATGL	Lipase de triacilgliceróis do tecido adiposo
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
CART	Transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina
Cbl	Proteína adaptadora Cas-Br-murino
CON	Controles
CON-ESPL	Controle Esplenectomizado
CON-NO	Controle Não Operado
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças cardiovasculares
DEXA	<i>Dual energy x-ray absorptiometry</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMN	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
ERO	Eritropoietina
ESPL	Esplenectomia
G-6-P	Glicose-6-fosfato
G-6-PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Gab-1	Proteína de ligação 1 associada ao GRB2
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GK	Glicerol-quinase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1

GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GRB2	Fator de crescimento ligado ao receptor 2
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IM	Infarto do miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase
IP <sub>3</sub>	Inositol 1-4-5-trifosfato
IR	Receptor de Insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina tipo 1
ITT	Teste de tolerância à insulina
JAK2	Janus Kinase 2
LH	Núcleo lateral do hipotálamo
LHS	Lipase hormônio sensível
LLP	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócitos T
M3	Receptores muscarínicos subtipo 3
MAG	Monoacilglicerol
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos-1
MCP-2	Proteína quimioatrativa de monócitos-2
MGL	Lipase de monoacilglicerol
MSG	Glutamato monossódico
MSG ESPL	MSG esplenectomizado
MSG-NO	MSG Não Operado
NK	Natural killer
NPY	Neuropeptídeo Y

OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
PALS	Bainha linfoide periarteolar
PCR	Proteína C reativa
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinase
PKA	Proteíno-quinase A
PKC	Proteíno-quinase C
PKG	Proteíno quinase G
PLC	Fosfolipase -C
PVN	Núcleo periventricular do hipotálamo
RBP-4	Proteína-4 ligadora de retinol
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RIE	Radioimunoensaio
SAA	Amiloide sérico A
SHC	Oncogene produto do sarcoma colágeno símile
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema nervoso simpático
SOCS	Supressor da sinalização de citocina
TAB	Tecido adiposo branco
TAG s	Triacilgliceróis
TAM	Tecido adiposo marrom
Th	<i>T helper</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
UCP-1	Proteína desacopladora do gradiente de prótons
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VMN	Núcleo ventromedial do hipotálamo
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 OBESIDADE: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.2 TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB) .....	21
1.2.1 Metabolismo de Adipócitos.....	21
1.2.2 O tecido adiposo, a obesidade e o processo inflamatório.....	24
1.3 PÂNCREAS ENDÓCRINO: ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	27
1.3.1 A Sinalização da Insulina.....	31
1.3.2. Inflamação, resistência à insulina e célula $\beta$ .....	35
1.4 O BAÇO E SUA RELAÇÃO COM O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	38
1.5 O MODELO DE OBESIDADE MSG.....	41
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1 INDUÇÃO DA OBESIDADE.....	45
3.2 ESPLENECTOMIA.....	45
3.3 AVALIAÇÃO DO PESO E CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA.....	46
3.4TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT).....	46
3.5 RETIRADA DE ÓRGÃOS E TECIDOS.....	46

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	47
3.7 DETECÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA .....	47
3.8 HEMOGRAMA.....	47
3.9 ISOLAMENTO DE ILHOTAS.....	48
3.10 PRÉ-INCUBAÇÃO DE ILHOTAS.....	48
3.11 EFEITO DO BLOQUEADOR DA iNOS SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE.....	48
3.12 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	49
3.13 DOSAGEM DE INSULINA POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE).....	49
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E OBESIDADE.....	51
4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	52
4.3 HEMOGRAMA.....	53
4.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, DO CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA	54
4.5. AVALIAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE GORDURA.....	56
4.6 SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE.....	58
4.7. EFEITO DA ESPLENECTOMIA NA AÇÃO DO BLOQUEADOR DA NOS SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE.....	59
4.8. HISTOMORFOLOGIA DOS DEPÓSITOS DE GORDURA EM RATOS ESPLENECTOMIZADOS.....	60



4.9.HISTOMORFOLOGIA DO PÂNCREAS EM RATOS ESPLENECTOMIZADOS.....	64
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
5.1 MODELO DE OBESIDADE MSG.....	67
5.2 O EFEITO DA ESPLENECTOMIA SOBRE A OBESIDADE.....	75
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>101</b>
8.1 ANEXO 1.....	102

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 OBESIDADE: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA

A obesidade é considerada a epidemia do século XXI pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo reconhecida hoje como um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, primariamente pela íntima associação de excesso de tecido adiposo e a instalação de graves doenças crônicas e degenerativas. Estimativas indicam que no mundo 1,1 bilhões de adultos apresentam sobrepeso e, destes, 312 milhões são obesos (WHO, 2011). No entanto existe uma diferença significativa entre estes dados, dependendo do país em estudo, como em previsões de prevalências superiores a 50% nos Estados Unidos e superiores a 25% no Brasil para o ano de 2025 (KOPELMAN, 2000).

Um levantamento feito entre 2008 e 2009, com 188 mil pessoas, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) destaca que na população adulta 48,5% dos brasileiros estão acima do peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres encontram-se em um patamar de obesidade. Ficou evidente também que há um aumento da frequência do sobrepeso e da obesidade em função da faixa etária. No caso dos homens entre 55 a 64 anos, 51% encontram-se em sobrepeso e 19,9% são obesos, enquanto entre mulheres nesta mesma faixa etária, 48% encontram-se em sobrepeso e 21,3% são obesas. O excesso de peso e a obesidade atingiam duas a três vezes mais os homens de maior renda, além de se destacarem nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste e nos domicílios urbanos. Nas mulheres, as duas condições se destacaram no Sul do país e nas classes intermediárias de renda. Outro dado importante observado na mesma pesquisa é que entre crianças de 5 a 9 anos essa porcentagem também é alta. O IBGE revela que 36,6% das crianças brasileiras estão acima do peso. Os índices de obesidade também estão num patamar elevado, crescendo muito nos últimos 35 anos. Em 1974, apenas 1,4% das crianças eram obesas, saltando para 16,6% em 2009. Verificou-se, ainda, o seguinte padrão: há mais crianças obesas nas localidades urbanas e na região sudeste do Brasil (IBGE, 2010).

Diferentes métodos podem ser utilizados para definir clinicamente a obesidade, dentre os quais, destacam-se as pregas cutâneas, a circunferência da cintura, a razão cintura-quadril e o diâmetro sagital e o índice de massa corpórea

(IMC) (KONING et al., 2007). Para as medidas de excesso de gordura visceral utiliza-se preferencialmente a medida da circunferência da cintura. Por se tratar de uma única medida, estaria menos susceptível a variações na mensuração e a variabilidades étnicas. Consideram-se então os valores a partir de 88 e 102 cm como associados a fatores de risco cardiometabólicos elevados, respectivamente para mulheres e homens. Outras técnicas mais especializadas e precisas de determinação da adiposidade têm sido utilizadas na prática clínica e na pesquisa, onde podemos destacar a tomografia computadorizada, a ressonância nuclear magnética, a bioimpedância (YOSHIZUMI et al., 1999) e o DEXA (*dual energy x-ray absorptiometry*) (PARADISI et al., 1999). Todavia, as técnicas mais modernas normalmente são de difícil acesso e de custos elevados, principalmente para grandes análises populacionais. Deste modo, o método internacionalmente aceito e mais utilizado para avaliação da obesidade como um todo é o IMC, que é obtido pela relação entre o peso corporal (Kg) e o quadrado da altura ( $\text{Kg/m}^2$ ) (MARK et al., 1999; WHO, 2002). Indivíduos normais (eutróficos) têm IMC entre 18,5 e 24,9  $\text{Kg/m}^2$ , indivíduos em sobrepeso têm IMC entre 25,0 e 29,9  $\text{kg/m}^2$  enquanto obesos têm IMC maior ou igual a 30  $\text{Kg/m}^2$ . Baseado no IMC a obesidade é ainda subdividida em diferentes graus, sendo obesidade de grau I ( $30 \leq \text{IMC} < 34,9$ ), II ( $35 \leq \text{IMC} < 39,9$ ) e III também designada de severa ou mórbida ( $\text{IMC} \geq 40$ ). Apesar da ampla aplicação do IMC, atualmente o método mais confiável é a avaliação da medida das pregas cutâneas, como índice marcador da obesidade (WHO, 2011).

Diversos estudos epidemiológicos e clínicos têm confirmado a contribuição da obesidade para o desenvolvimento e avanço de várias doenças, como alguns tipos de câncer, doenças pulmonares, distúrbios psiquiátricos, alterações no processo reprodutivo, esteatose hepática, *Diabetes Mellitus* (DM), além do aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) (JAMES; RIGBY; LEACH, 2004). A obesidade é fator de risco independente para DCV, incluindo doença arterial coronariana (DAC), infarto do miocárdio (IM), angina, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e fibrilação atrial (ROCHA; LIBBY, 2009). Estudo recente com mais de 37 mil adolescentes mostrou que aqueles com um IMC maior, mesmo dentro da faixa de normalidade, apresentam maior risco de DAC na vida adulta. Outro estudo realizado com 5.209 participantes com mais de 44 anos foi utilizado para avaliar o efeito da

obesidade sobre o risco de DCV, DM, HAS e hipercolesterolemia. Durante o acompanhamento, o risco relativo ajustado para a idade para DCV foi de 1,46 nos homens e 1,64 nas mulheres, e para hipertensão foi ainda maior entre homens e mulheres obesos (2,21 e 2,75, respectivamente) (TIROSHI et al., 2011). Alguns dados também apontam a inter-relação ente IMC e DM tipo 2 (DM 2), onde observa-se que a obesidade é o mais importante fator de risco ambiental para o desenvolvimento do diabetes (PI-SUNYER, 1996). Em estudo baseado no seguimento de 84 mil mulheres durante 16 anos, demonstrou que a obesidade foi o principal preditor do aparecimento do diabetes. Neste estudo o risco de desenvolver diabetes foi 20 vezes maior entre o IMC de 30-34,9 Kg/m<sup>2</sup> e 38 vezes maior quando o IMC era maior que 35 (HU et al., 2001).

O excesso de tecido adiposo está associado há um complexo quadro clínico formado por obesidade abdominal, resistência à insulina (RI), intolerância à glicose, hipertensão, hipertrigliceridemia e/ou redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), o que caracteriza síndrome metabólica (SM) (JAMES; RIGBY; LEACH, 2004). A síndrome metabólica é a mais comum doença do metabolismo da atualidade e também a maior responsável por eventos cardiovasculares e de DM (ISOMAA et al., 2001). É necessário definir que um dos mais importantes aspectos fisiopatológicos e fenotípicos desta síndrome é a presença da obesidade central ou visceral (MARK et al. , 1999; EIKELIS et al., 2003).

A perda da responsividade ao hormônio insulina e o rompimento da homeostase glicêmica são marcas da SM. A RI instala-se nos músculos, no fígado e tecido adiposo, predispondo a intolerância à glicose. A hiperglicemia é frequentemente exacerbada pelo aumento da gliconeogênese hepática, devido à resistência à insulina no fígado. RI e elevação dos níveis plasmáticos de glicose caracterizam a instalação de outra patologia de maior gravidade, o DM2, uma doença complexa causada por fatores genéticos e ambientais. Na grande maioria dos indivíduos obesos a SM e a resistência à insulina precedem o diagnóstico de DM2, caracterizando a íntima relação entre obesidade e a instalação desta doença (MEIGS et al., 2006). Segundo estimativas da OMS, em 2011, 346 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes. O órgão alerta, entretanto, que o número pode dobrar até 2030, caso não haja intervenção no cenário global. Atualmente,

quase 80% das mortes provocadas pela doença são registradas em países de média e baixa renda (WHO, 2011). Já no Brasil a última estimativa do IBGE realizada em 2008-2009 fornece o número de 12.054.827 diabéticos no país (IBGE, 2010).

A obesidade pode ser definida como uma enfermidade crônica, complexa, de origem multifatorial, caracterizada por acúmulo anormal ou excessivo de gordura, na forma de triacilgliceróis (TAGs) no tecido adiposo, bem como de maneira ectópica em outros órgãos como o fígado e pâncreas (KOPELMAN, 2000). A obesidade pode ser desencadeada por erros no metabolismo energético favorecendo o balanço energético positivo, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, promovendo aumento dos estoques de gordura corporal e elevando o peso corporal (CARVALHO et al., 2012). O acúmulo de massa adiposa ocorre devido a uma combinação de múltiplos fatores genéticos, hormonais, no sistema nervoso central (SNC), bem como hábitos alimentares e fatores ambientais, no entanto existem raros casos de defeitos monogênicos. Estudos indicam que embora diversos fatores contribuam, os hábitos alimentares atrelados ao sedentarismo são os principais determinantes do ganho de peso nas populações (FAROOQI, 2006).

A composição corporal está baseada em dois tipos de massas corporais, a massa magra, representada principalmente por músculos e a massa gorda, na forma de depósitos de gordura visceral e subcutâneo. Em indivíduos magros existe um padrão de maior quantidade de massa magra em relação à massa gorda, sendo que em obesos este perfil apresenta-se comprometido e a massa gorda predomina sobre a magra (GIORGINO; LAVIOLA; ERIKSSON, 2005). Existem diferentes tipos de depósitos de gordura, entre eles estão o tecido adiposo marrom (TAM), e tecido adiposo branco (TAB), que está distribuído na forma de tecido adiposo visceral (TAV) e subcutâneo (TAS). O TAS é principalmente representado pelos depósitos abaixo da pele nas regiões abdominal, glútea e femoral. O TAV refere-se ao tecido depositado próximo ou mesmo no interior das vísceras da cavidade abdominal, sendo bem exemplificado pela gordura mesentérica, omental e retroperitoneal. Além dos tipos de massa corporal é importante ressaltar também que existem diferenças no comportamento metabólico da gordura intra-abdominal e o tecido adiposo subcutâneo periférico ou glúteo-femoral, sendo o primeiro mais sujeito à lipólise. (HARMELEN et al., 1998).

Uma corrente de investigadores acredita que os ácidos graxos livres (AGL) provenientes da lipólise na gordura visceral, liberados em grande quantidade na circulação portal, tenham papel definitivo na gênese da resistência tecidual à ação insulínica, tanto a nível hepático como periférico, sendo que, estudos reportaram evidências moleculares favoráveis a esta hipótese (BLACKBURN et al., 2003). Todavia, parece que não só a gordura visceral apresenta comportamento metabólico desfavorável, mas também a gordura subcutânea. A gordura subcutânea localizada na região abdominal, principalmente abaixo da fáscia abdominal, contribuiria para piora da ação da insulina, estando metabolicamente em uma posição intermediária entre a gordura visceral e glúteo-femoral (KELLEY et al. 2000 ).

Nos mamíferos, além do TAB, deve também ser destacado o TAM. A função do TAM se resume basicamente a termogênese (produção de calor), e portanto, participa na regulação da temperatura corporal. Este tipo de tecido é encontrado em pequenas quantidades no humano adulto, sendo encontrado principalmente em fetos e recém-nascidos (VELLOSO, 2006). Os adipócitos deste tecido diferenciam-se dos constituintes do TAB por serem menores, apresentarem várias gotículas de gordura de diversos tamanhos dispersas em seu citoplasma abundante. Apresentam também grande número de mitocôndrias, relacionadas à sua função de termogênese, sendo que a produção de ATP é menor devido ao desvio do gradiente de prótons pela UCP-1 (proteína desacopladora do gradiente de prótons-termogenina) (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

A regulação da massa corporal depende de um perfeito equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Esse equilíbrio é coordenado, em parte, por neurônios especializados localizados no hipotálamo, uma estrutura do SNC que tem um papel fundamental na regulação de vários comportamentos que contribuem para a homeostasia, como o comer, o beber e o controle da temperatura. As informações de fome e saciedade que modulam as redes neurais hipotalâmicas são dependentes de diversos sinais periféricos, entre os quais se destacam a insulina produzida no pâncreas, a leptina produzida principalmente no TAB e os hormônios incretínicos polipeptídeo insulino-trópico dependente de glicose (GIP) e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (HORVATH, 2005; MORTON et al., 2006).

A relação funcional do hipotálamo com outras estruturas do SNC garante a integração do sistema endócrino com outros sistemas efetores, como o motor e o autonômico. O hipotálamo situa-se acima da hipófise, ao redor do terceiro ventrículo.

Ele possui vários grupamentos de células neuronais, denominadas núcleos. Dentre eles podem ser citados o núcleo ventromedial (VMN), o núcleo arqueado (ARQ) e o núcleo paraventricular (PVN) (WILLIAMS et al., 2001)

Inicialmente acreditava-se que a regulação da ingestão alimentar era atrelada apenas aos centros da fome (LHI) e da saciedade (VMN). Essas áreas, uma vez estimuladas, aumentam e inibem a ingestão alimentar, respectivamente. Todavia, em ratos, lesões nessas áreas geram efeitos contrários aos observados em humanos. Atualmente, sabe-se que no hipotálamo não existem áreas definidas e totalmente independentes, mas complexos circuitos neuronais relacionados (KONTUREK, 2004; SAINSBURY; COONEY; HERZOG, 2002).

Estudos demonstram que o hipotálamo é uma estrutura que participa do controle da manutenção do peso corporal em determinado nível, conhecido como ponto de ajuste, que varia de indivíduo para indivíduo. O entendimento atual do sistema envolvido nesta regulação sugere que, no hipotálamo, há dois grandes grupos de neuropeptídeos envolvidos nos processos orexígenos e anorexígenos. O ARQ é o principal núcleo que recebe os sinais liberados por estes neuropeptídeos, sendo então estes liberados para os demais núcleos (KALRA, 1997). Os neuropeptídeos orexígenos são o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP). Já os neuropeptídeos anorexígenos são o hormônio alfa-melanócito estimulador (Alfa-MSH) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART). Os neurônios que expressam esses neuropeptídeos interagem entre si e com sinais periféricos (como a leptina, insulina, grelina e glucocorticóides), atuando na regulação do controle alimentar e do gasto energético (KALRA et al., 1999; SAINSBURY; COONEY; HERZOG, 2002).

## 1.2 TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB)

### 1.2.1 Metabolismo de Adipócitos

O TAB é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são os únicos tipos celulares especializados no armazenamento de grandes quantidades de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma; um processo bioquímico que ocorre sem prejuízo para a funcionalidade celular. Os

adipócitos apresentam todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para síntese e armazenamento de ácidos graxos, um processo bioquímico denominado lipogênese. Os substratos para este processo são glicerol-3-fosfato e AGL complexado a coenzima A. O glicerol, obtido da glicose, é convertido a glicerol-3-fosfato, pela enzima glicerol quinase (GK), o qual é requerido para a esterificação de ácidos graxos livres a triacilglicerois. Em períodos em que há excesso de substratos energéticos, os adipócitos promovem lipogênese elevando os estoques de TAG armazenados. Todavia, quando há déficit calórico, os adipócitos são estimulados a realizar a lipólise dos TAG, liberando glicerol e AGL no sangue para serem usados como substratos energéticos pelos demais tecidos. Os ácidos graxos circulantes podem ser oxidados para a geração de ATP por outros órgãos. Os ácidos graxos, juntamente com o glicerol podem ser também substratos, no fígado, para a cetogênese e a gliconeogênese, respectivamente (STIPANUK, 2006).

A regulação dos processos lipogênicos e lipolíticos no tecido adiposo dependem de uma série de sinalizadores, incluindo os níveis de nutrientes, sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais autonômicos e diversos hormônios (AHIMA; FLIER, 2000). Na lipólise, os principais reguladores são as catecolaminas e os peptídeos natriuréticos; já as principais enzimas que hidrolisam TAGs são: a lipase de triacilglicerois do tecido adiposo (ATGL), a lipase hormônio sensível (LHS) e a lipase de monoacilglicerol (MGL) (LAFONTAN; LANGIN, 2009).

As catecolaminas provenientes do sistema nervoso simpático (SNS) produzidas na medula das glândulas supra-renais, adrenalina e noradrenalina, são potentes ativadores da lipólise. Atuam via  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ - adrenoreceptores e sua ação acontece por estímulo da atividade da LHS e inibição da lipase lipoproteica (LLP). Posteriormente acontece a ativação da adenilil ciclase, que aumentam a produção de AMP cíclico (AMPc), que estimula proteína quinase A (PKA) que fosforila LHS e LLP. Já peptídeos natriuréticos, como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP) ativam guanilil ciclase, que aumentam produção de GMP cíclico (GMPc), que ativa proteína quinase G (PKG). As duas quinases ativadas fosforilam a perilipina e a LHS, estimulando a adenilil ciclase. No estado ativado, a fosforilação da perilipina induz a uma alteração física da superfície da gotícula lipídica, facilitando o acesso da LHS fosforilada pela PKA, levando a fosforilação da perilipina e também liberando o coativador *AB-hydrolase-containing 5* (ABHD5), a qual se liga à ATGL, ativando-a. Ocorre então a hidrolise de TAG,



produzindo diacilglicerol (DAG). A LHS e a MGL (monoacilglicerol lipase) hidrolisam DAG a monoacilglicerol (MAG) e por fim este é hidrolisado pela MGL (LAFONTAN; LANGIN, 2009). Além da lipólise estimulada, a ATGL é essencial para a hidrólise basal de TAGs (BEZAIRE et al., 2009).

No processo de lipogênese, o adipócito requer fonte de glicerol-3-fosfato e de AGL complexado a coenzima A. O primeiro provém da via glicolítica e o segundo pode ter duas origens: sintetizados endogenamente a partir de Acetil Coenzima A (AcetilCoA), e principalmente, obtidos da hidrólise e captação de TAGs, contidos em lipoproteínas (quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa, as VLDL) circulantes (HOLLENBERG, 1966).

A obesidade é caracterizada pelo aumento de tecido adiposo, decorrente de hipertrofia e hiperplasia, sendo que os adipócitos podem aumentar ou diminuir de tamanho, de acordo com o equilíbrio energético do organismo. Quando ocorre aumento do tamanho dos adipócitos, observamos a hipertrofia, e quando novas células adiposas se formam a partir de células precursoras, também em resposta ao equilíbrio energético positivo persistente, caracteriza-se a hiperplasia (OTTO; LANE, 2005). A localização, número e tamanho do adipócito são determinantes para suas características funcionais, e conseqüentemente, das patologias associadas à obesidade. O tamanho do adipócito é determinado pelo balanço entre os processos de lipólise e lipogênese, e representa a fase do ciclo de vida deste adipócito. Esta célula acumula TAGs durante seu ciclo de vida, até certo ponto, a partir do qual a proliferação destas células é acionada. Portanto, no geral, quanto maiores os adipócitos, mais avançados eles estão no seu ciclo de vida (SMITH et al., 2006).

Os adipócitos hipertróficos parecem ser metabolicamente mais ativos que os menores. Porém, parece que a partir de certo ponto de inflexão, o limite de estocagem no adipócito é atingido, neste momento as vias lipogênicas são diminuídas, há diminuição da sensibilidade à insulina, direcionamento da glicose à lactatogênese, o que caracteriza um processo tardio e adaptativo, que limita acúmulo adicional de gordura em um tecido já saturado (DIRAISON et al., 2002; ORTEGA et al., 2010).

Muitos estudos têm relacionado o tamanho do adipócito a prognósticos metabólicos adversos. Indivíduos com DM2 ou dislipidemia apresentam adipócitos subcutâneos maiores que os indivíduos controle (HALLER et al., 1979; LUNDGRE et al., 2007; TCHOUKALOVA et al., 2008). Correlações também têm sido encontradas

em homens e mulheres saudáveis, entre a gordura subcutânea femoral, insulina e TAGs plasmáticos no jejum (IMBEAULT et al., 1999). Outros estudos ainda correlacionam adipócitos maiores com a insulina sérica, a resistência à insulina e o aumento do risco de desenvolvimento do DM 2 (WEYER et al., 2000; LUNDGREN et al., 2007).

### 1.2.2 O tecido adiposo, a obesidade e o processo inflamatório

Pesquisas nos últimos anos têm demonstrado um novo papel para o tecido adiposo atuando como órgão endócrino. Nos adipócitos ocorre também a secreção de um grande número de hormônios e citocinas (conhecidas como adipocinas), que afetam o metabolismo energético em outros tecidos como o fígado e músculos, assim como também foram encontradas atividades efetivas destas moléculas nas vias neuroendócrinas e no processo inflamatório sistêmico (BARTNESS; SONG, 2007; KATAGIRI; YAMADA; OKA, 2007). As adipocinas produzidas e secretadas no tecido adiposo influenciam uma variedade de processos fisiológicos, entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular, a regulação da pressão arterial, a coagulação sanguínea e o processo inflamatório. Alterações na secreção de adipocinas, consequentes à hipertrofia dos adipócitos podem constituir situação relacionada à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (HAVEL, 2004).

Um grande número de citocinas e outras substâncias bioativas foram isoladas no tecido adiposo. Dentre estas substâncias estão leptina, interleucina 6 (IL-6), resistina, adiponectina, visfatina, TNF- $\alpha$ , proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1), proteína-4 ligadora de retinol (RBP-4), amiloide sérico A (SAA) e outras (FUKUHARA et al., 2005). São 24 adipocinas diferentes, já relatadas em relação à obesidade (FAIN, 2010), sendo que os níveis destas adipocinas são geralmente elevados em humanos obesos, e suas concentrações aumentam com o aumento da obesidade. Algumas destas substâncias têm seu perfil de atividade bem conhecido. O SAA é uma adipocina secretada pelos adipócitos, que pode ter atividade diretamente sobre os macrófagos para aumentar a produção de citocinas inflamatórias, tal como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, e resistina (LEHRKE et al., 2004). A maioria destas adipocinas são proteínas inflamatórias (assim como IL-8, PAI-1, MCP-1, IL-6,

IL-1Ra, TNF- $\alpha$  e IL-18) ( GORDON, 1998), enquanto que poucas como a proteína C reativa(PCR), haptoglobina e SAA são geralmente proteínas de fase aguda primariamente liberadas pelo fígado em resposta a inflamação leve associada com a obesidade (LEHRKE et al., 2004).

A obesidade está associada com baixos níveis de inflamação (CLEMENT; LANGIN, 2007), podendo ser vista como um processo inflamatório subcrônico (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). A resposta inflamatória na obesidade envolve componentes típicos da reação inflamatória, incluindo aumento sistêmico de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas, bem como proteínas de fase aguda, responsáveis pelo recrutamento e ativação de leucócitos e reparadoras de lesão tecidual (HOTAMISLIGIL, 2006).

Dados epidemiológicos que associam inflamação com obesidade datam da década de 50 e 60, quando estudos demonstraram aumento de proteínas de fase aguda na obesidade (FEARNLEY; VINCENT; CHAKRABARTI, 1959). Pesquisas realizadas nas últimas décadas identificaram vias que ligam o sistema imune e o sistema metabólico. Estudos realizados por HOTAMISLIGIL et al., 1995 e por KERN et al., 1995 demonstraram que o TNF- $\alpha$  tinha sua expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, sendo este aumento relacionado à resistência à insulina. Adicionalmente, estudos também demonstraram que elevados níveis de TNF- $\alpha$  são encontrados no músculo e tecido adiposo de humanos obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1995; KERN et al., 1995). Estudos que avaliaram a secreção de TNF- $\alpha$  pelos adipócitos também revelam correlação desta com o tamanho destas células secretoras: quanto maior os adipócitos, maior a secreção da citocina (YANG et al., 2004).

No tecido existem um processo inflamatório que é agravado pela migração de diferentes subtipos celulares, entre eles macrófagos, monócitos, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas, Natural Killer (NK), linfócitos TCD4 e TCD8. Destas células os macrófagos tem revelado importante papel no que diz respeito a inflamação que ocorre no tecido adiposo. Tanto TCD4, quanto TCD8 têm um papel importante na resposta imune contra diversos patógenos, sendo heterogêneas e dinâmicas, isto devido aos seus mecanismos de diferenciação, distribuição tecidual e resposta a diferentes estímulos. Os macrófagos polarizados são classificados em dois grupos M1 e M2, enquanto macrófagos M1 possuem atividade bactericida e

inflamatória, os M2 são imunomodulatórios e têm atividade pró- e anti- inflamatória respectivamente. (LEHRKE et al., 2004; YANG et al., 2006; SUN et al., 2012).

Tem sido sugerido que o acúmulo de macrófago ocorra em decorrência à hipertrofia destes adipócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias e que os levariam a processo de necrose por diferentes vias apoptóticas. Existem estruturas agregativas conhecidas como “crown-like structures” (CLS), que contêm até 15 macrófagos agregados em torno de adipócitos que sofreram necrose (CINTI et al., 2005). Acredita-se também que este recrutamento possa ser dependente de uma produção de quimiocinas, como a MCP-1, a proteína quimioatrativa de monócitos-2 (MCP-2) e a substância regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais regulada na ação (RANTES). Sendo que estas ativariam ação citolítica de outras células como linfócito TCD8 por sinalização de citocinas como TNF- $\alpha$  (KANDA et al., 2006; WEINSBERG et al., 2006).

A importância das substâncias quimioatrativas para a migração de macrófagos para o tecido adiposo pode ser observada em alguns estudos realizados com camundongos deficientes para estas quimiocinas ou para receptores MCP-1. Estes camundongos apresentam redução do recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo e melhora das alterações metabólicas quando submetidos à dieta hiperlipídica (KANDA et al., 2006; WEINSBERG et al., 2006).

Outra substância com papel crucial na obesidade e que vem sendo observada como ativadora do processo inflamatório e atuação sobre o sistema imune é a leptina (ALAM; LARBI, 2012). A leptina é um importante marcador da quantidade de tecido adiposo. O nome vem do grego *Leptos* que significa magro, é uma proteína de 167 aminoácidos, produto do gene *Ob*, que foi inicialmente clonado e sequenciado em camundongos e que se expressa principalmente no tecido adiposo branco (HALAAS et al, 1995). A maioria absoluta dos casos de obesidade em humanos está relacionada a um quadro de hiperleptinemia, o que denota o aumento do conteúdo total de gordura corporal, como também, provavelmente, uma resistência à leptina (CHEHAB; LIM; LU, 1996). A descoberta da produção da leptina pelos adipócitos marcou a primeira indicação de que o tecido adiposo também funciona como um órgão endócrino que se comunica com o SNC e com tecidos periféricos através da secreção de substâncias que regulam o apetite e o metabolismo (KERSHAW; FLIER, 2004).

Dentre as diversas funções já descritas da leptina, destaca-se sua ação em núcleos hipotalâmicos onde modula a ingestão alimentar, bem como, o gasto energético. Sua atividade ocorre primariamente no ARQ onde estimula neurônios anorexígenos e inibe os orexígenos. Adicionalmente ela eleva a atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e a termogênese favorecendo o aumento do gasto energético (CAMPFIELD et al., 1995; MATOS; MOREIRA; GUEDES, 2003; SCHUWARTZ et al., 1996). Evidências sugerem que a leptina promove a oxidação de TAGs do tecido adiposo e reduz o acúmulo de gordura, inibindo a lipogênese e estimulando a lipólise (SEUFERT et al., 1999). Outro efeito da leptina é a ação direta e inibitória sobre a secreção de insulina (ZIMMET; BOYCKO; COLLIER, 1999; MUZUMDAR, R. et al., 2003).

A leptina pode ainda estar envolvida no processo inflamatório frequente na obesidade, através de efeito endócrino para aumentar a produção de citocinas dos monócitos no sangue (MARGALET et al., 2003). Portanto, um ciclo contínuo ligando adipócitos e monócitos podem estimular e perpetuar o estado pró-inflamatório associado à obesidade (ALAM; NG; LARBI, 2012).

Existem evidências de um papel modulador da leptina sobre o sistema imune, atuando no equilíbrio e consequente aumento da produção de citocinas de perfil pró-inflamatório, mostrando um papel relevante da leptina na resposta inflamatória (BUSSO et al., 2002). Outros estudos comprovam o aumento da transcrição e da tradução do gene da leptina por estímulos inflamatórios, como o lipopolissacarídeo (LPS), IL-1 $\beta$  e IL-6 (LANDMAN et al., 2003).

O tecido adiposo também contribui produzindo substâncias com atividade anti-inflamatória como a adiponectina, IL-10 e cortisol. No entanto em situações relacionadas ao aumento da adiposidade, o que se observa é um desequilíbrio entre a produção de fatores pró e anti-inflamatórios, que contribuiriam para a manutenção de um nível moderado de inflamação sistêmica (SUGANAMI; OGAWA, 2010; TOMLINSON et al., 2004).

### 1.3 PÂNCREAS ENDÓCRINO: ILHOTAS PANCREÁTICAS

O controle glicêmico é de suma importância para manutenção da homeostase corporal, sendo que a insulina e sua secreção pelo pâncreas são os principais determinantes para que esta situação se estabeleça. O pâncreas é composto por

dois tipos principais de tecidos, os ácinos que secretam o suco pancreático no duodeno, correspondendo à porção exócrina do órgão, enquanto a porção endócrina é representada pelas Ilhotas de Langherans. As ilhotas são constituídas por 4 tipos celulares: células  $\alpha$  (20 a 25%) que secretam glucagon, as células  $\beta$  (60 a 70%), que secretam a insulina e amilina, as células  $\delta$  (10%) que secretam a somatostatina e as células PP ou F secretando polipeptídio pancreático. Estas estruturas se organizam em torno de pequenos capilares, secretando insulina e glucagon diretamente no sangue. A vascularização destas estruturas acontece através de pequenas arteríolas que penetram na porção central e se ramificam em pequenos capilares que convergem em vênulas levando o sangue às células vizinhas (ação parácrina da insulina nas células  $\alpha$ ,  $\delta$  e PP) (ASHCROFT, 2012; HALL, 2011).

As células  $\beta$  são consideradas importantes por serem responsáveis pela secreção de insulina. A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido, sendo essencial para a manutenção da homeostase de glicose, do crescimento e da diferenciação celular. O hormônio insulina foi descoberto em 1922 por Banting e Best. Estudos moleculares posteriores demonstraram que a estrutura proteica da insulina é constituída de 2 cadeias peptídicas retas (cadeias A e B). A cadeia A contém 21 aminoácidos, enquanto a cadeia B contém 30 aminoácidos, as respectivas cadeias estão unidas por 2 pontes de dissulfeto. Esse hormônio é secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose, proteínas e lipídios após as refeições. A insulina ativa é formada nas células  $\beta$  a partir da pró-insulina. Durante a conversão da pró-insulina em insulina, as enzimas na célula  $\beta$  efetuam a clivagem da pró-insulina em locais específicos da molécula, formando duas substâncias distintas que são denominadas como: insulina ativa e peptídeo C (GUVEN; KUENZI; MATFIN, 2004). A insulina regula a homeostase glicêmica em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a sua captação periférica, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Tem também importante papel no estímulo da lipogênese no fígado e nos adipócitos e na redução da lipólise, bem como aumentando a síntese e inibindo a degradação proteica (CARVALHEIRA; ZECCCHIN; SAAD, 2002).

A glicose é o principal estimulador da secreção de insulina. O seu transporte para o interior da célula  $\beta$  acontece através de uma proteína integral de membrana, denominada transportador de glicose tipo 2 (GLUT2), que permite a rápida difusão

da glicose proporcional a sua elevação plasmática. Após entrar na célula  $\beta$ , a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) por duas enzimas: a hexoquinase IV (glicoquinase) de baixa afinidade e a hexoquinase I de alta afinidade (MATSCHINSKY, 1996). Entretanto, a hexoquinase I é fortemente inibida pela G-6-P e, em menor grau, pela frutose-1-6-difosfato, o que transfere para a glicoquinase o papel preponderante na fosforilação da glicose nas células  $\beta$ . Esse mecanismo funciona de forma a permitir a formação de G-6-P, em concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas de glicose no sangue (BOSCHERO, 1996; MALAISSE, 1992).

A exocitose dos grânulos de insulina requer um aumento do cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) intracelular, em situações onde há aumento dos níveis séricos de glicose. Estes íons entram nas células  $\beta$  pelos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem dependente. A abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem dependente está relacionada com oscilações do potencial de membrana das células  $\beta$  pancreáticas, o qual é intimamente regulado pelos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ ) destas células. Os canais de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$  exercem um papel central na secreção de insulina por acoplar o metabolismo celular a oscilações do potencial da membrana. Quando os níveis plasmáticos de glicose estão em torno de 5,6 mM indicando um estado pré-prandial ou jejum, os canais de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$  estão abertos, permitindo o efluxo de  $\text{K}^{+}$ . A constante saída de cargas positivas mantém a membrana hiperpolarizada o que impede a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem dependente e conseqüentemente evita a secreção de insulina (ASHCROFT, 2012; HALL, 2011).

Durante os períodos pós-prandiais ocorre elevação da glicemia plasmática, há subsequente aumento da captação de glicose pelas células  $\beta$  e posterior metabolismo da mesma pelas vias glicolíticas e mitocondriais. O metabolismo oxidativo da glicose pela célula  $\beta$  promove aumento na razão ATP/ADP. O aumento do ATP promove o fechamento dos canais de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ , impedindo o efluxo de  $\text{K}^{+}$  e promovendo oscilações da atividade elétrica que induzem à despolarização da membrana e abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem dependente (ASHCROFT; KRORSMAN, 2012).

Adicionalmente, a estimulação das células  $\beta$  pela glicose também promove à ativação de isoformas da enzima fosfolipase C (PLC), que promove a hidrólise de fosfolípidos de membrana, gerando inositol 1-4-5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $\text{IP}_3$  ativa os canais de  $\text{Ca}^{+2}$  localizados na membrana do retículo endoplasmático, e esta ação leva à saída de  $\text{Ca}^{+2}$  da organela e aumento da

concentração desse íon no citossol. O DAG, por sua vez, também produz o mesmo efeito sobre a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, ao ativar os canais de  $\text{Ca}^{+2}$  sensíveis à voltagem da membrana plasmática, permitindo a passagem do cátion do meio extracelular para o intracelular (BEST; DUNLOP; MAILASSE, 1984). O DAG também ativa a proteína quinase C (PKC), e esta ativa proteínas dos grânulos secretórios de insulina que, juntamente com o  $\text{Ca}^{+2}$ , promoverão a reorganização do citoesqueleto da célula  $\beta$ , responsável pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e consequente exocitose dos grânulos de insulina. Finalmente, outros nutrientes podem ser estimuladores da secreção de insulina, tais como, lipídeos e proteínas (PERSAUD; JONES; HOWELL, 1992).

A secreção estimulada pelos nutrientes é modulada pela ação de diversos hormônios e neurotransmissores, que ajustam os níveis de insulina de acordo com as necessidades fisiológicas. Dentre os diversos moduladores destacam-se os hormônios incretínicos gastrointestinais e o sistema nervoso autônomo (SNA). O trato gastrointestinal libera diversos hormônios com ação sobre o pâncreas endócrino, sendo GIP e GLP-1 os de ação mais potente. Estes hormônios são liberados por células endócrinas intestinais após a ingestão de alimentos e via corrente sanguínea estimulam a secreção de insulina pelas células  $\beta$ . O efeito incretina explica a significativa resposta secretória das células  $\beta$  ao aumento modesto da glicemia após a refeição em indivíduos não diabéticos. (ASHCROFT; RORSMAN, 2012).

As ilhotas pancreáticas são densamente inervadas pelo SNA simpático e parassimpático, que também exerce papel importante, tanto com ação dos neurotransmissores e como dos neuropeptídeos. A ativação do nervo vago, componente do SNA parassimpático, potencializa a secreção de insulina estimulada por glicose, via acetilcolina (Ach). Os efeitos insulíntrópicos colinérgicos dependem da ligação da Ach com receptores muscarínicos, especialmente o subtipo 3 (M3). De maneira geral, à ação simpática exerce efeitos inibitórios sobre a secreção de insulina através da ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, promovidos pela ligação das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina (DAS; ROBINSON; PAULOSE, 2006).



### 1.3.1 A Sinalização da insulina

A insulina tem ação em vários tecidos periféricos, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, lipólise e proteólise, entre outros. A captação da glicose em tecidos insulino dependentes como músculo e o tecido adiposo depende da translocação do transportador de glicose subtipo 4 (GLUT4) para a membrana celular. Estas proteínas são os principais responsáveis pela captação da glicose circulante nos humanos sendo fundamentais para a manutenção do controle glicêmico (CZECH; CORVERA, 1999).

Para que as ações fisiológicas da insulina sejam executadas é necessária a ligação deste hormônio a um receptor de membrana presente nos diversos tecidos, com subsequente acionamento de vias intracelulares de sinalização. A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina (IR). Uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . Este receptor atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade  $\alpha$  inibe a atividade tirosina quinase da subunidade  $\beta$ , sendo que a ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase, levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (PATTI; KAHN, 1998).

A insulina após ligar-se a seus receptores promove a fosforilação de outras proteínas com função de substrato. Sabe-se da existência de 10 substratos para o receptor de insulina, já identificados, sendo quatro deles estruturalmente relacionados, chamados de proteínas-substrato do receptor de insulina (IRS) (SAAD et al. 1996). Cada proteína-substrato contém um domínio de homologia *pleckstrin*, um domínio de ligação da proteína tirosina e numerosos resíduos de tirosina que sofrem fosforilação pelo receptor de tirosina quinase. As proteínas IRS variam no que tange à distribuição em tecidos e localização subcelular (KABURAGI et al., 2001). Outros substratos para o receptor da insulina incluem Shc (oncogene produto do sarcoma como o colágeno), Gab-1 (proteína de ligação 1 associada ao GRB2), p60<sup>dok</sup>, Grb2 (fator de crescimento ligado ao receptor 2), Cbl (proteína adaptadora

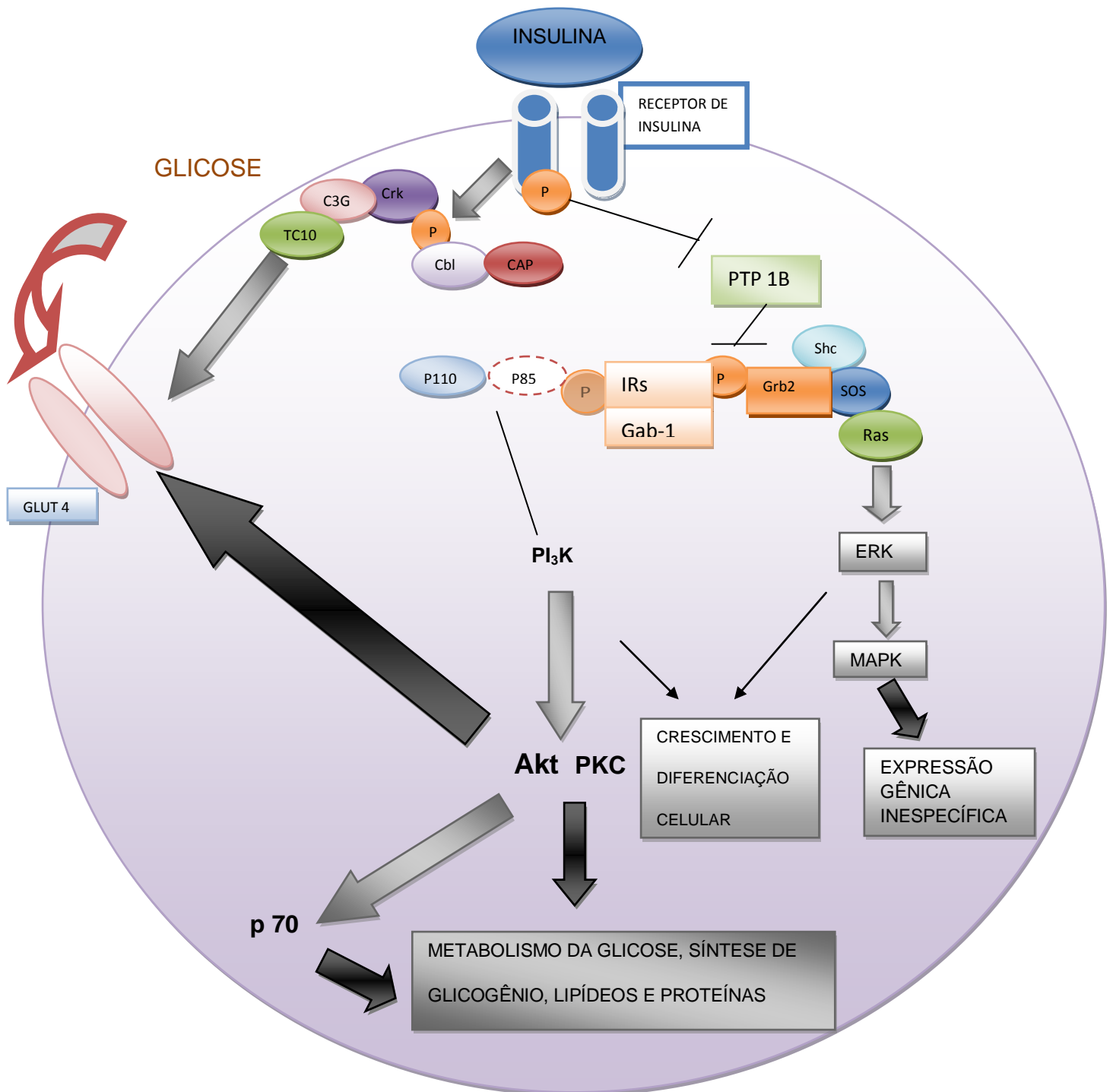
Cas-Br-murino) e JAK2 (Janus Kinase 2) (PESSIN; SALTIEL, 2000). O primeiro substrato proteico intracelular da insulina descrito recebeu o nome de substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1 com 1235 aminoácidos (SUN et al., 1997). Posteriormente, foi observado outra proteína de 190 kDa, identificada como IRS-2, que é rapidamente fosforilada nos grupos tirosina em resposta à insulina (CHEATHAM; KAHN, 1995). As proteínas IRS-1/2 desempenham função essencial na transmissão do sinal insulínico e a fosforilação desses substratos permite a interação com diversas proteínas adaptadoras ou com atividade enzimática, caracterizando o efeito pleiotrópico da insulina (AQUINO, 2009).

Após serem fosforilados, esses substratos agem como moléculas ancoradoras para proteínas que contêm domínios de homologia com Src, tornando-as ativadas ou associando-se a outras moléculas de sinalização, e ligando uma complexa cascata de eventos. Um exemplo de associação é com a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que é uma enzima que contém dois sítios SH2 e um SH3 e é a mais bem estudada molécula sinalizadora ativada pelo IRS-1. É uma serina/treonina quinase e tem um papel importante em muitos processos celulares, incluindo proliferação celular e captação de glicose (RUDERMAN et al., 1990). A PI3K é a única molécula intracelular inequivocamente considerada essencial para o transporte de glicose (CZECH; CORVERA, 1999).

As proteínas-alvo conhecidas dessa enzima são quinase serina-treonina (Akt) e as isoformas atípicas da proteína quinase C (PKC) ( $\zeta$  e  $\lambda$ ). A Akt é uma serina-quinase também envolvida na mobilização do transportador de glicose GLUT4 para a superfície celular e transporte de glicose (BROZINICK; Jr. ROBERTS; DOHM, 2003).

Além da ativação da PI3K outros sinais também são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose, como uma segunda via que envolve a fosforilação do proto-oncogene Cbl. Na maioria dos tecidos sensíveis à insulina, Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP. Após ativado, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína CrkII, que também está constitutivamente associada com a proteína C3G (RIBON; SALTIEL, 1997). A C3G é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, que é uma pequena GTPase ativando-a. Uma vez ativada, TC10 causa um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT4, em paralelo à ativação da via da PI3K (CHIANG et al., 2001). Existe ainda outra via, onde a

insulina estimula a *mitogen-activated protein* (MAP) quinase. Essa via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares (BOULTON et al., 1991). As diversas rotas de sinalização descritas acima estão representadas na Figura 1.



**Figura 1- Representação esquemática das vias de sinalização da insulina no tecido muscular e adiposo.**

O IR é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação estas se ligam a outras moléculas de sinalização através de domínios SH2, resultando na ativação de vias como a da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídios e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (Adaptado de BOULTON et al., 1991 ; BROZINICK; Jr. ROBERTS; DOHM, 2003).

### 1.3.2. Inflamação, resistência à insulina e célula $\beta$

Os dois fatores mais importantes para evitar a instalação definitiva do DM2 são preservar a sensibilidade a insulina e manter a massa de células  $\beta$ , sendo que no processo inflamatório ambos os fatores são prejudicados (EMANUELLI et al., 2001).

A resistência à insulina (RI) é uma condição, genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células. Em consequência da hiperglicemia decorrente da menor captação da glicose, as células  $\beta$  pancreáticas aumentam a produção e secreção de insulina, aumentando dessa forma a concentração circulante desse hormônio. Assim, a RI é acompanhada de hiperinsulinemia (CZECH; CORVERA, 1999). A capacidade das ilhotas pancreáticas em responder a elevações na concentração plasmática de glicose com aumento na secreção de insulina é o evento principal na preservação da homeostase glicêmica. Ela depende de uma fina regulação na maquinaria secretória das células. A secreção é ajustada continuamente, de acordo com as flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, em especial, a glicose (HIRABARA et al., 2006).

A RI causada pela inflamação se dá graças à inibição da sinalização abaixo do IR. A fosforilação inibitória do IRS-1 em serina pode ocorrer após a exposição de células ao TNF- $\alpha$  ou a altos níveis de AGL (AGUIRRE et al., 2000). Esta fosforilação do IRS-1 em serina reduz sua fosforilação em tirosina em resposta à insulina e sua capacidade de se associar com o IR, bloqueando sua sinalização e ação (AGUIRRE et al., 2002). A ativação das quinases JNK e IKK $\beta$  na obesidade ressalta a interligação entre as vias imunes e metabólicas, pois estas são as mesmas quinases que são ativadas na resposta imune inata pelos Toll-like receptors (TLRs) após sua ligação com o LPS, peptídeo glicano e outros produtos microbianos (MEDZHITOV, 2001).

Além da ativação das serina/treonina quinases, outras vias contribuem para a resistência à insulina induzida pela inflamação. Três membros da família da SOCS (supressor da sinalização de citocina), incluindo a SOCS-1, SOCS-3 e SOCS-6 foram implicadas na supressão da sinalização da insulina mediada por citocinas (EMANUELLI et al., 2001). Essas moléculas parecem inibir a sinalização da insulina interferindo com a fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2 ou através do

direcionamento do IRS-1 e do IRS-2 para degradação proteossômica (RUI et al., 2002). A SOCS-3 também apresenta um papel na regulação da ação central da leptina. Camundongos heterozigotos SOCS3<sup>+/-</sup> e camundongos com deficiência neuronal da SOCS-3 mostram proteção contra a obesidade e RI induzidas por dieta hiperlipídica (HOWARD et al., 2004).

Na obesidade o processo inflamatório crônico leva também em algumas situações ao comprometimento da ação secretória das ilhotas de Langherans, principalmente no que diz respeito à secreção de insulina pela célula  $\beta$ . Este processo deve estar atrelado à hiperglicemia, levando ao estresse oxidativo e também com deposição de amiloide sérico A (DONATH et al., 2005).

Existem também evidências de que algumas citocinas podem ter ação destrutiva sobre as células  $\beta$  pancreáticas, sendo produzidas e secretadas por elas. Dentre elas, podemos destacar a IL-1 $\beta$ , um polipeptídeo de 17 KD, que dependendo da sua concentração produz disfunção destas células, podendo agir sozinha ou associada ao TNF- $\alpha$  ou ao interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) em ilhotas de ratos (POULSEN, 1996). No entanto, as ilhotas humanas são menos sensíveis a estes efeitos, mas a exposição destas ilhotas em cultura durante vários dias na presença de IL-1 $\beta$  + TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  também induzem a alterações funcionais na célula  $\beta$  (DONATH et al., 2005).

Os radicais livres de oxigênio têm sido sugeridos como mediadores da ação tóxica de IL-1 $\beta$  ou citocinas conjugadas em células  $\beta$  pancreáticas levando a lise celular, no entanto o principal mecanismo envolvido com a destruição das células  $\beta$  e que levam à resistência à insulina, provocado pelas citocinas, principalmente IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , é através da produção de Óxido Nítrico (ON). O ON é um radical livre com diversas funções biológicas, como vasodilatador, neurotransmissor, antimicrobiano e anti-tumorais (DELANEYA et al., 1993). O ON é gerado a partir de uma reação de conversão de L-arginina em L-citrulina, que é catalisada por uma isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Há necessidade de sempre nova síntese de iNOS quando estimulada por citocinas e LPS. Alguns efeitos nocivos mais importantes do ON nas ilhotas são bem conhecidos, um deles é a inibição da enzima mitocondrial aconitase, levando ao decréscimo do metabolismo oxidativo, da geração de ATP e conseqüente diminuição na secreção de insulina. Outro efeito seria a indução de dano no DNA nuclear. O ON no RE causa diminuição nas concentrações de cálcio e inibição da síntese de proteínas chaperonas, o que

dificulta os mecanismos de defesa da célula  $\beta$  e amplifica as vias pró-apoptóticas (EIZIRICK et al., 1993, CNOP et al., 2005).

O processo inflamatório nas ilhotas pode ser evidenciado pelo aumento significativo de IL-1 $\beta$  produzida e secretada por macrófagos locais, bem como pelo número crescente de receptores para IL-1 $\beta$  (IL-1RA) na célula  $\beta$ , e o aumento da sua expressão. A produção desta citocina por estes macrófagos é estimulada tanto por adipócitos em hipertrofia, como pela própria célula  $\beta$ , induzida por quantidades excessivas e acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de glicose no seu interior. Este acúmulo pode levar ao estresse oxidativo, apoptose e um processo autoinflamatório local, o que daria origem a uma grande quantidade de antígenos, responsáveis pelo recrutamento de macrófagos às ilhotas (KOLB; MANDRUP-POULSEN, 2005; LARSEN et al., 2007).

Há também evidências que a IL-1 $\beta$  tem função de auto estímulo sobre sua ativação. A ativação acontece via receptores IL-1RA e também na produção de outras citocinas dependentes de IL-1 $\beta$ , como IL-6 e TNF- $\alpha$ , levando a apoptose de células  $\beta$  (LARSEN et al., 2007).

Citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  agem através de mecanismos semelhantes. Sendo assim, ambas as citocinas, após se ligarem ao seu receptor específico de membrana (IL-1R e TNFR, respectivamente), fosforilam um complexo com atividade quinase denominado complexo Quinase no NF- $\kappa$ B (IKK). Este por sua vez, fosforila uma proteína denominada I $\kappa$ B que se encontra ligada ao fator de transcrição NF $\kappa$ B. Enquanto ligados, o NF $\kappa$ B permanece inativo no citosol das células  $\beta$ , mas quando a I $\kappa$ B é fosforilada pelo complexo IKK esta ligação se desfaz, permitindo a ativação do NF $\kappa$ B. Uma vez livre no citosol, o NF $\kappa$ B pode agora migrar para o núcleo celular e regular a expressão de genes apoptóticos como Bax, Fas, c-myc e iNOS (ORTIS et al., 2012). Já o IFN- $\gamma$ , ao se ligar ao seu receptor (IFN- $\gamma$  R1), induz a fosforilação de outras quinases, como JAK 1 e 2, que por sua vez induzem a ativação de NF $\kappa$ B, além de também induzirem a ativação do fator de transcrição STAT-1, que regula a expressão de outros genes envolvidos no mecanismo apoptótico como o Bcl-2, Pdx1 e MafA (WANG; GUAN; YANG, 2010).

Aliado a isso, apesar de uma citocina conseguir, isoladamente, alterar a função das células  $\beta$ , muitos estudos apontam que uma combinação de citocinas exibe efeitos nocivos ainda maiores sobre estas células. Estudo recente demonstrou que os níveis de apoptose celular pela via JAK/STAT causados pelo IFN- $\gamma$

adicionado à cultura de células  $\beta$ , foi maior quando em combinação com o TNF- $\alpha$ , mesmo o TNF- $\alpha$  não possuindo capacidade de ativar de forma isolada a via JAK/STAT (BARTHSON et al., 2011). Outras pesquisas demonstraram que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando adicionados em conjunto à cultura de células  $\beta$  de ratos, conseguem ativar uma importante via apoptótica denominada via p53/p21, o que não acontece se estas citocinas forem adicionadas à cultura separadamente (WANG; GUAN; YANG, 2010).

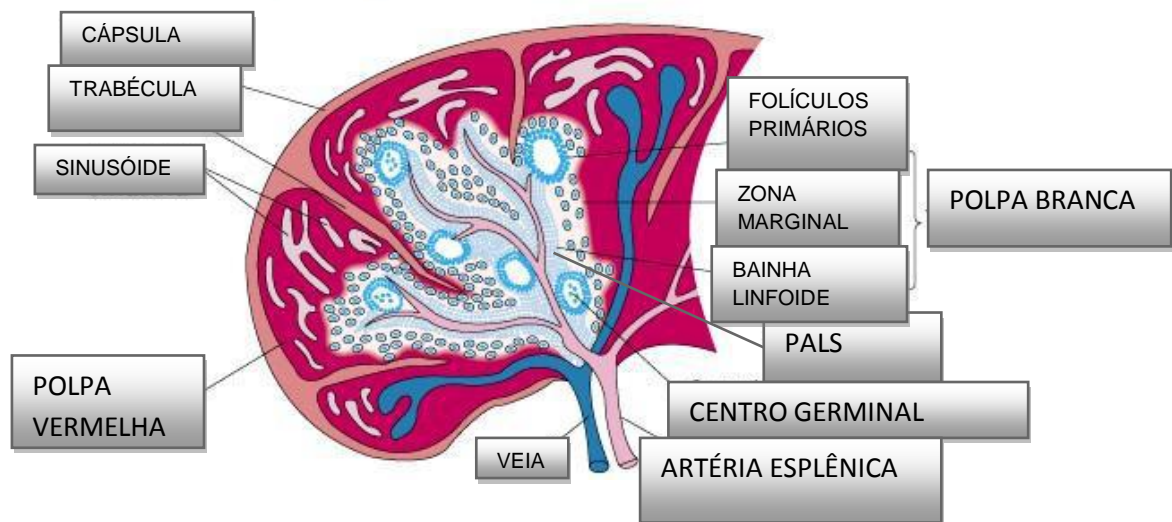
No entanto, na maioria dos experimentos não se pode relacionar este aumento de IL-1 $\beta$  ou outra citocina local ao aumento de seus valores séricos, já que se trata de um pequeno volume quando comparados ao sangue total do indivíduo e outras situações de processo inflamatório podem elevar tais valores. Estabeleceu-se ainda uma importante relação com o processo inflamatório das ilhotas, diminuição da secreção de insulina e uma diminuição na atividade anti-inflamatória local. Todos estes processos levam a uma conseqüente diminuição da secreção de insulina e a um possível quadro de pré-diabetes e DM (DINARELLO, 2000).

Alguns estudos, no entanto, mostram-se contrários aos anteriores e utilizam a dosagem sérica das citocinas e outras substâncias diretamente ligadas ao processo inflamatório como PCR e SAA para avaliação de RI e DM. Segundo os autores foi verificado aumento significativo destas substâncias em pacientes que eram obesos e desenvolveram RI e DM, relacionando os valores encontrados no soro a estes processos (LARSEN et al., 2007).

#### 1.4 O BAÇO E SUA RELAÇÃO COM O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O baço é um órgão ovoide grande, situado na parte alta da cavidade abdominal esquerda. Especializado em filtrar sangue e prender antígenos presentes no sangue, podendo responder as infecções sistêmicas. Os antígenos e os linfócitos presentes no sangue são carregados para o baço através da artéria esplênica (MEBIUS; KRAAL, 2005). O baço é o maior órgão linfoide secundário em humanos, tendo um papel crucial na resposta imunológica inata contra invasão bacteriana tanto em humanos como em roedores (BOHNSACK; BROWN, 1986). A organização morfológica geral do baço está representada no esquema da figura 2.





**Figura 2. Esquema morfológico e funcional do baço.**

O baço é circundado por uma cápsula que estende inúmeras projeções (trabéculas) para o interior formando uma estrutura compartimentalizada, sendo que os compartimentos são de dois tipos: polpa vermelha e polpa branca, que estão separadas por uma zona marginal difusa. A polpa vermelha esplênica consiste de uma rede de sinusóides com uma população de macrófagos e numerosos eritrócitos; sendo que estes últimos quando velhos ou defeituosos são destruídos neste local e removidos pelos macrófagos. A polpa branca circunda ramos da artéria esplênica, formando a bainha linfóide periarteolar (PALS) habitada principalmente por linfócitos T. A zona marginal localizada perifericamente à PALS é rica em células B organizadas nos folículos linfóides primários (Adaptado de STEINIGER; BARTH, 2000).

O baço contém mais de 15% dos macrófagos de todo o organismo, fixados a ele, bem como um número substancial de linfócitos T (LT) e células Natural Killer (NK), sendo que estas células produzem várias citocinas durante estados críticos (GIROIR et al., 1992).

Há uma importante relação entre o tipo de citocinas produzidas pelo baço e a recirculação dos linfócitos TCD4 ou T helper (Th), bem como a diferenciação de seus subgrupos Th1 e Th2. Linfócitos Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de células

precursoras virgens e vários fatores contribuem para esta diferenciação como, por exemplo, o tipo de célula apresentadora de antígeno, a natureza dos sinais co-estimulatórios, via e dose de administração do antígeno e presença de citocinas. Dentre estes sinais polarizadores para Th1 ou Th2, a contribuição do ambiente de citocinas é considerado um fator crucial (GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004). Apesar da caracterização mais recente de outras subpopulações celulares tais como Th17 e T reguladoras, a contribuição fundamental das subpopulações Th1 e Th2 para a resposta imune dos tipos celular e humoral, respectivamente, continua sendo um dos paradigmas da imunologia (ROMAGNANI, 2005).

Os linfócitos de perfil Th2 tem papel anti-inflamatório sobre células  $\beta$  pancreáticas, pela liberação de IL 4, 5 e 10, cuja ação é antagônica a outras citocinas, como o TNF $\alpha$  e a IL6, atuantes nos linfócitos T não diferenciados (Th0), suprimindo desta forma sua diferenciação em Th1. Os linfócitos de perfil Th1, promovem através da liberação de citocinas pro-inflamatórias como Interleucina 2 (IL2) e TNF $\beta$  a ativação de macrófagos, os quais atuam na resposta imune celular (ABBAS; LICHTMAN; 2005; ROITT, et al., 2001; ROMAGNANI, 2005).

Em indivíduos magros e em ausência de diabetes, de modo geral há uma tentativa de equilíbrio entre os dois tipos de perfis de citocinas oriundas dos perfis Th1 e Th2, no entanto em situações de DM e obesidade há uma modificação neste perfil que se desvia para um aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição das citocinas anti-inflamatórias. Estudos realizados em ratos obesos mostraram um aumento de citocinas pro-inflamatórias, tal como IL-6 e TNF- $\alpha$  no baço. Em contraste, IL-10 que é uma potente citocina anti-inflamatória e que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias tem sua síntese diminuída. Ela é sintetizada por diversos tipos celulares em múltiplos órgãos, incluindo o baço. Grandes quantidades de IL-10 são produzidas por células B ativadas, que sofrem maturação na zona marginal do baço (PESTKA et al., 2004). No entanto novas evidências mostram que a IL-10, produzida pelas células B, tem importante papel na regulação da supressão da resposta imune. Baixos níveis de produção de IL-10 têm sido demonstrados na obesidade. Baseado nestes fatos, uma hipótese é levantada, onde presume-se o fato de a obesidade estar ligada a supressão da síntese de IL-10, resultando em processo inflamatório e RI (GOTOH et al., 2012<sup>a</sup>).

Em trabalho realizado por Carvalho em 2012 foi feita a retirada do baço (esplenectomia) em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica

obtendo os seguintes resultados: nos camundongos obesos esplenectomizados, houve grande aumento na sensibilidade à insulina, refletida por redução na glicemia, insulinemia e TNF- $\alpha$  circulante quando comparado com camundongos obesos não operados. A inflamação estava reduzida no fígado, músculo e tecido adiposo dos animais esplenectomizados, e como consequência, a via de sinalização de insulina estava mais ativa em comparação aos camundongos obesos que tiveram os baços mantidos. Também houve redução na infiltração de macrófagos, no fígado e no tecido adiposo após a esplenectomia em animais obesos (CARVALHO, 2012). Outros pesquisadores, no entanto que realizaram esplenectomia em animais controle, sem obesidade induzida, e posteriormente a esplenectomia aplicaram dieta rica em gorduras. Houve instalação de um quadro de obesidade e resistência à insulina nos animais operados, quando comparados aos não operados. Tais resultados foram justificados pelos autores pela deficiência de IL-10 nestes animais, resultante da retirada do baço, o que gera um processo de inflamação hipotalâmica e sistêmica (GOTOH et al., 2012<sup>b</sup>).

### 1.5 O MODELO DE OBESIDADE MSG

Em decorrência do grande impacto da obesidade na saúde dos seres humanos, modelos experimentais animais de obesidade têm sido desenvolvidos com o objetivo de possibilitar maior conhecimento sobre essa doença, bem como sobre as formas de tratá-la. Um dos modelos que usa animais de experimentação, é a lesão hipotalâmica, desenvolvido por Olney em 1969. Este modelo tem sido descrito por mimetizar, pelo menos em parte, a situação clínica de síndrome metabólica rotulada como obesidade neuroendócrina. Assim, em ratos, essa obesidade pode ser conseguida por meio da administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG), um aminoácido neuroexcitatório que em doses elevadas é lesivo ao SNC (MACHO et al., 2000; CUNHA et al., 2010). Já foi demonstrado que a administração subcutânea dessa substância em ratos no período neonatal, quando a barreira hematoencefálica não está totalmente desenvolvida, resulta em uma degeneração aguda do ARQ que leva, além da obesidade, à disfunção sexual, parada no crescimento, déficit comportamental em roedores e alterações no controle cardiovascular (HIRATA et al., 1997). As doses de MSG que levam ao desenvolvimento de obesidade visceral variam de 2 a 4 g/Kg de peso do rato e

podem ser administradas de 4 a 10 doses nos primeiros dias de vida (GRASSIOLLI et al, 2006; VOLTERA et al., 2008).

Há evidências também de que os animais obesos deste modelo experimental desenvolvem maior deposição de tecido adiposo na região central, possivelmente em virtude de hipercorticosteronemia. Entretanto, as diferentes anormalidades endócrinas dos ratos tratados com MSG acabam por determinar certo grau de aumento da eficiência metabólica e deficiência na ingestão alimentar (hipofagia), induzida pela toxicidade do MSG. Estas alterações fazem com que, diferentemente de outros modelos experimentais de obesidade, esses ratos não apresentem hiperfagia e, deste modo, mantenham o peso dentro da normalidade apesar do acúmulo de gordura visceral (LORDEN; CAUDLE, 1986).

As lesões geradas pelo MSG produzem a denominada obesidade hipotalâmica por meio de diversas alterações metabólicas, como hiperinsulinemia e prejuízo da termogênese (CUNHA et al., 2011; KRONGRAD et al. 1992). Além disso, sabe-se bem que a hiperinsulinemia pode induzir RI em modelos experimentais de obesidade (LE MARCHAND; FREYCHET; JEANRENAUD, 1978.). Embora os primeiros estudos indicassem em testes de tolerância oral à glicose, que ratos MSG-obesos não eram resistentes à insulina (CAMERON; CUTBUSH; OPAT, 1978), em estudos mais recentes observou-se que animais MSG apresentaram RI. A RI é observada como uma disfunção do IR, assim como na transdução de sinal interno, observando-se um esforço extremo da célula  $\beta$  destes animais em produzir níveis cada vez maiores de insulina para tentar manter a normoglicemia, sendo que esta hiperatividade pode culminar em estresse oxidativo e perda de função celular (GRASSIOLLI et al., 2006; MACHO et al., 2000; MIRANDA et al, 2012). Também foi constatado que este modelo experimental de obesidade mostrava-se com um número de transportadores de glicose (GLUT4) diminuídos no músculo esquelético (MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993).

Há também importante relação entre a diminuída atividade simpática neste modelo e a diminuição da termogênese na gordura marrom interescapular, com menor gasto de energia e depósito em forma de gordura no tecido adiposo branco, o que levaria a um aumento de tamanho destes adipócitos, caracterizando obesidade hipertrófica (KOZAK; ANUCIADO-KOZA, 2008).

No modelo MSG existem evidências também de um processo de inflamação observado na obesidade, bem como suas consequências. Em alguns estudos ratos

tratados com MSG mostraram aumento da expressão de RNAm para TNF $\alpha$ , IL-6, resistina e leptina, além do aumento dos níveis plasmáticos de insulina, resistina e leptina. No entanto os níveis plasmáticos de TNF $\alpha$  e de IL-6 não foram afetados na mesma magnitude da expressão dos seus genes. Foi verificada também uma relação direta entre a elevação de TNF $\alpha$  e hiperinsulinemia neste estudo. Outra relação importante entre o modelo MSG e o processo inflamatório é a presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo dos animais deste modelo. Em relação às análises histológicas do pâncreas, não se observam alterações compatíveis com processo inflamatório local (RAMOS, 2010).

Até o momento não há estudos relacionando esplenectomia e modelo de obesidade induzida por MSG. Considerando que há presença de processo inflamatório também neste modelo de obesidade, vale avaliar o papel do baço neste processo, bem como instigar a futuros tratamentos que atrelem obesidade hipotalâmica e processo inflamatório.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a participação do baço na instalação das complicações metabólicas promovidas pela obesidade-MSG.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Induzir a obesidade e a síndrome metabólica em ratos tratados neonatalmente com glutamato monossódico (MSG).
- b) Avaliar o papel do baço na resistência à insulina em ratos MSG-obesos.
- c) Investigar o perfil secretor de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos MSG obesos submetidos ou não a esplenectomia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos cedidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sendo que todos os procedimentos foram realizados com a aprovação do comitê de Ética em Pesquisa Animal da UEPG (Protocolo 03482-2012/ Processo CEUA 17).

Os animais receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de glutamato monossódico MSG (4g/Kg de peso corporal). Animais controles (CON) receberam salina equimolar. Os animais foram desmamados aos 21 dias, permanecendo em condições controladas de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante todo o período experimental. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

#### 3.2 ESPLENECTOMIA

Aos 60 dias de vida parte dos animais de ambos os grupos foram submetidos à retirada do baço (esplenectomia - ESPL). Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados intramuscularmente, com uma mistura (v:v) de xilazina 0,2 mg/g de peso de cada animal e cetamina 0,5 mg/g de peso de cada animal. Posteriormente os animais foram laparotomizados, o baço localizado e posteriormente os vasos esplênicos amarrados com fio cirúrgico verde de poliéster de 3x3 mm da marca PolySuture® e o baço retirado. A região do corte foi suturada com o mesmo tipo de fio cirúrgico utilizado para amarrar os vasos e os animais devolvidos ao biotério. Outro grupo sofreu o processo de falsa-cirurgia, sendo chamado falso operado (FO), onde o procedimento inicial da cirurgia foi o mesmo do grupo operado, no entanto após serem laparotomizados, os animais foram suturados sem a retirada do baço. Desta forma tivemos 6 grupos experimentais: Controle Não Operado (CON-NO); Controle Falso Operado (CON-FO), Controle Esplenectomizado (CON-ESPL), MSG Não Operado (MSG-NO); MSG Falso Operado (MSG-FO) e MSG Esplenectomizado (MSG-ESPL).

### 3.3 AVALIAÇÃO DO PESO E CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA

Após o desmame, aos 21 dias, os animais passaram a ser pesados com o intervalo de 2 dias, assim como o consumo de água e ração avaliado, até a esplenectomia. Aos 60 dias (após a esplenectomia) até o sacrifício, os animais passaram a ser avaliados diariamente, tanto quanto ao peso, como em relação ao consumo de água e ração, sendo que não houve pesagens aos sábados e domingos e foi feita correção matemática para o consumo diário nestes dias. Não houve diferença entre os grupos FO e NO e os demais experimentos foram realizados apenas com 4 grupos: CON-NO, CON-ESPL, MSG-NO e MSG-ESPL.

### 3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT):

Esta técnica expressa a sensibilidade à insulina de forma direta *in vivo*. Parte dos animais foi submetido ao teste do ITT, 1 dia antes do sacrifício, estando sob jejum de 12 horas, onde somente água foi oferecida. Os animais receberam uma dose intraperitoneal de insulina (1U/Kg) e coletas de sangue foram feitas pela veia caudal, nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a administração de insulina e a glicemia avaliada com glicosímetro Accu Check Active Roche<sup>®</sup>. A razão de queda da glicemia indica a sensibilidade periférica a insulina, avaliada estatisticamente pela constante  $K_{ITT}$ , que corresponde à queda da glicose expressa em % / minuto. A interpretação do  $K_{ITT}$  se baseia no fato de que quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível é o indivíduo à insulina. Quanto maior o  $K_{ITT}$  maior a sensibilidade à insulina. O cálculo é dá pela seguinte fórmula  $0,693/t_{1/2}$ , onde  $t_{1/2}$  é o tempo de meia vida em minutos (BONORA et al. 1987).

### 3.5 RETIRADA DE ÓRGÃOS E TECIDOS

Aos 90 dias e estando sob condição de jejum de 12 horas, onde somente água foi oferecida, animais de todos os grupos experimentais foram sacrificados por decaptação. Foi realizada a medida do comprimento naso-anal (CNA) em cm, e calculado o índice de Lee, que é obtido pela raiz cúbica da massa corporal (g) dividida pelo CNA (cm) (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). O pâncreas, o baço, o coração, o fígado, a glândula adrenal direita, o rim direito, bem como as gorduras



mesentérica, inguinal, perigonadal e marrom foram retirados, pesados e armazenados para posteriores procedimentos histológicos, conforme descrito abaixo.

### 3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após o sacrifício aos 90 dias de todos os grupos experimentais, o sangue total foi coletado em tubo de ensaio heparinizado, centrifugado em 3000 rpm por 15 minutos e o plasma separado para dosagens de glicose, triglicérides, colesterol total e insulina. As dosagens bioquímicas foram realizadas por métodos enzimáticos usando kits comerciais Gold Analisa<sup>®</sup> conforme instrução do fabricante e a insulina por RIE.

### 3.7 DETECÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA (PCR)

Com o plasma coletado dos animais sacrificados foi realizado o teste de aglutinação por látex usando kit comercial Labtest<sup>®</sup>, conforme instrução do fabricante para a técnica qualitativa, com sensibilidade de 6,0 mg/L. Foi observada também a possibilidade da presença dos efeitos de zona, sendo então realizados os testes com amostras puras e diluídas na proporção de 1:5. Não houve necessidade da realização da técnica semi-quantitativa, visto que em nenhuma amostra observou-se aglutinação.

### 3.8 HEMOGRAMA

O sangue dos animais sacrificados foi coletado imediatamente em tubo contendo EDTA, homogeneizado e posteriormente analisado em aparelho de Hematologia Cell Dyn Abott<sup>®</sup> do Laboratório Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foram analisados o número de leucócitos totais ( $\mu\text{L}$ ), granulócitos (% de leucócitos), linfócitos (% de leucócitos), bem como eritrócitos ( $/\mu\text{L}$ ), hematócrito (%) e hemoglobina (g/dL).

### 3.9 ISOLAMENTO DE ILHOTAS

Aos 90 dias os animais foram decapitados e em seguida submetidos à laparotomia para localização do ducto hepático comum, seguindo a técnica da colagenase (LACY; KOSTIANOVSKY, 1967; HARA et al., 1988). Foi realizada a oclusão da porção final do ducto pancreático para posterior perfusão do pâncreas através deste ducto. O volume de 8 mL de solução de Hanks (1,3mM CaCl<sub>2</sub>; 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>; 5,4 mM KCl, 0,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,3 mM NaHCO<sub>3</sub>; 137 mM NaCl; 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,6 mM C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) em pH 7,4 contendo colagenase tipo V a 1mg/mL, suplementado com 0,1% albumina bovina (fração V) foi injetado no ducto biliar dos animais. O pâncreas de cada grupo de ao menos 4 animais, contendo a solução, formou um *pool*, foi homogeneizado com vigor, lavado com a solução de Hanks e transferido para banho-maria a 37°C durante 15 minutos, e centrifugada. Com auxílio de lupa e pipeta as ilhotas foram coletadas manualmente e separadas em grupos de 4.

### 3.10 PRÉ-INCUBAÇÃO E INCUBAÇÃO DE ILHOTAS

Foram isolados grupos de 4 ilhotas e pré-incubadas por 60 minutos em solução de Krebs com pH de 7,4 contendo: 120mM NaCl; 4.8mM KCl; 2.5mM CaCl<sub>2</sub>; 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 24mM NaHCO<sub>3</sub>, e 5.6 mM de glicose. A incubação aconteceu em condições gasosas especiais, a 37° C contendo O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%) em incubadora SANYO North America Corporation. Depois deste período o líquido foi descartado e as ilhotas foram submetida a diferentes concentrações de glicose: 5,6; 8,3 e 16,7mM e incubadas por outros 60 minutos. Após esta incubação foi retirado 1mL de solução das placas e armazenadas em microtubos a -80° C até a dosagem de insulina por radioimunoensaio (RIE).

### 3.11 EFEITO DO BLOQUEADOR DA INOS SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA INDUZIDA POR GLICOSE

Foram isolados grupos de 4 ilhotas e pré-incubadas por 60 minutos em solução de Krebs com pH de 7,4. A incubação aconteceu nas mesmas condições da pré-incubação, sendo às ilhotas submetidas à incubação com 11,1 mM de glicose

foram adicionadas as diferentes concentrações de Nitro-metil-L-arginina (L-NAME) (2,5 mM; 5 mM e 10 mM. Após este período foi retirado 1mL de solução das placas e armazenadas em microtubos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a dosagem de insulina por RIE.

### 3.12 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após 90 dias, os animais foram sacrificados e foram retirados pâncreas, baço, bem como gordura marrom, mesentérica, inguinal e perigonadal. Estes tecidos foram posteriormente fixados em Alfac (85mL de Álcool 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5mL de ácido acético glacial) para análise histomorfológica. A fixação permaneceu por 16 horas, em seguida as peças eram transferidas para solução estoque (álcool 70%), sendo inclusas após isso em parafina (Paraffin Wax<sup>®</sup>) seguindo protocolo do Laboratório de Histologia da Instituição, onde se utilizou tratamento com álcool, desde 70% até absoluto e xilol. As peças foram seccionadas em micrótomo à 4 $\mu\text{m}$  de espessura, seguindo o padrão de corte seriado, descartando-se aproximadamente 20 cortes entre cada lâmina ( $\pm 80\mu\text{m}$ ).

Após 24 horas as lâminas já identificadas foram submetidas ao protocolo de coloração hematoxilina-eosina (HE) e foram fotografadas em diferentes ampliações, de acordo com as estruturas a serem avaliadas, em microscópio de campo claro (Olympus BX41) com captura digital das imagens (Software DP-Controller<sup>®</sup>). Para avaliação e mensuração das estruturas presentes nas imagens utilizou-se o software Pró Image-J<sup>®</sup>. Foram utilizadas de 4 a 5 animais por grupo, e 3 cortes de cada um destes, resultando em um número de 12 a 15 lâminas por grupo.

Avaliou-se a gordura mesentérica, perigonadal e inguinal pela área e número dos adipócitos (aumento de 200x). No pâncreas foi avaliado o número total e o tamanho das ilhotas por corte, com aumento de 40x.

### 3.13 DOSAGEM DE INSULINA POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

A dosagem de insulina foi realizada pela técnica de RIE. Tal dosagem é baseada no princípio de interação competitiva entre moléculas de insulina humana radioativa marcada com iodo 125 ( $I^{125}$ ), da marca Perkin Elmer<sup>®</sup> e das moléculas de insulina das amostras em análise, não radioativas. A competição acontece por

anticorpos anti-insulina de rato. Após centrifugação da solução as moléculas de insulina ligadas aos anticorpos ficam no sobrenadante.

A análise da radiação foi realizada utilizando-se o contador GAMA<sup>®</sup> e desenvolvida uma curva padrão de calibração. A partir da curva de calibração foi quantificada a insulina de cada amostra dosada, sendo que existe uma proporção de razão direta entre a radioatividade emitida e a quantidade de insulina não radioativa. Obtém-se mais insulina radioativa livre no precipitado da solução quanto for a quantidade de insulina da amostra ligada o anticorpo. A leitura é feita em cpm/min e convertida para o log da concentração de insulina em ng/mL.

### 3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (epm). Os dados foram avaliados estatisticamente com o programa Graph Pad Prism<sup>®</sup>, versão 5.0 usando teste Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni pela seleção de pares de colunas, com  $p < 0,05$  como critério de significância.

## 4. RESULTADOS

Todos os resultados apresentados seguem a mesma sequência descritiva de grupos, inicialmente descreveremos o efeito do tratamento neonatal com MSG em relação ao CON, e posteriormente o efeito da esplenectomia dentro de cada grupo experimental.

### 4.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E OBESIDADE

A tabela 1 demonstra o efeito da esplenectomia sobre e os parâmetros biométricos e o peso dos órgãos em animais CON e MSG. Animais MSG-NO apresentaram redução de 16,6% e 9,11% respectivamente no peso corporal e CNA em relação ao grupo CON-NO. Deste modo, o IL foi 7,6% maior no grupo MSG-NO comparado ao grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). Nenhum destes parâmetros foi afetado pela esplenectomia em ambos os grupos. Conforme também demonstra a tabela 1 o peso do coração, rim, fígado e baço foi cerca de 20% menor em ratos MSG-NO comparados aos respectivos órgãos no grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). A esplenectomia não alterou o peso dos órgãos em ambos os grupos, exceto na glândula adrenal. A glândula adrenal dos grupos CON-ESPL e MSG-ESPL aumentou 14,63% e 26,92% respectivamente em relação aos respectivos grupos não operados ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1. Parâmetros biométricos e Peso de Órgãos em Animais Esplenectomizados.**

Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média; n= 10 a 15 ratos para todos os grupos. As letras sobre os números indicam diferenças de  $p < 0,05$  na análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni (selecionados pares de grupos). <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

	<b>CON-NO</b>	<b>CON-ESPL</b>	<b>MSG-NO</b>	<b>MSG-ESPL</b>
Peso Corporal (g)	324,10 $\pm$ 6,69 <sup>b</sup>	298,30 $\pm$ 7,04	270,30 $\pm$ 6,13 <sup>a</sup>	247,80 $\pm$ 8,07
Comprimento Naso-Anal (cm)	21,84 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	21,81 $\pm$ 0,35	19,85 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	19,10 $\pm$ 0,26
Índice de Lee	0,305 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	0,304 $\pm$ 0,004	0,328 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,329 $\pm$ 0,004
Coração (g/100g)	0,413 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup>	0,401 $\pm$ 0,017	0,343 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,352 $\pm$ 0,010
Rim (g/100g)	0,4332 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>	0,4167 $\pm$ 0,009	0,3335 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	0,3320 $\pm$ 0,006
Adrenal (g/100g)	0,0082 $\pm$ 0,0004	0,0096 $\pm$ 0,0002 <sup>a</sup>	0,0078 $\pm$ 0,0006	0,0099 $\pm$ 0,0011 <sup>b</sup>
Fígado (g/100g)	3,179 $\pm$ 0,086 <sup>b</sup>	2,995 $\pm$ 0,074	2,760 $\pm$ 0,065 <sup>a</sup>	2,885 $\pm$ 0,059
Baço (g/100g)	0,2377 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>		0,1740 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	

#### 4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RESISTÊNCIA À INSULINA

Na tabela 2 estão representados os efeitos da esplenectomia sobre os parâmetros bioquímicos e a resistência a insulina em ratos CON e MSG. Ratos MSG-NO apresentaram aumento de 78,4%, 14,9% e 181,7% respectivamente nos níveis plasmáticos de insulina, colesterol total e triglicerídeos comparados ao grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). Conforme também demonstra a tabela 2, ratos MSG apresentam uma redução de 43,7% no  $K_{ITT}$  em relação ao grupo CON, confirmando a resistência à insulina. Os níveis glicêmicos e insulinêmicos foram reduzidos em 15% e 41,26% no grupo MSG-ESPL em relação ao grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ). Estes parâmetros não foram afetados pela esplenectomia no grupo CON-ESPL. Para o grupo experimental MSG-ESPL a retirada do baço elevou em 21,9% os níveis de colesterol total comparado ao grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ). Similarmente, no grupo MSG-ESPL houve

aumento de 20,4% nos níveis de triglicerídeos em relação ao MSG-NO ( $p < 0,05$ ). Em ambos os grupos a esplenectomia melhorou a sensibilidade à insulina. O KITT foi 30% e 99% maior respectivamente nos grupos CON-ESPL e MSG-ESPL comparados aos grupos não operados CON e MSG ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e  $K_{ITT}$**  Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão;  $n = 10$  a 15 ratos para cada grupo. As letras sobre os números indicam diferenças de  $p < 0,05$  na análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni (selecionados pares de grupos) <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

	CON-NO	CON-ESPL	MSG-NO	MSG-ESPL
Glicose (mg/dL)	84,33 $\pm$ 4,15	72,56 $\pm$ 3,93	86,56 $\pm$ 1,70	73,56 $\pm$ 3,78 <sup>b</sup>
Colesterol (mg/dL)	106,1 $\pm$ 5,54	108,4 $\pm$ 6,49	121,9 $\pm$ 6,09	148,6 $\pm$ 8,33 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	45,3 $\pm$ 4,10 <sup>b</sup>	47,0 $\pm$ 4,10	125,6 $\pm$ 5,40 <sup>a</sup>	153,6 $\pm$ 7,50 <sup>b</sup>
Insulina (ng/mL)	0,247 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,240 $\pm$ 0,03	0,441 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,259 $\pm$ 0,03
$K_{ITT}$ (%/minuto)	2,68 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	3,48 $\pm$ 0,26	1,51 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>

#### 4.3 HEMOGRAMA

Na tabela 3 está a representação do hemograma, bem como, os efeitos da esplenectomia sobre suas variáveis. A quantidade de hemácias e o hematócrito foram aproximadamente 24% maiores no grupo MSG-NO comparado ao CON-NO ( $p < 0,05$ ). Todavia, os níveis de hemoglobina não foram diferentes entre estes dois grupos. No grupo CON-ESPL os níveis de hemoglobina foram 9,4% maiores em relação aos grupos CON-NO ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 3 também podemos observar que o número de leucócitos totais está aumentado 29,1% em relação ao grupo CON-NO. Os linfócitos foram 23% menores no grupo MSG-NO em relação ao grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). Todavia, a quantidade de granulócitos foi 91% maior nos animais MSG-NO comparados aos mesmos subtipos celulares no grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). Em ambos os grupos experimentais

a esplenectomia elevou 72% e 42% respectivamente os níveis de leucócitos, nos grupos CON-ESPL e MSG-ESPL comparados aos respectivos grupos não operados ( $p < 0,05$ ). Em animais MSG-ESPL houve aumento de 42,6% no número de leucócitos e redução de 11,8% no número de granulócitos comparado ao MSG-NO ( $p < 0,05$ ). A esplenectomia não afetou estas medidas no grupo CON. Nem o tratamento com MSG, nem a esplenectomia afetaram os níveis de PCR.

**Tabela 3. Parâmetros Hematológicos** Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão;  $n = 10$  a 15 ratos para cada grupo. As letras sobre os números indicam diferenças de  $p < 0,05$  na análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni (selecionados pares de grupos) <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

	CON-NO	CON-ESPL	MSG-NO	MSG-ESPL
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6,14 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	6,91 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	7,50 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	7,67 $\pm$ 0,44
Hematócrito (%)	33,61 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>	37,18 $\pm$ 0,21	42,43 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	42,11 $\pm$ 2,41
Hemoglobina (g/dL)	14,90 $\pm$ 0,20	16,30 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	14,90 $\pm$ 0,33	15,90 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
Leucócitos (/ $\mu\text{L}$ )	6930 $\pm$ 209 <sup>b</sup>	11984 $\pm$ 276	8947 $\pm$ 456 <sup>a</sup>	12763 $\pm$ 903 <sup>b</sup>
Linfócitos (%)	77,80 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	77,51 $\pm$ 0,62	59,91 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	63,40 $\pm$ 2,19
Granulócitos (%)	22,20 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	22,50 $\pm$ 0,62	42,30 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	37,3 $\pm$ 2,06 <sup>b</sup>
Proteína C Reativa (mg/L)	< 6,0 $\pm$ 0	< 6,0 $\pm$ 0	< 6,0 $\pm$ 0	< 6,0 $\pm$ 0

#### 4.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, DO CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA

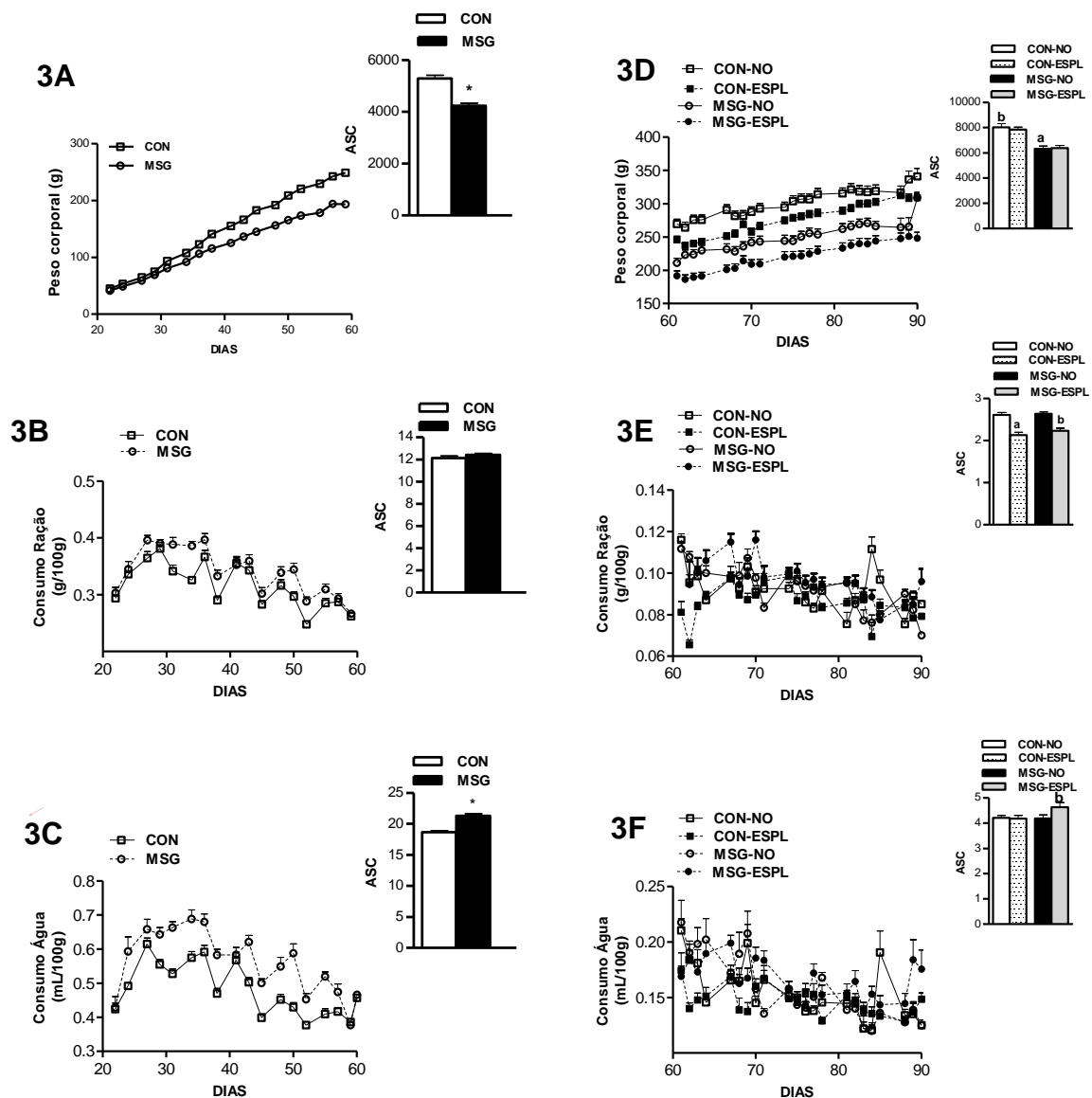
A figura 3A representa a evolução do peso corporal e a área sob a curva (ASC) dos animais CON e MSG no período anterior a esplenectomia (21 a 59 dias). Ratos MSG apresentam reduzido peso corporal durante o crescimento, conforme demonstra a curva evolutiva em relação aos ratos CON. Considerando a análise da ASC deste período podemos notar que animais MSG apresentam diminuição de



19,9% em relação a ASC do grupo CON ( $p < 0,05$ ). A figura 3D representa a evolução do peso corporal e ASC dos animais CON e MSG no período posterior a esplenectomia (60-90 dias). Conforme demonstra o gráfico, ratos MSG continuaram tendo menor peso corporal em relação aos ratos CON durante o desenvolvimento corporal. Deste modo, a ASC do peso corporal foi 21% menor no grupo MSG neste período em relação aos animais do grupo CON ( $p < 0,05$ ). A esplenectomia não afetou o peso corporal em ambos os grupos experimentais.

As figuras 3B e 3E representam a curva de consumo de ração dos animais antes da cirurgia (21 aos 59 dias) e pós-esplenectomia (60 aos 90 dias) respectivamente, bem como as respectivas ASC de cada período estão representadas nos *inserts*. Conforme demonstram os dados das figuras 3E não houve diferença no consumo de ração entre os grupos CON e MSG não operados em ambos os períodos avaliados. Todavia, após a esplenectomia, houve diminuição do consumo de ração de 18,6% e 15,3%, respectivamente nas ASC dos grupos CON-ESPL e MSG-ESPL em relação aos respectivos grupos não operados.

O consumo de água de todos os grupos e as respectivas ASC estão representado nas figuras 3C e 3F no período que antecedeu a cirurgia (21 aos 59 dias) e no período pós-esplenectomia (60 aos 90 dias) respectivamente. A ASC do consumo de água foi 14,1% maior nos animais MSG em relação ao CON no período de 22 a 59 dias. Esta diferença foi abolida durante o desenvolvimento. Todavia, no período pós-esplenectomia o a ASC do consumo de água foi 10,8% maior no grupo MSG-ESPL comparado ao MSG-NO.

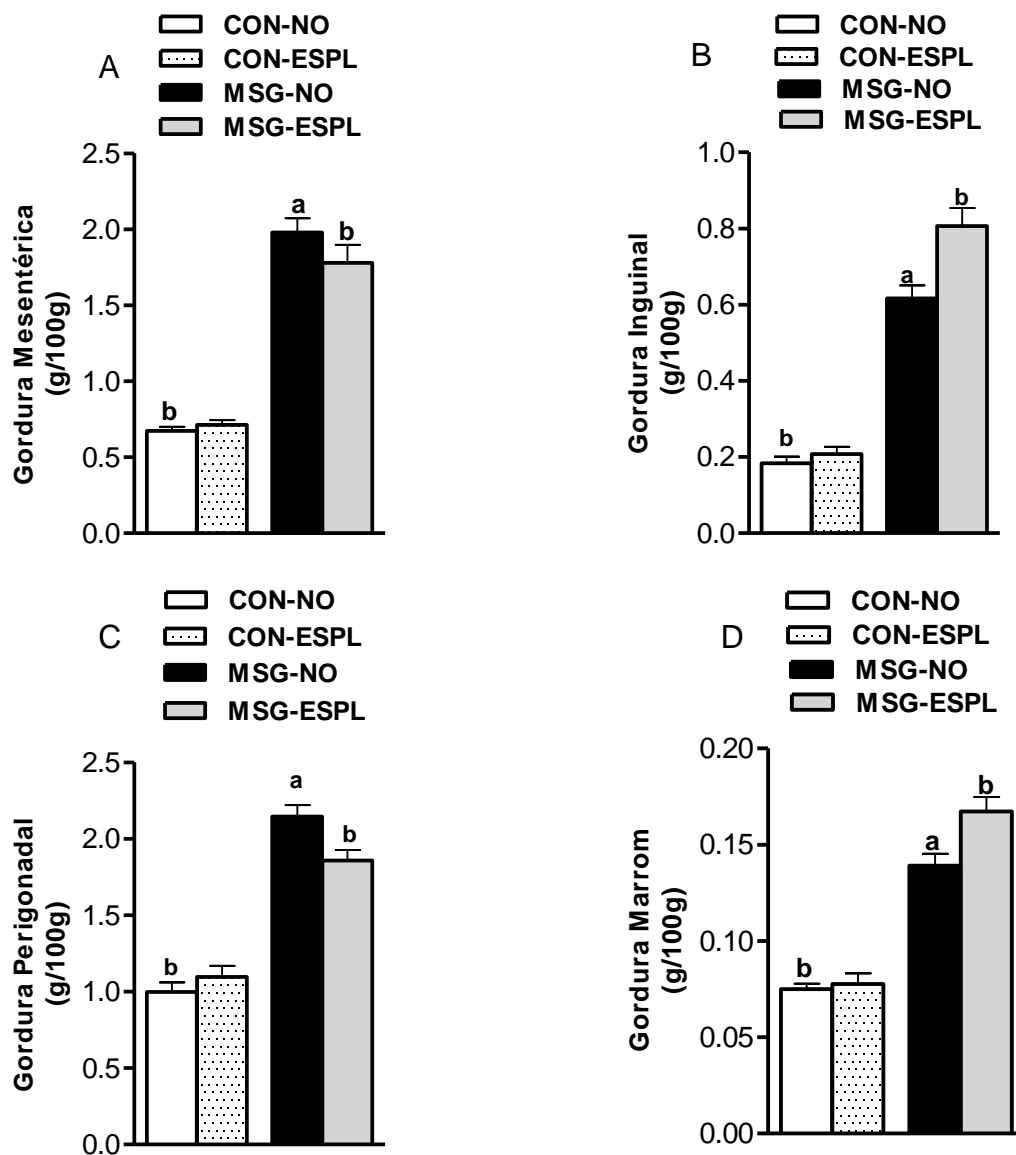


**Figura 3. Avaliação do crescimento, do consumo de ração e água:** Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média;  $n= 10-15$  ratos por grupo. A evolução do peso corporal, o consumo alimentar e de água com as respectivas ASC antes da cirurgia (21 a 59 dias) estão representados nos painéis a esquerda (3A, 3B, 3C). Estes mesmos parâmetros estão representados a esquerda da figura para o período posterior a esplenectomia (3D, 3E, 3F). As letras sobre as colunas indicam diferenças de  $p<0,05$  na análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni (selecionados pares de grupos) <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO, \*diferença entre CON-NO e MSG-NO no teste t de Student's.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE GORDURA

Para análise do acúmulo de tecido adiposo branco foram retirados os depósitos subcutâneos, representado pela gordura inguinal (Figura 4B) e depósitos

viscerais, representado pelas gorduras, mesentérica (figura 4A) e perigonadal (Figura 4C). Conforme demonstram os gráficos (A,B,C) ratos MSG-NO apresentaram um aumento de aproximadamente 181,6% em todos os depósitos de gordura em relação ao grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). Os depósitos viscerais, mesentérico e perigonadal foram reduzidos 10,2% e 13,42% respectivamente no grupo MSG-ESPL em relação aos mesmos depósitos no grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ). Todavia, animais MSG-ESPL apresentaram aumento de 30,7% na gordura inguinal em relação ao grupo MSG não operado ( $p < 0,05$ ). A figura 4D também demonstra os efeitos da esplenectomia no conteúdo de gordura marrom. Ratos MSG-NO apresentam aumento de 85,3% em relação ao CON-NO. Novamente animais MSG-ESPL apresentaram aumento de 20% no conteúdo de gordura marrom comparado ao grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ). Nenhum dos depósitos foi afetado pela esplenectomia no grupo CON.

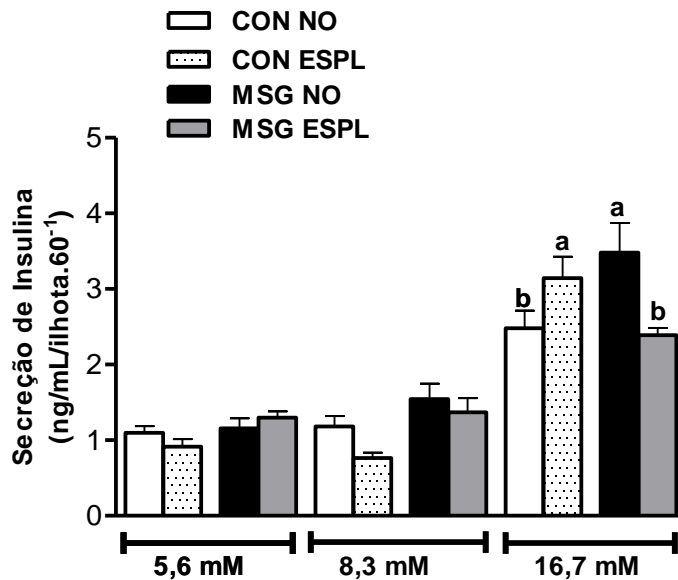


**Figura 4. Avaliação do Conteúdo de tecido adiposo branco e marrom em ratos esplenectomizados:** Os valores representam a média  $\pm$  epm; n=10 a 15 ratos por grupo. Os depósitos viscerais brancos estão representados nas Figuras A e C, enquanto o depósito branco subcutâneo está representado na Figura B. O tecido adiposo marrom está representado na Figura D. As letras sobrescritas as colunas indicam diferenças significativas de  $p < 0,05$  na análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni (selecionados pares de grupos): <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

#### 4.6 SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE

Os efeitos da esplenectomia na secreção de insulina estimulada por glicose estão representados na Figura 5. Ilhotas pancreáticas do grupo MSG-NO apresentaram aumento de 40,2% na secreção de insulina em relação ao grupo CON-NO apenas na presença de elevadas concentrações de glicose (16,7 mM). Em ambos os grupos experimentais a esplenectomia não afetou a secreção de insulina

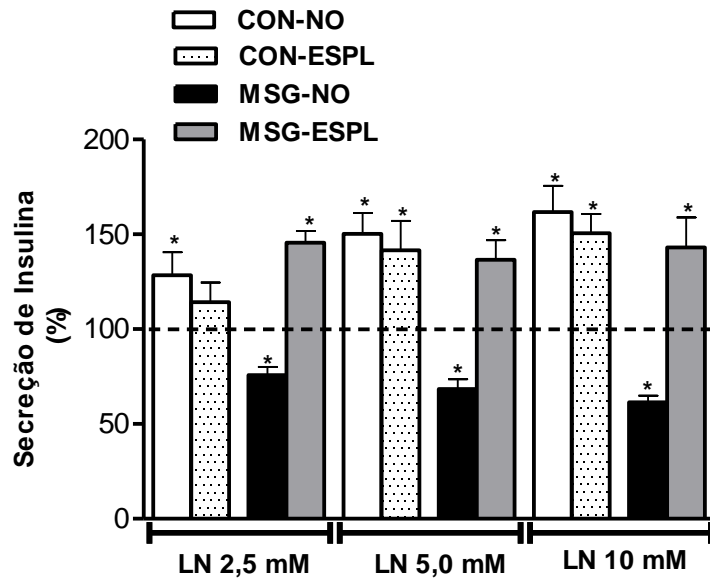
estimulada por 5,6mM ou 8,3mM de glicose. Todavia, no grupo MSG-ESPL a secreção de insulina estimulada por 16,7mM foi reduzida 31,4% em relação a secreção do grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5. Secreção de Insulina Estimulada por Glicose:** Os valores representam média  $\pm$  epm. Quatro a seis animais foram usados por grupo, sendo realizadas no mínimo 20 observações para cada concentração de glicose avaliada. As letras sobrescritas as colunas são indicativas dos valores cujas diferenças são significativas, com  $p < 0,05$  em análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni realizada entre os pares de grupos selecionados e comparados: <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

#### 4.7. EFEITO DA ESPLENECTOMIA NA AÇÃO DO BLOQUEADOR DA NOS SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE:

Para avaliar o papel do ON sobre o controle secretor de insulina em ratos esplenectomizados nós usamos o inibidor da NOS, L-NAME (LN) em diferentes concentrações, conforme demonstram os dados da Figura 6. Todas as concentrações de L-NAME foram avaliadas na presença de glicose a 11,1mM. Os valores são expressos em porcentagem, após normalização, sendo o 100% representado pela presença apenas de glicose dentro de cada grupo. Em todas as concentrações avaliadas a adição de L-NAME elevou aproximadamente 30% a secreção de insulina estimulada por glicose no grupo CON-NO. Todavia, no grupo MSG-NO a adição de L-NAME inibiu em aproximadamente 40% a secreção de insulina estimulada por glicose. A esplenectomia não alterou o efeito do L-NAME no grupo CON. Porém, a esplenectomia reverteu o efeito do L-NAME no grupo MSG-ESPL. Ilhotas isoladas de ratos MSG-ESPL apresentaram um aumento de aproximadamente 35% na secreção de insulina estimulada por glicose na presença do bloqueador da NOS.

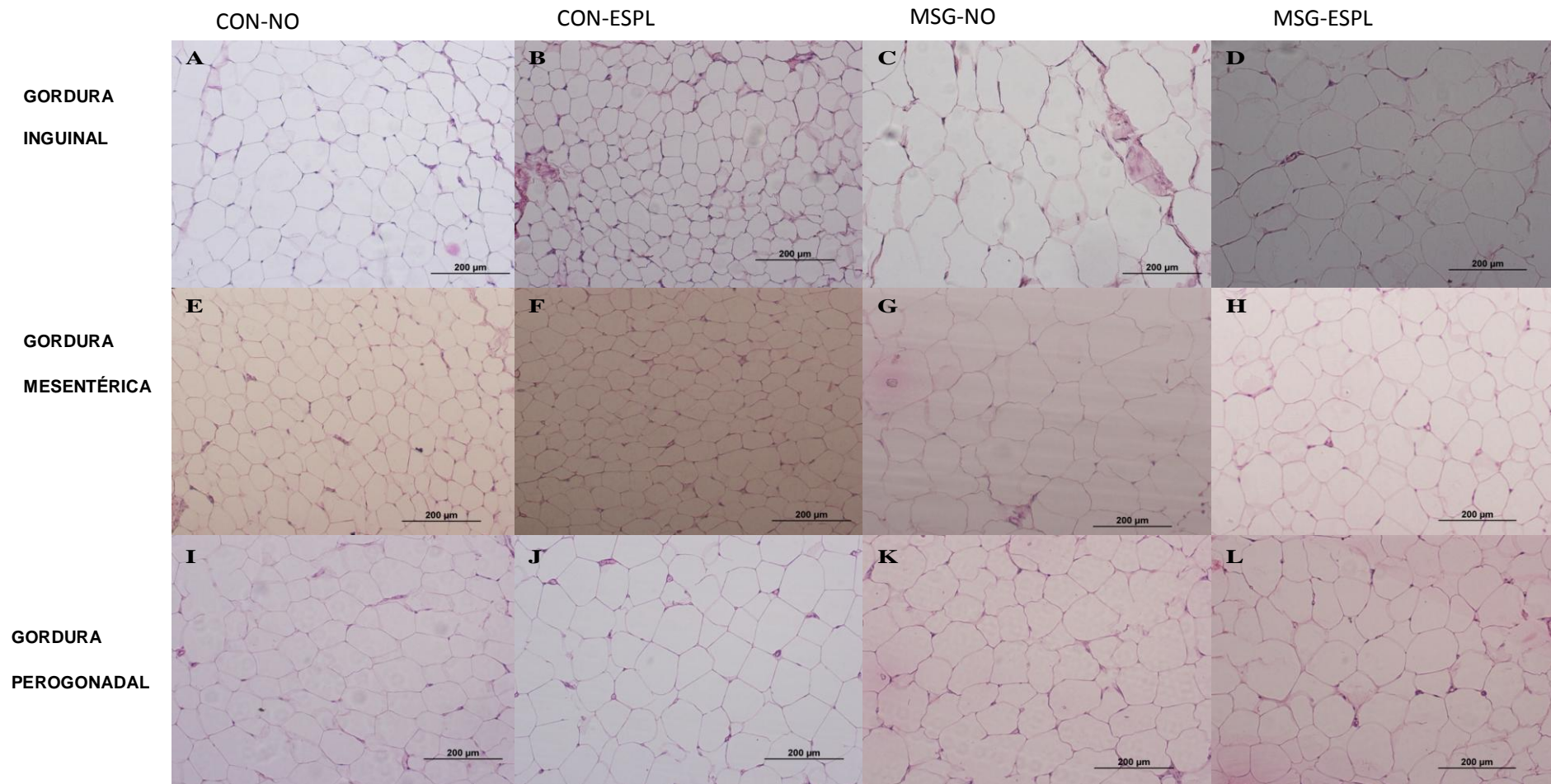


**Figura 6. Efeito do L-NAME sobre a secreção de insulina:** Os valores na figura demonstram a média  $\pm$  o epm. Foram feitas de 20 a 40 poços para cada situação. A linha pontilhada representa apenas a concentração de glicose de 11 mM, equivalente a 100%. Os símbolos acima das colunas são indicativos dos valores cujas diferenças são significativas, com  $p < 0,05$  pela análise da variância (ANOVA) com pós-teste Bonferroni *versus* glicose 100% (11,1mM).

#### 4.8. HISTOMORFOLOGIA DOS DEPÓSITOS DE GORDURA EM RATOS ESPLENECTOMIZADOS:

Na figura 7 (A-L) estão demonstrados os aspectos histológicos relativos ao tamanho e número de adipócitos dos depósitos de gordura visceral e subcutânea em animais esplenectomizados, enquanto na figura 8 (A-D) estão demonstrados os aspectos histológicos relativos ao número de adipócitos do tecido adiposo marrom. O grupo MSG-NO apresentou redução de 64%, 55% e 33% respectivamente no número de adipócitos na gordura mesentérica (8G), inguinal (8C) e na gordura perigonadal (8K) em relação aos mesmos depósitos no grupo CON-NO ( $p < 0,05$ ). Adipócitos dos ratos MSG-NO apresentaram hipertrofia de aproximadamente 181% em todos os depósitos em relação aos adipócitos dos ratos CON-NO ( $p < 0,05$ ). No grupo MSG-ESPL (8 D, H e L) a retirada do baço promoveu uma redução de aproximadamente 36% na hipertrofia dos adipócitos em todos os depósitos avaliados em relação ao grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ). O número de adipócitos não foi afetado pela esplenectomia em ambos os grupos no tecido adiposo branco. Os respectivos valores estão representados na tabela 4. No tecido adiposo marrom

houve diminuição de 37% no número de adipócitos no MSG-NO em relação ao CON-NO, enquanto a esplenectomia promoveu aumento de 28% no CON-ESPL e de 49% no MSG-ESPL em relação aos seus respectivos grupos não operados.

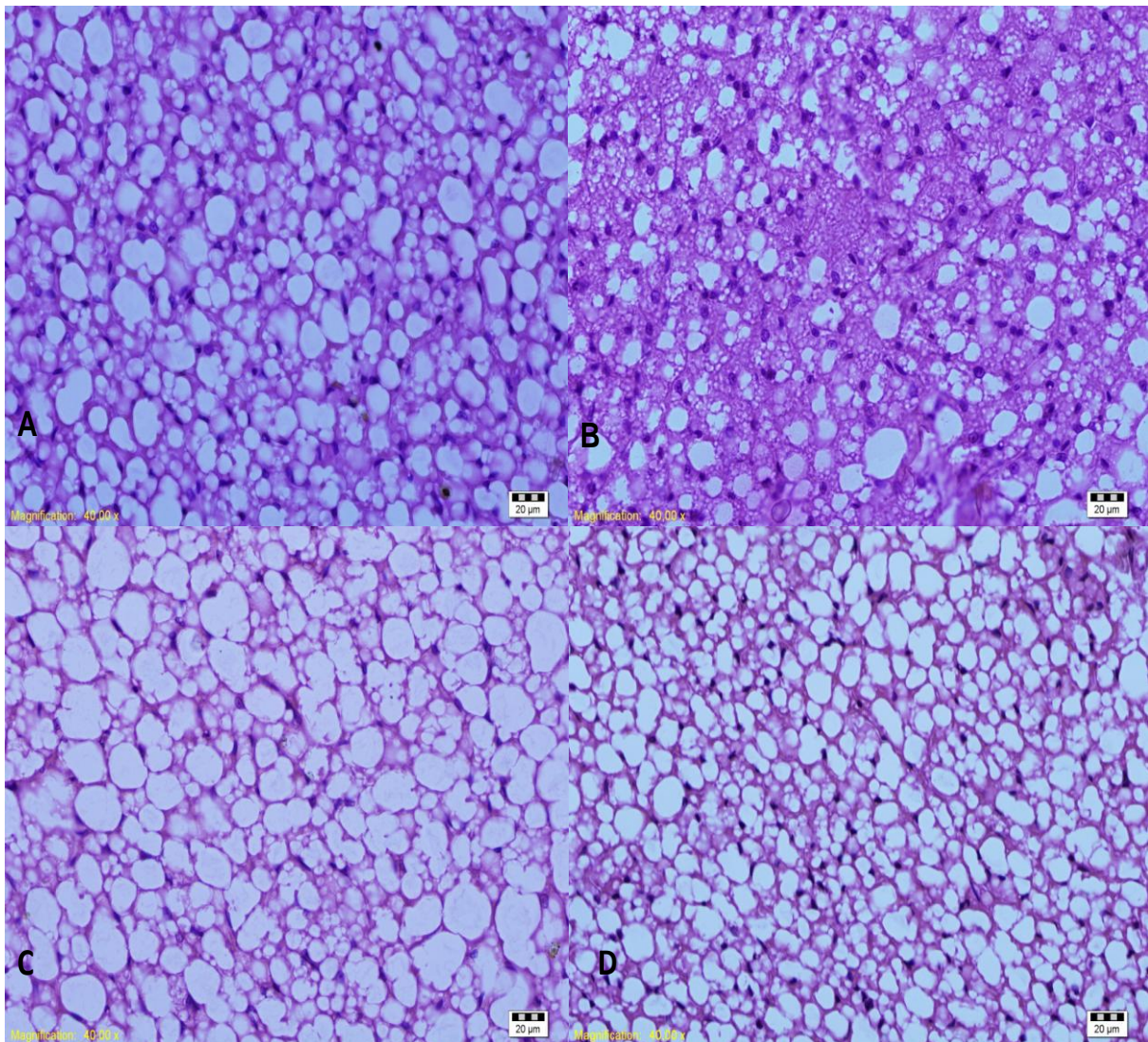


**Figura 7. Análise histológica do Tecido adiposo em animais esplenectomizados:** Lâminas Histológicas de diferentes depósitos de gordura, coradas por HE de todos os grupos, n= 12 a 15 lâminas por grupo, visualizadas no aumento de 20x. **A-** Gordura inguinal CON-NO. **B-** Gordura inguinal CON-ESPL. **C-** Gordura inguinal MSG-NO. **D-** Gordura inguinal MSG-ESPL. **E-** Gordura mesentérica CON-NO. **F-** Gordura mesentérica CON-ESPL. **G-** Gordura mesentérica MSG-NO. **H-** Gordura inguinal MSG-ESPL. **I-** Gordura perigonadal CON-NO. **J-** Gordura perigonadal CON-ESPL. **K-** Gordura perigonadal MSG-NO. **L-** Gordura perigonadal MSG-ESPL.



**Tabela 4. Parâmetros relativos aos depósitos de gordura:** Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão; n= 10 a 15 ratos para cada grupo. As letras sobre os números indicam diferenças de  $p < 0,05$  na análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni (selecionados pares de grupos): <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

	CON-NO		CON-ESPL		MSG-NO		MSG-ESPL	
	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Número (/campo)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Número (/campo)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Número (/campo)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Número (/campo)
<b>Gordura Mesentérica</b>	4420 $\pm$ 167 <sup>b</sup>	213,1 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	3475 $\pm$ 684 <sup>a</sup>	203,4 $\pm$ 9	13883 $\pm$ 417 <sup>a</sup>	77,31 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	8660 $\pm$ 204 <sup>b</sup>	90,93 $\pm$ 6
<b>Gordura Perigonadal</b>	6435 $\pm$ 182 <sup>b</sup>	101,5 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	5965 $\pm$ 139	114,1 $\pm$ 5	12924 $\pm$ 349 <sup>a</sup>	67,50 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	8598 $\pm$ 203 <sup>b</sup>	69,33 $\pm$ 3
<b>Gordura Inguinal</b>	5076 $\pm$ 119 <sup>b</sup>	126,7 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	5766 $\pm$ 134	115,3 $\pm$ 5	16644 $\pm$ 492 <sup>a</sup>	56,78 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	10658 $\pm$ 310 <sup>b</sup>	72,80 $\pm$ 3
<b>Gordura Marrom</b>	-	48,1 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	-	61,9 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>		30,4 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>		45,2 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>

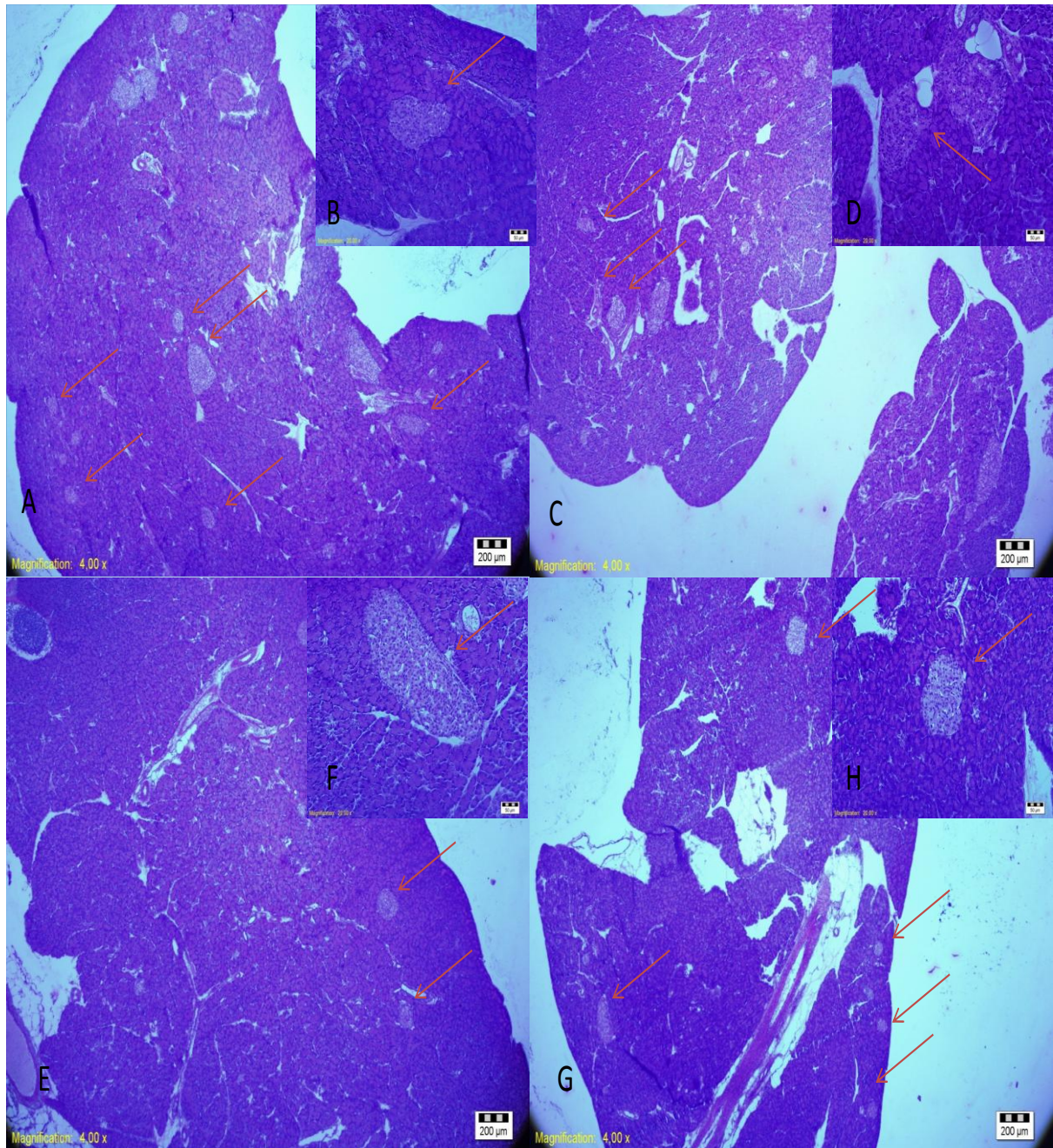


**Figura 8. Análise histológica do Tecido adiposo marrom em animais esplenectomizados:** Lâminas Histológicas de diferentes depósitos de gordura, coradas por HE de todos os grupos, n= 12 a 15 lâminas por grupo, visualizadas no aumento de 40x. **A-** CON-NO. **B-** CON-ESPL. **C-** MSG-NO. **D-** MSG-ESPL.

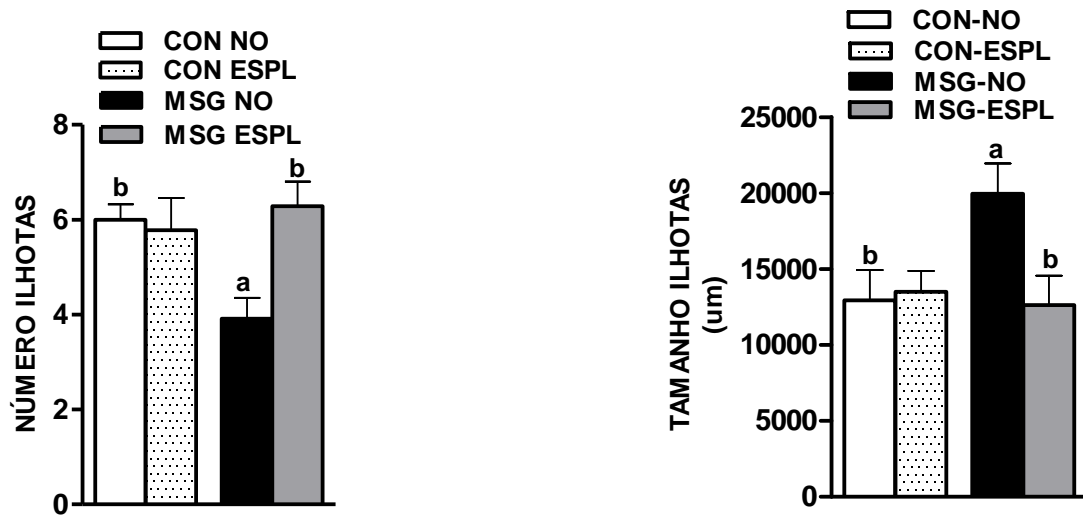
#### 4.8.HISTOMORFOLOGIA DO PÂNCREAS EM RATOS ESPLENECTOMIZADOS:

Os efeitos da esplenectomia sobre a histomorfologia das ilhotas pancreáticas estão representados nas figuras 9. As médias dos valores avaliados estão apresentados na Figura 10. Ilhotas pancreáticas de ratos MSG-NO apresentam hipertrofia. A área das ilhotas pancreáticas do grupo MSG-NO foi 54% maior em relação a áreas das ilhotas do grupo CON-NO. A esplenectomia promoveu uma redução de 63% na hipertrofia das ilhotas no grupo MSG-ESPL em relação ao grupo MSG-NO ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, o grupo MSG-ESPL apresentou aumento de 61% no número de ilhotas em relação ao MSG-NO.





**Figura 9. Lâminas de histologia do pâncreas evidenciando ilhotas de Langherans em animais esplenectomizados:** Lâminas Histológicas do pâncreas, coradas por HE de todos os grupos, n= 12 a 15 lâminas por grupo, visualizadas nos aumentos de 4x e 20x. **A-CON-NO 4x. B- CON-NO 20x. C- CON-ESPL 4x. D- CON-ESPL 20x. E- MSG-NO 4x. F- MSG-NO 20x. G- MSG-ESPL 4x. H- MSG-ESPL 20x.** As setas indicam ilhotas de Langherans nos dois aumentos.



**Figura 10. Avaliação do tamanho e do número de ilhotas pancreáticas:** Os valores na figura demonstram a média  $\pm$  o epm. As letras sobrescritas às colunas são indicativas dos valores cujas diferenças são significativas, com  $p < 0,05$  em análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni realizada entre os pares de grupos selecionados e comparados: <sup>a</sup> diferença em relação ao grupo CON-NO; <sup>b</sup> diferença em relação ao grupo MSG-NO.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 MODELO DE OBESIDADE MSG

O modelo de lesão hipotalâmica induzido pela aplicação neonatal de elevadas doses de MSG vem sendo utilizado desde a década de 60 como método de indução de obesidade em roedores (BALBO et al. 2007; GRASSIOLLI et al., 2006; MACHO et al., 2000; OLNEY, 1969). Corroborando com os dados da literatura, nosso estudo demonstrou que animais tratados neonatalmente com MSG apresentaram atraso no desenvolvimento, acompanhado de excessivo acúmulo de gordura corporal, hiperinsulinemia, dislipidemia, resistência à insulina. Deste modo, nosso trabalho confirma a eficácia do tratamento com MSG para reproduzir as características da SM também encontrada em humanos obesos (GRASSIOLLI; GRAVENA; MATHIAS, 2007; MACHO et al., 2000). Estas várias alterações metabólicas e hormonais são consequências das lesões no hipotálamo, mais especificamente do ARQ que leva, além da obesidade, à disfunção sexual, parada no crescimento, déficit comportamental em roedores e alterações no controle cardiovascular (HIRATA et al., 1997; PARK; KIM; DAN, 2007). A lesão no ARQ acontece sobre o efeito de altas doses de MSG, promovendo efeito neurotóxico por aumentar de forma persistente, a condutância iônica da membrana, alternando o potencial de repouso normal. Na tentativa de restauração dos gradientes iônico e osmótico, há exaustão dos estoques energéticos e morte celular (COYLE et al., 1981). Entre as consequências destas lesões está a redução na liberação do hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH) e consequentemente diminuição das concentrações de hormônio do crescimento (GH). Esta redução na liberação do GH está associada à redução do tamanho corporal, e também contribui para menor atividade lipolítica (TAMURA et al., 2002). Deste modo, a redução do GH favorece menor crescimento ósseo e diminuída massa muscular contribuindo para o menor peso, além de favorecer o acúmulo de lipídios.

A obesidade é condição caracterizada por aumento nas concentrações plasmática de AGL não esterificados em relação à demanda dos tecidos. Este aumento parece estar associado à expansão da massa de tecido adiposo, com consequente aumento na captação de AGL para o fígado, aumentando a lipogênese e produção de VLDL hepática. Esta elevação pode levar a hipertrigliceridemia, que

pode ocorrer acompanhada ou não de aumento dos níveis de colesterol total (GINSBERG; ZHANG; HERNANDEZ-ONO, 2005). Estes dados são comprovados no presente estudo. Ratos MSG-obesos apresentaram aumento significativo de triglicerídeos, enquanto os níveis de colesterol se mostram normais em relação aos animais magros. Adicionalmente nosso estudo também demonstrou que ratos MSG-obesos apresentam resistência a insulina. De acordo com estudos prévios a resistência à insulina neste modelo experimental é atribuída, a uma disfunção do receptor da insulina, assim como na transdução de sinal interno (MACHO et al., 2000). Para superar a RI e preservar a homeostase glicêmica, instala-se a hiperinsulinemia, sustentada pelo esforço extremo da célula  $\beta$  destes animais em produzir níveis cada vez maiores de insulina (GRASSIOLLI et al., 2006). Todavia, a longo prazo como mostram alguns estudos a hiperfunção da célula  $\beta$  pode levar ao estresse oxidativo e apoptose, culminando com a instalação definitiva do DM2 (MIRANDA et al., 2012). Considerando a função central da insulina sobre o metabolismo de lipídios, disfunções secretórias ou periféricas da insulina estão envolvidas nas dislipidemias. Deste modo, estudos demonstram que a RI, característica presente na obesidade, pode contribuir para as desordens no perfil lipídico, já que a liberação de AGL pelo tecido adiposo para a circulação é mediada pela lipoproteína lípase. A ação desta enzima é suprimida pela insulina em condições fisiológicas, entretanto na RI sua atividade encontra-se aumentada e conseqüentemente leva ao aumento de AGL. Esses por sua vez, podem levar a altas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (COPPACK et al., 1992). Uma vez que ratos MSG deste estudo têm diminuição na sensibilidade à insulina, alterações promovidas pela RI no metabolismo lipoproteico poder ter participado na hipertrigliceridemia observada.

Em relação à normoglicemia encontrada nos animais MSG deste trabalho é também característica do modelo aos 90 dias (BALBO et al., 2007), apesar de a presença da hiperglicemia também pode estar associada a esse modelo, dependendo da dose utilizada, da espécie e idade do animal (SASAKI et al., 2009). Conforme descrito anteriormente a normoglicemia justifica-se pela hiperinsulinemia, como forma de uma resposta adaptativa do pâncreas, na tentativa da manutenção da homeostase glicêmica (BURKHARD, 1998). Apesar da normoglicemia de jejum nosso estudo confirmou a presença de resistência à ação da insulina uma



característica central da SM (BONORA et al. 1987; 2006; MIRANDA et al, 2012). Conforme demonstram dados da literatura a RI acontece de forma evolutiva, sendo que os primeiros tecidos a se tornarem resistentes são o fígado e o tecido muscular. Em um estudo que utilizou técnicas capazes de avaliar a RI em MSG-obesos foi demonstrado que houve diminuição na cascata ativada pelo receptor de insulina no fígado e músculo, caracterizando perfil de resistência nestes locais aos 90 dias (ZEYDA; STULNIG, 2009). No tecido adiposo ainda preserva-se uma via alternativa da insulina o que explica o aumento do tecido adiposo, sendo que a hiperinsulinemia é a principal causa de obesidade neste modelo (THIRONE et al, 2004). Corroborando com estes dados da literatura, houve também significativo aumento das concentrações séricas de insulina neste modelo, definido assim o quadro de hiperinsulinemia. Este processo acontece devido a um aumento na transdução de sinal interno, observando-se um esforço extremo da célula  $\beta$  destes animais MSG-obesos em produzir níveis cada vez maiores de insulina para tentar manter a normoglicemia, sendo que esta hiperatividade pode culminar em estresse oxidativo e perda de função celular (MACHO et al., 2000).

Dados clínicos e experimentais indicam que na obesidade existem alterações da resposta imune humoral e celular. Indivíduos e roedores obesos apresentam um baixo grau de inflamação crônica, que está envolvido em todas as complicações fisiopatológicas encontradas na SM e DM2 (BASTARD et al., 2006). Considera-se que os principais locais de produção de mediadores inflamatórios na obesidade são o fígado, o tecido linfóide e o tecido adiposo (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003). A presença de inflamação na obesidade é indicada pelo aumento sistêmico de marcadores inflamatórios e da infiltração de macrófagos e outras células do sistema imune no tecido adiposo, bem como em outros órgãos como fígado e pâncreas. O aumento da adiposidade contribui para uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e outras e, conseqüentemente, para o desencadeamento das alterações metabólicas (BACH-NGOHOU et al., 2002; CANCELLO; CLÉMENT, 2006). No modelo MSG de obesidade existem trabalhos que encontraram marcadores inflamatórios no tecido adiposo, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$ , sendo que estes estão ligados a RI no modelo. É de suma importância a avaliação do perfil inflamatório neste modelo de obesidade (RAMOS, 2010). Portanto alterações no processo inflamatório podem estar

envolvidas na RI e obesidade neste modelo, mas até o presente momento a origem deste processo é desconhecida.

Estudos indicam que a análise do hemograma pode ser um indicador de processo inflamatório e que de forma indireta os níveis de leucócitos podem ser indicadores de inflamação (VISSER et al., 2001). Pela primeira vez nosso estudo avaliou o perfil destas células através do hemograma em ratos MSG-obesos. Conforme demonstrado por nossos dados, o número total de leucócitos, como o de granulócitos foi maior em ratos MSG-obesos. Não há dados na literatura avaliando o hemograma neste modelo de obesidade. No entanto em modelos que induzem obesidade com dieta hipercalórica, os resultados corroboram com o trabalho atual, mostrando o mesmo tipo de alterações, sendo que a contagem total de leucócitos plasmáticos é considerada um dos marcadores mais estáveis de inflamação (BICKEL et al., 2002). Outro estudo realizado em adolescentes obesas por Kim e Park em 2008, mostrou também a inter-relação entre a adiposidade e o aumento do número total de leucócitos e de granulócitos. Adolescentes com maior depósito de gordura abdominal apresentavam também maior número de leucócitos e granulócitos. Adicionalmente, nós também avaliamos o perfil plasmático de PCR. Níveis elevados de PCR são também considerados marcador de processo inflamatório, desde 1999, quando Visser et al. publicaram o primeiro trabalho relacionando obesidade e PCR. Esta proteína é produzida no fígado, em resposta ao estímulo das citocinas inflamatórias, e sua dosagem é realizada para diagnóstico de estados inflamatórios e infecções, tendo relação discreta com o IMC e o risco cardíaco na obesidade. Dados da literatura descrevem que, valores de PCR inferiores a 6 mg/L indicam ausência de processo inflamatório (LYON et al., 2003). No entanto diferentemente de humanos, em ratos a relação entre PCR e obesidade não está estabelecida. Em um estudo recente, foram utilizados ratos da linhagem Wistar induzidos à obesidade através de dieta hiperlipídica a fim de observar o papel da PCR na aterosclerose consequentemente desenvolvida pelos animais. Os resultados relataram que a exposição à dieta rica em gordura determinou o desenvolvimento da aterosclerose sem, no entanto, alterar os níveis de PCR no soro (KALSAIT et al., 2011). Isso talvez seja explicado pelo fato da PCR não ser uma proteína de fase aguda em ratos e também não ativar o sistema complemento como o faz em humanos (PADILLA et al., 2006).



Nosso trabalho também demonstrou pela primeira vez que os valores relativos a série vermelha (hemácias, hematócrito e hemoglobina) do sangue estão alterados em ratos MSG-obesos. Outros estudos também têm indicado alterações similares em humanos obesos (ANTONY et al., 2009). Diversos eventos podem estar envolvidos nestas alterações encontradas no modelo, entre os quais destacamos a hiperinsulinemia, bem como citocinas características da obesidade, tais como, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . De acordo com dados da literatura estes fatores promovem o crescimento celular hematopoiético e aumento da síntese da eritropoietina (EPO). A EPO é uma glicoproteína hormonal envolvida na regulação da produção de células vermelhas. Esta glicoproteína é produzida no fígado fetal e no rim adulto de humanos, bem como em roedores sob o controle transcricional do fator indutor de hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Apesar de a EPO ser crítica para a regulação da eritropoiese, a produção da mesma não é estimulada pela redução no número de células vermelhas, mas por uma cadeia de efeitos no fornecimento de oxigênio tecidual. A medula renal é especialmente sensível a alterações na tensão de oxigênio, sendo que tanto o aumento de insulina quanto das citocinas acima citadas levam à diminuição do conteúdo de oxigênio arterial, e conseqüente estímulo da eritropoiese. (BERNHARDT; ECKARDT, 2008). Sugerimos então, que a hiperinsulinemia, bem como, as citocinas inflamatórias elevadas no modelo MSG possam estar envolvidas no aumento do hematócrito encontrado em nossos dados.

De modo diferente a outros modelos de obesidade de origem genética, como Zucker, *ob/ob*, que estão associados à hiperfagia, o modelo MSG apresenta-se hipofágico ou normofágico em relação aos animais controle (DOLNIKOFF et al., 2001). Nosso trabalho demonstrou normofagia em ratos MSG-obesos. Embora o ARQ seja um importante núcleo relacionado a sinais que controlam o consumo alimentar, atribui-se à suas conexões com outros núcleos hipotalâmicos como LH e VMH a manutenção do peso corporal e a normofagia. Estudos em camundongos MSG demonstram que a produção de CART no ARQ é abalada, mas que sua atividade exógena é mantida, não modificando assim o perfil de consumo alimentar. Nestes animais CART e NPY podem agir através dos núcleos PVN ou LH através de circuitos neurais intactos, evitando hiperfagia (ZELEZNA, 2009).

No presente estudo os ratos MSG-obesos apresentaram aumento significativo do tamanho dos adipócitos em todos os depósitos de gordura. O inverso foi encontrado em relação ao número destas células, mostrando significativa

diminuição deste parâmetro no modelo MSG. O aumento do conteúdo de gordura visceral no presente estudo pode ser atribuído a hipercorticosterolemia, hiperinsulinemia, RI e hiperleptinemia, denominada obesidade neuroendócrina (CUNHA et al., 2011; KIZER et al., 1978; MORRIS et al., 1998). Alguns estudos demonstram inter-relação entre citocinas pró-inflamatórias e a hipertrofia dos adipócitos, sendo estas responsáveis também pelo processo de RI que acontece nestas células. Sabe-se, que adipócitos pequenos são mais sensíveis à insulina, enquanto adipócitos grandes se tornam mais facilmente resistentes (KAHN; FLIER, 2000). Nosso estudo não avaliou a presença de inflamação direta no tecido adiposo. Todavia, outros estudos usando o modelo MSG avaliaram os níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como da expressão de seu RNAm no modelo MSG à partir de adipócitos hipertrofiados provenientes de depósitos de gordura visceral mostraram elevados níveis destes marcadores inflamatórios (RAMOS et al., 2010). Adicionalmente, os estudos ainda demonstraram elevada presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo dos animais deste modelo (CINTI et al., 2005).

Nosso estudo também avaliou o depósito de tecido adiposo marrom (TAM), onde foi verificado aumento no peso deste depósito no grupo MSG-obeso em relação ao CON. A histologia deste tecido também apresentou modificação significativa no que diz respeito ao número de células, sendo que o grupo MSG mostrou um número menor de adipócitos em relação ao controle. A função do TAM se resume basicamente na termogênese. Acreditava-se inicialmente que o TAM estava praticamente ausente no humano adulto, sendo encontrado principalmente em fetos e recém-nascidos, no entanto novas pesquisas demonstram a presença deste tecido também em humanos adultos (CYPES, A.M. et al., 2009). Os adipócitos deste tecido são menores do que os do TAB e apresentam várias gotículas de gordura de diversos tamanhos dispersas em seu citoplasma abundante. Apresentam também grande número de mitocôndrias, relacionadas à sua função de termogênese, sendo que a produção de ATP é menor devido ao desvio do gradiente de prótons pela UCP-1 (CANNON; NEDERGAARD, 2004). De acordo com dados da literatura ratos MSG-obesos apresentam diminuída atividade simpática para o TAM e conseqüente diminuição da termogênese na gordura marrom interescapular, com menor gasto de energia, e aumento de tamanho destes adipócitos, caracterizando hipertrofia. Também existem dados de obesidade que relacionam redução na

proteína UCP1 nas mitocôndrias no tecido adiposo marrom de ratos *ob/ob*, a baixa termogênese neste tecido, e número reduzido de adipócitos (KOZAK; ANUCIADO-KOZA, 2008).

A hipertrofia e hipersecreção de insulina pelo pâncreas endócrino são características iniciais do desenvolvimento da obesidade e um processo adaptativo essencial no processo de evolução para o franco DM2 (HARISHANKAR et al., 2011). Nosso estudo avaliou morfologicamente e funcionalmente ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos. Ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos apresentaram maior liberação de insulina frente a elevadas concentrações de glicose, confirmando a hipersecreção de insulina neste modelo (BALBO et al., 2007; HIRATA, 1997; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHI, 1993). Existem poucos estudos que tratem de ilhotas pancreáticas em modelo MSG, sendo que em alguns deles foi verificado um desequilíbrio no SNA que leva à hipersecreção de insulina (BALBO et al., 2000). Existem estudos recentes, que dizem também que este é um modelo hiperinsulinêmico, estando relacionado possivelmente a atividade aumentada do SNP, sendo que com o exercício físico os animais deste estudo apresentaram um aumento da atividade simpática, mostrando uma maior resposta à glicose. Ficou caracterizado também neste estudo que esta maior resposta à glicose é decorrente em alterações de vias glicolíticas (LEITE et al., 2013). Também no trabalho de Balbo et al. em 2000, foi verificado que após realização de vagotomia, e menor atividade do SNP, houve uma conseqüente normalização na secreção de insulina, comprovando o envolvimento do SNP na secreção de insulina pelas ilhotas.

Na análise histomorfológica do pâncreas pode ser verificada hipertrofia das ilhotas pancreáticas dos animais MSG, bem como menor número, confirmando dados da literatura que utilizam animais de outros modelos de obesidade (HARISHANKAR, et al., 2011). Leite et al. em 2013 também observou hipertrofia em ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos, corroborando com o presente estudo. A justificativa para a hipertrofia parece estar relacionada a uma hiperatividade do SNP e por uma tentativa em vencer a RI, aumentando o tamanho das ilhotas, enquanto o menor número deve relacionar-se ao processo de necrose desencadeado pela ação de citocinas pró-inflamatórias (DONATH et al., 2005; LARSEN et al., 2007; 2005; VIVAS; MARTINES; IZQUIERDO, 2011). Outras pesquisas demonstraram que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando adicionados em conjunto à cultura de células  $\beta$  de ratos,

conseguem ativar uma importante via apoptótica denominada via p53/p21 (WANG; GUAN; YANG, 2010).

Na obesidade o processo inflamatório crônico leva também em algumas situações ao comprometimento da ação secretória das ilhotas de Langherans, principalmente no que diz respeito à secreção de insulina pela célula  $\beta$ . Este processo de inflamação nas ilhotas deve estar atrelado à hiperglicemia, levando ao estresse oxidativo e também com deposição de SAA (DONATH et al., 2005).

Existem também evidências de que algumas citocinas podem ter ação destrutiva sobre as células  $\beta$  pancreáticas. Algumas destas citocinas podem ser produzidas em outros locais como baço e tecido adiposo, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , e outras, como a IL-1 $\beta$ , podem ser provenientes destes outros tecidos, assim como podem ser produzidas e secretadas e também da própria célula  $\beta$ . Dentre os diversos marcadores inflamatórios encontrados no processo inflamatório pancreático, podemos destacar a IL-1 $\beta$ , que dependendo da sua concentração produz disfunção das células beta, podendo agir sozinha ou associada a outras citocinas, tais como, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (POULSEN, 1996). Os radicais livres de oxigênio têm sido sugeridos mediar a ação tóxica de IL-1 $\beta$  ou citocinas conjugadas em células  $\beta$  pancreáticas levando a lise celular. No entanto o principal mecanismo envolvido com a destruição das células  $\beta$  e que levam à resistência à insulina, provocado pelas citocinas, principalmente IL-1  $\beta$  e IFN- $\gamma$ , é através da produção de Óxido Nítrico (ON). Alguns efeitos nocivos mais importantes do ON nas ilhotas são a inibição da enzima mitocondrial aconitase e a indução de dano no DNA nuclear. Seu acúmulo no RE causa diminuição nas concentrações de cálcio e inibição da síntese de proteínas chaperonas, o que dificulta os mecanismos de defesa da célula  $\beta$  e amplifica as vias pró-apoptóticas (CNOP et al. , 2005; EIZIRICK et al., 1993). Tendo em vista o importante papel do ON no processo inflamatório, bem como, nas disfunções das ilhotas pancreáticas utilizamos o L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), principalmente a fração iNOS para avaliar o potencial papel do ON sobre as alterações secretórias encontradas em ilhotas de ratos MSG-obesos. Em ilhotas de ratos magros o bloqueio da produção de ON pela adição de L-NAME elevou a secreção de insulina estimulada por glicose. Akesson et al. em 1996, utilizando ratos magros e a mesma técnica para isolamento e incubação de ilhotas do presente estudo obtiveram resultados semelhantes aos nossos em animais magros, tendo aumento na secreção de insulina. Todavia, o efeito do ON

parece ser contrário em ilhotas do grupo MSG-obeso visto que, a adição de L-NAME levou a inibição da secreção de insulina estimulada por glicose. Este estudo é o primeiro a avaliar o papel do L-NAME sobre o ON no controle secretor de insulina em ilhotas de ratos MSG-obesos, demonstrando que existem alterações em seus efeitos. Um estudo de Roberts et al. em 2005 mostrou que o tratamento em ratos com dieta rica em gordura e açúcares (que mimetiza a dieta usada pela população ocidental) levou a diminuição da expressão e atividade da iNOS, resultando em uma menor resposta nos vasos à acetilcolina, devido a diminuição da produção de ON. Conforme Bedoya et al. em 2012 altas concentrações de ON tem importante papel no processo inflamatório e apoptótico das ilhotas pancreáticas, enquanto baixas concentrações tem efeito protetor sobre as células  $\beta$  e melhoram a secreção de insulina. Sugere-se então, que o modelo MSG tenha concentrações baixas de ON nas ilhotas pancreáticas, apesar de uma possível instalação de processo inflamatório local. Com a adição de um bloqueador da síntese da iNOS pode ter ocorrido a redução total do ON e com isso comprometido a secreção de insulina, já que quantidades baixas deste radical são necessárias para a efetiva ação da célula  $\beta$  pancreática.

Há necessidade de estudos futuros no modelo MSG, para averiguação da ação do L-NAME e sua efetividade sobre o bloqueio da síntese da iNOS neste modelo de obesidade.

## 5.2 O EFEITO DA ESPLENECTOMIA SOBRE A OBESIDADE

Conforme demonstraram nossos dados a esplenectomia não alterou os padrões biométricos, bem como o peso da maioria dos órgãos. Todavia, nosso estudo demonstra pela primeira vez que a esplenectomia pode afetar o peso final da glândula adrenal. A glândula adrenal é dividida em córtex e medula, sendo o córtex responsável por sintetizar hormônios importantes no processo metabólico, como a aldosterona e o cortisol e a medula responsável pela síntese de adrenalina e noradrenalina (componentes do SNS). Em situação de estresse, como exercício físico ou frio ocorre um aumento do eixo simpato-adrenal (ASTRAND et al., 2006). Embora não haja dados na literatura que façam esta avaliação no modelo estudado relacionando-o com a esplenectomia, sugere-se que isto se deva a um aumento da atividade simpática em ambos os grupos após a cirurgia. Sabe-se que no baço e nos

linfonodos, as fibras simpáticas modulam a reação inata imunológica e a magnitude do tempo das respostas imunológicas adquiridas, particularmente a escolha da resposta imune celular (Th1) e ou resposta imune humoral (Th2), (HUSTON et al. 2012). Sendo assim, a retirada do baço pode ter levado a alterações nas ações autonômicas de um modo geral e ter aumentado a atividade simpática sobre a glândula adrenal.

A esplenectomia diminui a ingesta alimentar em animais MSG-ESPL. Estes dados são similares aos obtidos por Gotho et al. em 2012, onde foram avaliados ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica submetidos a esplenectomia. Segundo os autores o baço é local principal da produção de IL10, uma importante citocina anti-inflamatória que pode ter ação em núcleos hipotalâmicos reguladores da ingesta alimentar. Adicionalmente, estudo de Velloso em 2006 claramente demonstra que durante a obesidade pode ocorrer resistência a agentes anorexígenos, tais como, insulina e leptina mediado por processo inflamatório hipotalâmico, levando a hiperfagia. Deste modo, nós sugerimos que a esplenectomia tenha alterado o perfil de citocinas hipotalâmicas e favorecido um maior efeito anorexigênico. Futuros estudos serão necessários para avaliar esta hipótese em nosso modelo de obesidade.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, a esplenectomia promoveu no grupo MSG diminuição significativa nos valores da glicose quando comparado ao MSG-NO. Tal dado pode ser explicado pela diminuição do processo inflamatório no tecido adiposo, levando a uma maior responsividade deste tecido à insulina e também pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias produzidas por este mesmo tecido (POULSEN, 1996). Como consequência adicional a esta diminuição do quadro de inflamação crônica, decorrente da retirada do baço e da diminuição da RI periférica, houve também uma diminuição do perfil hipersecretório de insulina característico do modelo MSG. Estudos realizados em ratos com obesidade induzida com dieta hipercalórica mostraram um aumento de citocinas pró-inflamatórias, tal como IL-6 e TNF- $\alpha$  no baço (PESTKA et al., 2004). Corroborando com o presente trabalho, um estudo realizado por Carvalho<sup>b</sup> em 2012, onde foi feita a esplenectomia em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, houve grande

aumento na sensibilidade à insulina, refletida por redução na glicemia, quando comparado com camundongos obesos não operados.

Em relação às modificações na histomorfologia dos adipócitos provocadas pela esplenectomia em MSG-ESPL, bem como diminuição significativa do tamanho dos adipócitos de todos os depósitos de gordura relacionados ao tecido adiposo branco, existe também uma possível relação com a diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo baço e seus efeitos deletérios sobre o tecido adiposo, bem como a diminuição da secreção de insulina (LAUNOIS, 2004; RAMOS, et al., 2010). Nossa hipótese de que a melhora na resistência a insulina e redução no processo inflamatório do tecido adiposo estão envolvidas na redução da hipertrofia dos adipócitos pode ser corroborada com análise de diferentes estudos. Por exemplo, estudo realizado por Borges et al. em 2007 avaliaram o impacto do tratamento da obesidade nas adipocinas e no estado inflamatório em pacientes hipertensas com obesidade central. Durante um período de 16 semanas, foram avaliadas 24 mulheres hipertensas, com idade entre 18 e 65 anos. Os autores verificaram que uma redução no peso superior a 5% provocou uma redução nos marcadores, melhorando o perfil inflamatório, além de diminuir a resistência insulínica. Outro estudo realizado em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica, submetidos ao exercício físico, mostrou evidente a diminuição da hipertrofia dos adipócitos nos animais obesos exercitados. Os autores relacionam a diminuição da hipertrofia à posterior melhora da sensibilidade à insulina. Este mesmo estudo mostra a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo visceral destes animais, bem como aumento da expressão de IL-10, que tem atividade anti-inflamatória (COSTA et al, 2011). Como consequência da retirada do baço ocorre a volta ao equilíbrio entre os processos de lipogênese e lipólise, levando a uma melhor responsividade à insulina (GOTOH et al, 2012<sup>b</sup>). Em outro estudo onde foi realizada esplenectomia em ratos com dieta hiperlipídica também foi verificado que com a diminuição do processo de hipertrofia dos adipócitos ocorre diminuição também da produção das citocinas pró-inflamatórias ali produzidas, sendo um processo auto-regulatório (CARVALHO et al., 2012<sup>b</sup>). Apesar de não terem sido dosadas em nosso trabalho, podemos sugerir que o aumento das citocinas pró-inflamatórias de ação autócrina no tecido adiposo, culminava em RI neste tecido. Sugere-se também que com a diminuição do quadro

de inflamação se estabelece um aumento no número de adipócitos, por diminuição dos processos lesivos a este tecido como a necrose. Confirmando estes dados e estas possibilidades estudos realizados por Hotamisligil et al. em 1995 e por Kern et al. 1995 demonstraram que TNF- $\alpha$  tinha sua expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, sendo este aumento relacionado à resistência à insulina. Adicionalmente, estudos também demonstraram que elevados níveis de TNF- $\alpha$  são encontrados no músculo e tecido adiposo de humanos obesos. Estudos com a secreção de TNF- $\alpha$  pelos adipócitos também revelam correlação desta com o tamanho destas células secretoras: quanto maior os adipócitos, maior é a secreção da citocinas (YANG et al., 2004). Com o possível aumento da atividade do SNS e o aumento da produção das catecolaminas ligadas a ele, ocorre aumento da lipólise, diminuindo o tamanho dos adipócitos. É também importante observar que com a diminuição da ingesta alimentar, observada no presente estudo, deve ocorrer também diminuição do substrato para adipogênese (LAFONTAN; LANGIN, 2009).

Todavia, nosso estudo também demonstrou que em ambos os grupos experimentais houve aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol com a esplenectomia. Em estudo realizado em ratos Wistar machos magros, com peso entre 273 g e 427 g foi realizada a coleta e dosagem de colesterol e triglicerídeos plasmáticos antes do processo cirúrgico, sendo então realizada esplenectomia. Após a esplenectomia foi verificado aumento significativo nos valores de colesterol e triglicerídeos em relação aos animais não operados (PAULO et al., 2007). Algumas teorias foram propostas para explicar os possíveis mecanismos de regulação de lipídeos plasmáticos pelo baço. Alguns autores propõem que o baço possa ser um possível reservatório de lipídeos que os mantém em seu interior em situações normais e de esplenomegalia. Este papel do baço pode ser evidenciado na esplenomegalia, onde ocorre um aumento da fagocitose de lipídeos e macrófagos esplênicos podem acumular uma maior quantidade de gordura com consequente hipolipidemia plasmática. De acordo com estes autores, depois da esplenectomia total o inverso acontece, podendo provocar aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos (ALBERTI et al., 2012; FATOUROS et al., 1995).



A análise do hemograma também foi alterada pela esplenectomia, conforme demonstraram nossos dados. Nosso estudo encontrou aumento significativo do total de hemácias no plasma dos animais do grupo CON-ESPL em relação ao CON-NO. O presente estudo mostrou-se coerente com um estudo realizado por Brendolan et al. em 2007. Segundo os autores o aumento de hemácias pode ser atribuído ao papel do baço como órgão filtrante volumoso por onde circulam cerca de 4% do volume sanguíneo corporal por minuto, atuando na remoção de eritrócitos alterados e senescentes. Deste modo, é possível que após a sua retirada tenha ocorrido acúmulo destas células, aumentando a sua concentração plasmática. Quanto aos leucócitos, o que se verificou foi um aumento significativo de número tanto no grupo MSG-ESPL quanto no CON-ESPL em relação aos seus respectivos grupos NO, podendo tal fato também ser atrelado à retirada do baço, diminuindo assim a retirada destas células quando senescentes. Estes dados também são coerentes com o estudo de Brendolan et al. em 2007. No entanto observa-se uma diminuição de granulócitos nos animais MSG-ESPL em relação ao MSG-NO, podendo ser este dado atrelado à diminuição do processo inflamatório. Corroborando com nossa hipótese um estudo de Sartorelli et al em 2009, onde foi avaliada a relação de diferentes tipos de leucócitos, pode ser verificado que os granulócitos podem ser marcadores sensíveis da inflamação e responsáveis pela liberação de grande quantidade de radicais superóxido.

No presente estudo a esplenectomia reduziu a hipersecreção de insulina no modelo MSG, já que houve redução significativa destes valores. Como este modelo de obesidade tem uma característica atividade simpática diminuída, conforme evidenciado em trabalho de Balbo et al. em 2007, através da vagotomia, é possível atribuir estes resultados à uma possível melhora na atividade simpática e diminuição da atuação do SNP. Embora não haja dados na literatura referentes aos efeitos da esplenectomia neste modelo e à produção de insulina, há necessidade de estudos posteriores comprovando tal hipótese. Trabalho realizado por Carvalho em 2012<sup>b</sup> avaliou os efeitos da esplenectomia em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Neste estudo camundongos obesos esplenectomizados apresentaram aumento na sensibilidade à insulina, refletida por redução na glicemia, insulinemia e redução dos níveis de TNF- $\alpha$  circulante quando comparado com camundongos obesos não operados. Tendo as citocinas envolvimento direto com o

processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas, sugere-se então que a esplenectomia possa ter reduzido o processo inflamatório no pâncreas.

Na histomorfologia do pâncreas ficou evidenciado que a esplenectomia foi capaz de reduzir a hipertrofia das ilhotas pancreáticas, e aumentar seu número no MSG-ESPL. Não há dados na literatura que relacionem efeitos da esplenectomia sobre a histologia do pâncreas endócrino. No entanto sabe-se de estudos recentes realizados por Leite et al. em 2013, que a natação regular promove diminuição e a hipertrofia de ilhotas pancreáticas. Segundo os autores deste estudo a melhora na hipertrofia em ilhotas de ratos MSG-obesos com o exercício físico é atribuída a melhora da RI, bem como, a um possível rearranjo da atividade autonômica para o pâncreas endócrino. Nosso estudo também demonstrou melhora da RI, decorrente do processo cirúrgico, este fato também deve ter papel crucial para a diminuição da hipertrofia. A esplenectomia pode também ter alterado a atividade autonômica nas ilhotas pancreáticas, elevando a atividade do SNS. Assim consideramos que a retirada do baço também possa exercer este efeito. Adicionalmente é provável que a esplenectomia tenha reduzido o processo inflamatório no pâncreas de ratos MSG-obesos. De acordo com estudo realizado por Donath et al. em 2005 foi constatado que a exposição de ilhotas humanas em cultura durante vários dias na presença de  $IL-1\beta + TNF-\alpha + IFN-\gamma$  também induzem a alterações no tamanho e funcionamento na célula  $\beta$ . Poderíamos então relacionar a retirada do baço, com a mudança do perfil de linfócitos Th1 circulantes e conseqüente diminuição de citocinas pró-inflamatórias no pâncreas (GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004). Também é possível que com a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo e pelo baço, haja uma diminuição no processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas, o que melhora o perfil secretório das mesmas, evidenciado também neste estudo. Corroborando com nossos resultados um trabalho realizado em ratos MSG-obesos por Liu et al. em 2011, onde foi utilizado fenofibrato, como tentativa de manutenção da homeostase glicêmica, foi observado que a melhora dos valores de glicemia observados estavam relacionados à secreção de insulina pelas ilhotas, havendo uma relação com a diminuição do processo inflamatório nas ilhotas, promovido pelo fármaco utilizado, corroborando com nossos resultados e a hipótese proposta.

Com relação ao aumento do número das ilhotas pancreáticas com a esplenectomia, há necessidade de estudos futuros, dosando citocinas pró-

inflamatórias e anti-inflamatórias no pâncreas, bem como iNOS, reguladora do número de ilhotas, para se ter inter-relação entre o processo de esplenectomia e a possível diminuição destes fatores, que podem ser determinantes para o processo de necrose e conseqüente diminuição do número de ilhotas (CNOP et al. , 2005).

Em nosso estudo na incubação de ilhotas com L-NAME de animais MSG-ESPL, pode-se verificar melhora na secreção de insulina. Sugere-se então a esplenectomia tenha levado os níveis de ON nas ilhotas semelhantes àqueles encontrados em animais magros. Com a adição do L-NAME estes valores passaram a ser menores, levando ao efeito positivo das baixas concentrações de ON, e melhora da secreção de insulina nos animais MSG-ESPL (BEDOYA et al., 2012; LIU et al., 2011).

## 6. CONCLUSÃO:

Houve caracterização do modelo MSG.

A esplenectomia foi capaz de reduzir a hipertrofia e aumentar a hiperplasia de adipócitos e de ilhotas pancreáticas.

A esplenectomia melhora a sensibilidade à insulina.

A esplenectomia diminui a secreção de insulina plasmática no MSG.

## 7-REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K, LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **Journal of Biology and Chemistry**, v. 275, p. 9047-9054, 2000.
- AGUIRRE, V. et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **Journal of Biology and Chemistry**, v.277, p. 1531-1537, 2002.
- AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p.327-32, 2000.
- AKESSON, B. et al. Interaction of the islet nitric oxide system with L-arginine-induced secretion of insulin and glucagon in mice. **Brkish Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 758 764, 1996.
- AKESSON, B. et al. Islet constitutive nitric oxide synthase and glucose regulation of insulin release in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 163, p. 39–48, 1999.
- ALAM, I.; NG, T.P.; LARBI, A. Does Inflammation Determine Whether Obesity Is Metabolically Healthy or Unhealthy? The Aging Perspective. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2012, p. 1-14, 2012.
- ALBERTI, L.R. et al. Is there a relationship between lipids metabolism and splenic surgeries? **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 751-756, 2012
- ANDRADE, I. Central but not peripheral glucoprivation is impaired in monosodium glutamate-treated rats. **Neuroscience Letters**, v.398, n.1-2, p.6-11. 2006.
- ANTONY, J.G. et al. Association of Hematological Parameters with Insulin Resistance and Cell Dysfunction in Nondiabetic Subjects, **Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 94, n.10, p. 3824–3832, 2009.
- AQUINO, N. S. **Efeito de um inibidor do TLR-4 na sensibilidade e sinalização de insulina em camundongos obesos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica)- Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Diabetes Mellitus and the b Cell: The Last Ten Years. **Cell**, v. 148, p. 1160-1171, 2012.
- ASTRAND, P. et al. **Tratado de Fisiologia do trabalho: Bases Fisiológicas do Exercício**: 4ª edição, BRASIL, 2006.

BACH-NGOHOU, K. et al. Apolipoprotein E kinetics: influence of insulin resistance and type 2 diabetes. **International Journal of Obesity**, v.26, p.1451-1458, 2002.

BACKLED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.101, n.44, p. 1571-8, 2004.

BALBO, S.L. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.108, p. 291-296, 2000.

BALBO, S.L. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p.142-148, 2007.

BARTNESS, T. J.; SONG, C. K.; Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p.1655–1672, 2007.

BARTHSON et al. Cytokines tumor necrosis factor alpha and interferon gamma induce pancreatic beta cell apoptosis through-STAT1 mediated Bim protein activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.39632-39643, 2011.

BASTARD, J.P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BEDOYA, F.J. et al. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell survival by nitric oxide. **Landes Bioscience-Islets**, v. 4, n. 2, p. 108-118, 2012.

BERNARDIS, L. L.; B. D. PATTERSON. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal Endocrinology**, v.40, n.4, Apr, p.527-8. 1968.

BERNHARDT, W. M.; ECKARDT, K. U. Physiological basis for the use of erythropoietin in critically ill patients at risk for acute kidney injury. **Current Opinion in Critical Care**, n.14, p. 621-626, 2008.

BEST, L.; DUNLOP, M.; MAILASSE, W.J. Phospholipid metabolism in pancreatic islets. **Experientia**, v. 40, p.1085-91, 1984.

BEZAIRE, V. et al. Contribution of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase to lipolysis in human hMADS adipocytes. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 18282-18291, 2009.

BICKEL, C. et al. Relation of markers of inflammation (C-reactive protein, fibrinogen, von Willebrand factor, and leukocyte count) and statin therapy to long-term mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease. **American Journal of Cardiology**, v.89, p.901–908, 2002.

BLACKBURN, P. et al. Postprandial hyperlipidemia: another correlate of the “hypertriglyceridemic waist” phenotype in men. **Atherosclerosis**, v. 171, p. 327-336, 2003.

BOHNSACK, J.F.; BROWN, E.J. The role of the spleen in resistance to infection. **Annual Review of Medicine**, v. 37, p.49–59, 1986.

BONORA, E. et al. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. **Diabetes & Metabolism**, v. 13, p. 116-121, 1987.

BORGES, R.L. et al. Impacto da Perda de Peso nas Adipocitocinas, na Proteína C-Reativa e na Sensibilidade à Insulina em Mulheres Hipertensas com Obesidade Central. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 89, n. 6, p. 409-414, 2007.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.40, p.149-55, 1996.

BOULTON, T.G. et al. ERKs: a family of protein-serine/ threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell**, v. 65, p. 663-75, 1991.

BOUSKRA, D. et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, v. 456, n.7221, p.507-510, 2008.

BRENDOLAN, A. et al. Development and function of the mammalian spleen. **Bioessays**, v. 29, n. 2, p. 166-77, 2007.

BROZINICK, J.T.; Jr. ROBERTS, B.R.; DOHM, G.L. Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. **Diabetes**, v. 52, p. 935-41, 2003.

BURKHARD, G. Implications of blood glucose, insulin resistance and  $\beta$ -cell function in impaired glucose tolerance. **Diabetes research Clinical and Practical**, v. 40, n. 1, p. 15-20, 1998.

BUSSO, N. et al. Leptin Signaling Deficiency Impairs Humoral and Cellular Immune Responses and Attenuates Experimental Arthritis. **The Journal of Immunology**, v.168, p. 875-882, 2002.

CAMERON, D.P.; CUTBUSH, L.; OPAT, F. Effects of monosodium glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism in insulin secretion. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 5, p. 41-51, 1978.

CAMPFIELD, L.A. et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 546-549, 1995.

CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG**, v.113, n.10, p.1141-1147, 2006.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiology Review**, v. 84, p. 277-359, 2004.

CARVALHEIRA, J.B.C. ; ZECCCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CARVALHO, B. M. et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2823–34, 2012<sup>a</sup>.

CARVALHO, B. M. **Influence of gut microbiota and splenectomy over the obesity-induced insulin resistance**. 2012. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica-Resumo)- Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012<sup>b</sup>.

CHEATHAM, B.; KAHN, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrinology Review**, v. 16, p. 117-38, 1995.

CHEHAB, F.F.; LIM, M.E., LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetic**, v.12, p. 318-20, 1996.

CHIANG, S.H. et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, v. 410, p. 944-8, 2001.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 2347-2355, 2005.



CLEMENT, K.; LANGIN, D.; Regulation of inflammation related genes in human adipose tissue. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 4, p. 422–430, 2007.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, p. 97-107, 2005.

COOPAK, S.W., et al. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after mixed meal. **Metabolism Clinical Experience**, v.41, n. 3, p. 264-272, 1992.

COSTA, A.C.P. et al. Resistive training reduces inflammation in skeletal muscle and improves the peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.55, n. 2, p. 155-163, 2011.

COYLE, R. R. et al. Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanisms of action. **Neuroscience Research Program Bull**, v. 19, n.4, p. 331-427, 1981.

CUNHA, N.V. et al. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sciences**, v.87, n.11–12, p.375–381, 2010.

CUNHA, N. V. et al. COX-2 inhibition does not reverse the increased sympathetic modulation in MSG obese rats. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, 165, n. 2, p. 201–4, 2011.

CYPES, A.M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New England Journal of Medicine**, v.360, p.1509–1517, 2009.

CZECH, M.P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 22, n. 274, p.1865-8, 1999.

DAS, V.A.; ROBINSON, R.; PAULOSE, C.S. Enhance  $\beta$ -adrenergic receptors in de brain and pancreas during pancreatic regeneration in weanling rats. **Molecular and Cellular biochemistry**, v. 289, p. 11-19, 2006.

DELANEYA, C.A. Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1/3 in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the comet assay. **Febs Letters**, v. 333, n. 291-295, 1993.

DELZENNE, N.M.; CANI, P.D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. **Annual Review Nutrition**, v. 31, p.15-31, 2011.

DINARELLO, C. A. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 732–734, 2000.

DIRAISON, F. et al. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. **American Journal Physiology and Endocrinology of Metabolism**, v. 282, p. 46-51, 2002.

DOLNIKOFF, M. et al. Decrease lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of the Obesity**, v. 25, n. 3, p. 426-433, 2001.

DONATH, M.Y. et al. Mechanisms of beta cell death in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. 108–113, 2005.

EIKELIS, N. et al. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1072-9, 2003.

EIZIRICK, D. L. et al. Cytokines Suppress Human Islet Function Irrespective of Their Effects on Nitric Oxide Generation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 333, n. 3, p. 291-295, 1993.

EMANUELLI, B. et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. **Journal Biology and Chemistry**, v. 276, p. 47944-47949, 2001.

FAIN, J.N. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1-20, 2010.

FAROOQI S, O. S. Genetics of obesity in humans. **Endocrinology Reviw**, v. 27, n. 7, p. 710-8, 2006.

FATOUROS, M. D. et al. Role of the spleen in lipid metabolism. **Brasilian Journal of Surgeri**, v. 82, 1675-1677, 1995.

FEARNLEY, G. R.; VINCENT, C. T.; CHAKRABARTI, R. Reduction of blood fibrinolytic activity in diabetes mellitus by insulin. **Lancet**, v. 2, p. 1067. 1959.

FUKUHARA, A. et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**, v. 307, p. 426-430, 2005.

GINSBERG, H.N.; ZHANG, Y.L.; HERNANDEZ-ONO, A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. **Archive Medical Research**, v. 36, n.3, p. 232-240, 2005.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; ERIKSSON, J.W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. **Acta Physiology Scand**, v. 183, p.13-30, 2005.

GIROIR, B.P. et al. Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 693–98, 1992.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research Immunology**, v. 149, p. 685–8, 1998.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity induced-hypothalamic inflammation. **Journal of neurochemistry**, v. 120, p. 752-764, 2012<sup>a</sup>.

GOTOH, K. et al. Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 1, p.1–10, 2012<sup>b</sup>.

GRASSIOLLI, S. et al. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K<sup>+</sup>ATP channel-dependent but not - independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, v. 30, n. 2, p. 191–196, 2006.

GRASSIOLLI, S.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P.C.F. Muscarinic M2 receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **European journal of pharmacology**, v. 556, n1-3, p.223-228, 2007.

GUMY, A.; LOUIS, JA, LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in The cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitol**, v. 34, p. 433-44.

GUVEN, S.; KUENZI J. A.; MATFIN, G. Diabetes Mellitus. In: PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. **Fisiopatologia**. Rio de Janeiro, 2004. Guanabara Koogan S.A, 2004. p.897 – 921.

HALAAS, J.L. et al. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 543-546, 1995.

HALL, J.E. Insulina, Glucagon e Diabetes Mellitus. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 987-1004, 2011.

HALLER, H., LEONHARDT, W., HANEFELD, M., JULIUS, U. Relationship between adipocyte hypertrophy and metabolic disturbances. **Endocrinologie**, v.74, p.63–72, 1979.

HARA et al. An improved method for the isolation of islets from the rat pancreas. **Experimntal and Clinical Endocrinology**, v. 2, p. 171-175, 1988.

HARISHANKAR, N. et al. Obesity associated pathophysiological & histological changes in WNIN obese mutant rats. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 9, p. 330-340, 2011.

HAVEL, P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/ lipid metabolism. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p.143-51, 2004.

HARMELEN, V.V. et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. **Diabetes**, v. 47, p. 913-917, 1998.

HIRABARA, S.M. et al. Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 57-66, 2006.

HIRATA, A. E. et al. Monosodium glutamate (MSG) – obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal Medicine and Biology Research**, v. 30, p. 671-4, 1997.

HOLLENBERG, C.H. The origin and glyceride distribution of fatty acids in rat adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 45, p. 205–216, 1966.

HORVATH, T.L. The hardship of obesity: a softwired hypothalamus. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 561-565, 2005.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.

HOWARD, J. K. et al. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. **Nature Medicine**, v. 10, p. 734-738, 2004.

HU, F.B. Diet lifestyle and risk of type 2 diabetes mellitus in women. **New England Journal Medical**, v. 345, n. 11, p. 790-792, 2001.

HUSTON, J.M. The Vagus Nerve and the Inflammatory Reflex: Wandering on a New Treatment Paradigm for Systemic Inflammation and Sepsis. **Surgical Infections**, v. 13, n. 4, p. 187-192, 2012

IMBEAULT, P. et al. Relationship of visceral adipose tissue to metabolic risk factors for coronary heart disease: is there a contribution of subcutaneous cell hypertrophy? **Metabolism**, v. 48, p. 355–362, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em : <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009/POFpublicacao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2013.

ISOMAA, B. et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the Metabolic Syndrome. **Diabetes Care**, v. 24, p. 683-9, 2001.

JAMES, P. T.; RIGBY, N.; LEACH, R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v. 11, n. 1, p. 3–8, 2004.

JOYEUX-FAURE, M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? **Perspectives in Pharmacology**, v. 323, n.3, p. 759-762, 2007.

KABURAGI, Y et al. Insulin-independent and wortmannin-resistant targeting of IRS-3 to the plasma membrane via its pleckstrin homology domain mediates a different interaction with the insulin receptor from that of IRS-1. **Diabetology**, v. 44, n. 8, p. 992-1004, 2001.

KAHN, B. B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n.4, p. 4730-481, 2000.

KALRA, S.P. et al. Appetite and body weight regulation: is it all in the brain? **Neuron**, v.19, p. 227-230, 1997.

KALRA, S.P. et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 1, p. 68-100, 1999.

KALSAIT, R.P. et al. Role of C-Reactive Protein in the Development of Atherosclerosis in Diet-induced Lipidemia in Albino Rats. **Tropical Journal of Pharmacology Research**, v. 10, n.1, p. 41-45, 2011.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, 2006.

KATAGIRI, H.; YAMADA, T.; OKA, Y. Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. **Circ. Res**, 7. v. 101, p. 27–39, 2007.

KELLEY, D.E. et al. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, p. 278, p. 941-948, 2000.

KERN, P. A. et al . The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2111-2119, 1995.

KERSHAW, E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Jornal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2548–2556, 2004.

KIM, J.A.; PARK, H.S. White blood cell count and abdominal fat distribution in female obese adolescents. **Metabolism**, v. 57, p.1375-1379, 2008.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. An immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia** 48:1038–1050, 2005.

KONING, L. et al. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. **European Heart Journal**, v. 28, n. 7, p. 850-856, 2007.

KONTUREK, S.J. Brain gut axis and its role in the control of food intake. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, p. 137-54, 2004.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p.635-643, 2000.

KOZAK, L.O.; ANUNCIADO-KOZA, R. UCP1: its involmente and utility in obesity. **International Journal of Obesity**, v. 32, n.7, p132-138, 2008.

KRONGRAD, A.S. et al. Central Effects of Monosodium Glutamate on Feeding Behavior in Adult Long-Evans Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43. p. 881-886, 1992.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v.16, p. 35-9, 1967.

LANDMAN, R.E. et al. Endotoxin Stimulates Leptin in the Human and Nonhuman Primate. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1285–1291, 2003.

LARSEN, C. M. et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 1517–1526, 2007.

LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 275–297, 2009.

LAYCHOCK, R.G.; MODICA, M.E.; CAVANAUGH, C.T. L-Arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine: nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. n. 129, p. 3043- 3052, 1991.

LEHRKE, M.M. P. et al. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. **PLoS Medicine**, v. 1, n 2, p.161-168, 2004.

LEITE, N.C. et al. Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Islets from MSG-Treated Obese Rats Subjected to Swimming Training. **Cell Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 242-256, 2013.

LE MARCHAND, Y.; FREYCHET, P.; JEANRENAUD, B. Longitudinal study on the establishment of insulin resistance in hypothalamic obese mice. **Endocrinology**, v.102, p. 74-85, 1978.

LIU, S. et al. Long-term fenofibrate treatment impaired glucose-stimulated insulin secretion and upregulated pancreatic NF-kappa B and iNOS expression in monosodium glutamate-induced obese rats: Is that a latent disadvantage? **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n.176, p. 1-11, 2011.

LYON, C.J. et al. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology**, v.144, n. 6p. 2195-2200, 2003.

LORDEN, J.F.; CAUDLE, A. Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. **Neurobehavioral toxicology and teratology**, v. 8, n. 5, p. 509-19, 1986.

LUNDGREN, M. et al. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia.' **Diabetologia**, v.50, p.625–633, 2007.

MACHADO, U.F.; SHIMIZU, Y.; SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose and monosodium glutamate-treated mice. **Hormone and Metabolic Research**, 25: 462-465, 1993.

MACHO, L. et al. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiology Research**, v.49, n. 1, p.79-85, 2000.

MALAISSSE, W.J. Glucose-sensing by the pancreatic  $\beta$ -cell: the mitochondrial part. **Journal of Biochemistry**, v. 24, p. 693-701, 1992.

MANCO, M. Endotoxin as a missed link among all the metabolic abnormalities in the metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 1, p. 1-36, 2009.

MARGALET, C.V.S. et al. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 133, n. 1, p. 11–19, 2003.

MARK, A.L.; CORREIA, M.; MORGAN, D.A.; SHAFFER, R.A.; HAYNES W.G. State-of-the-art-lecture: obesity-induced hypertension: new concepts from the emerging biology of obesity. **Hypertension**, v. 33, p. 537-41, 1999.

MATOS, A.F.G.; MOREIRA, R.O.; GUEDES, E.P. Aspectos Neuroendócrinos da Síndrome Metabólica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 47, n. 4, p. 410-421, 2003.

MATSCHINSKY, F.M. Banting Lecture 1995: a lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v.45, p.223-41, 1996.

MEBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature**, v. 5, p. 606-616, 2005.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Review Immunology**, v. 1, p. 135-145, 2001.

MEIGS, J.B. et al. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 2906-2912, 2006.

MILES, J.M.; JENSEN, M.D. Counterpoint: visceral adiposity is not causally related to insulin resistance. **Diabetes Care**, v.28, p. 2326-8, 2005.

MIRANDA, R.A. et al. Swim training of monosodium L-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. **Endocrine**, p. 1-8, 2012.



MORTON, G.J.; CUMMINGS, D.E.; BASKIN, D.G.; BARSH, G.S.; SCHWARTZ, M.W.; Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, p. 289–295, 2006.

MUZUMDAR, R. et al. Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. **Fasesb Journal**, v. 17, n. 9, p. 1130-1132, 2003.

NEISSH, A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 65-80, 2009.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 880, p. 719-721, 1969.

ORTEGA, F.J. et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. **Obesity**, v.18, p.13-20, 2010.

ORTIS, F et al. Differential usage of NF $\kappa$ B activating signals by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in pancreatic beta-cell. **FEBS letters**, v. 586, p.984-89, 2012

OTTO, T. C.; LANE, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4, p. 229-42, 2005.

PADILLA, N.D. et al. Rat C-reactive protein activates the autologous complement system, **Immunology**, v. 109, p. 564-71, 2006.

PARADISI, G. et al. Dual energy x-ray absorptiometry assessment of fat mass distribution and its association with the insulin resistance syndrome. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1310-1317, 1999.

PARK, S.; HONG, S.M.; SUNG, S.R. Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats. **Life Sciences**, v.82, n.9-10, p.503-511, 2008.

PATTI, M.E.; KAHN, C.R. The insulin receptor — a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, p. 89-109, 1998.

PAULO, I.C.A.L. et al. Lípidos plasmáticos em ratos após cirurgia esplênica – efeito de dois tipos de dieta. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 2, p. 171-177, 2007.

PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; LANCHETA Jr, A.H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivo Brasileiro de endocrinologia e metabolismo**, v. 47, n.2, p. 111-127, 2003.

PERSAUD, S.J.; JONES, P.M.; HOWELL, S.L. The role of protein kinase C in insulin secretion. In: Flatt P, ed. **Nutrient Regulation of Insulin Secretion**, P. 247-270, 1992.

PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 165-9, 2000.

PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review Immunology**. 2004. v. 22. p. 929–979.

PI-SUNYER, F. Weight and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n.3, p.426-429, 1996.

PLUM, et al. Transgenic and knockout mice in diabetes research: Novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. **Physiology**, v. 20, p. 152-61, 2005.

POULSEN, T.M. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v. 39, p.1005–1029 1996.

RAMOS, R.R. Monosodium Glutamate Neonatal Intoxication Associated with Obesity in Adult Stage is Characterized by Chronic Inflammation and Increased mRNA Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Mice, **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 406–413, 2010.

RIBON, V.; SALTIEL, A.R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemistry Journal**, v. 324, p. 839-845, 1997.

ROBERTS, C.K. et al. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. **Journal of Applied Physiology**, v.98, n. 1, p. 203-210, 2005.

ROCHA, V.Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nature Review of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 399-409, 2009.

ROMAGNANI, S. Regulation of the T cell response. **Clinical Experience of Allergy**, v. 36, p. 1357-66, 2005.

ROITT, I. et al. **Immunology** . 6. Ed Manole, 2001

RUDERMAN, N. et al. Activation of phosphatidylinositol 3- kinase by insulin. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 1411-5, 1990.

RUI, L. et al. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. **Journal Biology and Chemistry**, v. 277, p. 42394-42398, 2002.

SAAD, M.J. et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **Journal Biology and Chemistry**, v. 271, p. 22100-4, 1996.

SAINSBURY, A.; COONEY, G.J.; HERZOG, H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. **Best Practical Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 623-37, 2002.

SARTORELLI, C.F. et al. Assessment of inflammation on the release of oxygen radicals by granulocytes in chronic uncontrolled asthma. **Jornal de Pediatria**, v.85, n. 2, p. 143-148, 2009.

SASAKI, Y. et al., Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. **Life Sciences**, v.85, n. 13-14, p.490-498, 2009.

SCHUWARTZ, M. W. et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 45, n. 4, p. 531-5, 1996.

SEUFERT, J. et al. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 1999, v. 84, n. 2, p.670-6, 1999.

SCHMIDT, H.H.; WAGNER, S.; MANNS, M. The spleen as a storage pool in lipid metabolism. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, p. 1069-1072, 1997.

STEINIGER, B.; BARTH, P. Microanatomy and function of the spleen. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biol**, v.151, n. 3, p.1–101, 2000.

STIPANUK, M. **Biochemical, physiological, molecular aspects of human nutrition**. 2a ed. Elsevier Saunders: St Louis, 2006.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 33–9, 2010.

SUN, X.J.; et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 251-62, 1997.

SUN, S.; et al. Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. **Annual Review Nutrition**, v. 32, p. 261–86, 2012.

TAMURA, H. et al. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. **Endocrinology**, v.143, n.9, p. 3268-3275, 2002.

TCHOUKALOVA, Y. D. et al. Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 1, p. 56-63, 2008.

THIRONE, A.C.P. et al. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. **Endocrinology**, v. 145, n.1, p. 281-293, 2004.

TIROSH, A. et al. Adolescent BMI Trajectory and Risk of Diabetes versus Coronary Disease. **New England Journal Medicine**, n. 364, v. 14, p. 1315-1325, 2011.

TOMLINSON, J. W. et al. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. **Endocrinology Review**, v. 5, p.: 831–866, 2004.

VELLOSO, L.A. O Controle Hipotalâmico da Fome e da Termogênese – Implicações no Desenvolvimento da Obesidade, **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 165-176, 2006.

VISSER, M. et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **Journal of the American Medical Association**, v. 282, 2131-5, 1999.

VISSER, M. et al. Lowgradesystemic inflammation in overweight children. **Pediatrics**, v. 107, p.1-13, 2001.

VIVAS, Y.; MARTINEZ-GARCIA, C.; IZQUIERDO, A. et al. Early peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulated genesinvolved in expansion of pancreatic beta cell mass. **BMC medical genomics**, v.4, n.1, p. 1-17, 2011.

VOLTERA, A.F. et al. Efeito da Indução de Obesidade Neuroendócrina sobre a Hemodinâmica Sistêmica e a Função Ventricular Esquerda de Ratos Normotensos. **Arquivo Brasileiro de Endrocrinologia e Metabolismo**, v.52, n.1, p. 47-54, 2008.

WANG, C.; GUAN, Y.; YANG, J. Cytokines in the Progression of Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. **International Journal of Endocrinology**, v. 2010, p. 1-10, 2010.

WEINSBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1. p. 115-24, 2006.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, p.1785-1788, 2003.

WELLEN, K.E; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WEYER,C. et al. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. **Diabetologia**, v.43, p. 1498–1506, 2000.

WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology and Behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 683-701, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report. **Reducing Risks, Promoting Healthy Life**, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and Overweight: Fact Sheet**, n. 311, 2011. Disponivel em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/em/>>. Acesso em: 28 jan. 2013.

YANG, X. et al. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 317, p. 1045–1051, 2004.

YANG, R.Z. et al. Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6. p. 885-894. 2006.

YOSHIZUMI, T. et al. Abdominal fat: standardized technique for measurement at CT. **Radiology**, v. 211, p. 283-286, 1999

ZELEZNA, B. Anorexigenic effect of cholecystokinin in lost but that og CART (Cocain and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice). **Physiological Research/ Academy Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 58, n. 5, p. 717-723, 2009.

ZEYDA, M.; STULNING, T.M. Obesity, inflammation, and insulin resistance- a mini review. **Gerontology**, v. 55, n. 4, p. 379-386, 2009.

ZIMMET, P.; BOYCKO, E.J., COLLIER, G.R. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. **Annual New York Academy Science**, v. 18, n. 892, p. 25-44, 1999.

## 8- ANEXOS

**ANEXO 1. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO ANIMAL**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 17/2012**

Protocolo UEPG – 03482/2012

*Título – “O efeito da espienectomia sobre a obesidade induzida por glutamato monossódico”.*

**Interessado – Dra Sabrina Grassioli**

**Data de Entrada – 21/03/2012**

**Resultado:** Aprovado

**Data/Fraço – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.**  
11/05/2014

**Considerações**

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 80 ratos Wistar.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.**

Professor Dr. Giovanni Marino Favero  
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG