

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SALLY LIECHOCKI

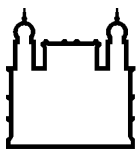
**CARACTERIZAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO E
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA OBESIDADE.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dr. Clarissa Menezes Maya Monteiro

RIO DE JANEIRO

Dezembro, 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autor: SALLY LIECHOCKI

CARACTERIZAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA OBESIDADE.

ORIENTADOR: Prof. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro

Aprovada em: ___13___/___12___/___2013___

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Prof. Dra. Cecília Jacques Gonçalves de Almeida

Prof. Dra. Christianne Bandeira de Melo

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à minha família, em especial aos meus pais e irmão, por todo apoio emocional e financeiro, incentivo e por toda torcida. Obrigada pelo suporte nos momentos de angústia e pela vibração nos momentos de alegria. Dedico este trabalho a vocês!

À Dra. Clarissa M. Maya Monteiro pela orientação, pela confiança depositada, por toda contribuição para meu desenvolvimento profissional e pela amizade. Obrigada por compartilhar comigo tão intensamente a paixão por esse “vício” chamado ciência!

À Dra. Patrícia T. Bozza pela oportunidade fazer parte deste grupo tão rico, pelas discussões e sugestões ao longo deste trabalho. Obrigada.

Ao Dr. Hugo Caire Castro-Faria-Neto, por ter me recebido no seu laboratório. E aos demais pesquisadores do laboratório de Imunofarmacologia, em especial os mais próximos: Dra. Cecília Jacques Gonçalves de Almeida, Dra. Adriana Lima Vallochi e Dr. Válber da Silva Frutuoso. Obrigada pelo incentivo, preocupação e principalmente pelas sugestões e ideias sempre oportunas.

Ao Dr. João Regis Carneiro e a Karina Ribeiro Silva que foram essenciais para a condução deste trabalho e por toda rica contribuição para o desenvolvimento da minha maturidade científica.

A todos os profissionais do Programa Multidisciplinar de Atendimento ao Obeso Mórbido, em especial ao Dr. Antônio Augusto P. de Souza.

Ao Dr. Milton Moraes pela paciência e ajuda com as técnicas de biologia molecular.

Ao “trio parada dura” Roberta N. Xavier (Nara Shara), Carolina Zampier (Sarah Sheeva) e Beatriz Costa (Zabelê). Triste são aqueles que não tiveram a experiência de dividir com vocês, seja um espaço em uma bancada de laboratório ou um cafezinho depois de um dia de trabalho. Sinto-me sortuda por contar com a amizade de vocês. Muito obrigada!

À minha querida amiga e comadre Giselle B. de Lima, que me acompanha desde os tempos de faculdade e que é a principal responsável por me trazer de volta ao intrigante mundo da pesquisa. Obrigada!

Agradeço com todo carinho ao grupo de corpúsculos lipídicos, que além de compartilharem todo conhecimento, trabalho e ajustes de protocolos, foram cúmplices de muitas risadas, bagunças, sessões de “cineimunofar” e das sagradas pausas para o café. Um agradecimento em especial à Gláucia Souza, Narayana Fazolini, Natália Roque, Alan Brito, Raphael Molinaro, Lívia Teixeira, Eugênio Hottz.

Ao grupo de produtos naturais do laboratório de imunofarmacologia, pelo companheiro e pelo exemplo do trabalho em equipe. Obrigada especial à Dra. Andrea Surrage pela amizade e por conselhos sempre tão sensatos.

Ao grupo sepse que fazem da visita ao pavilhão Ozório de Almeida algo sempre muito prazeroso e enriquecedor. Em especial ao Pedro Celso A. Braga.

Ao Edson Assis, Ana Paula e Rose Branco. O laboratório de imunofarmacologia não existiria sem vocês. Obrigada por toda ajuda!

Ao Fernando Silva de Lima pelo auxílio com os cortes histológicos.

Aos funcionários do pavilhão 108: Edna, Iliane, Márcia, Bruno, Daniel, Maurício e Pedro. Pessoas maravilhosas e funcionários exemplares cujo suporte foi essencial para a boa condução desse trabalho.

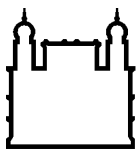
Aos integrantes da banca, pela gentileza de aceitarem o convite.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e à FIOCRUZ pelo apoio científico e financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTAS DE FIGURAS.....	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Obesidade	2
1.2 Obesidade e síndrome metabólica	4
1.3 O tecido adiposo	5
1.3.1 Características dos diferentes depósitos de tecido adiposo	7
1.4 Adipogênese	8
1.5 O tecido adiposo como um órgão endócrino	12
1.6 Tecido adiposo e inflamação.	15
1.7 Lipotoxicidade	16
1.8 Justificativa	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Voluntários	23
3.1.1 Voluntários obesos	23
3.1.2 Voluntários saudáveis	23
3.2 Coleta do tecido adiposo.....	23
3.3 Coleta e processamento de sangue.....	24
3.4 Comitê de ética	24
3.5 <i>Western Blot</i>	24
3.5.1 Lise do tecido adiposo e dosagem de proteínas	24
3.5.2 Gel de eletroforese	25
3.5.3 Imunodeteção de proteínas	25
3.6 Dosagem de adipocinas	26
3.6.1 Ensaio multiplex.....	26
3.6.2 ELISA	26
3.7 PCR em tempo real.....	27
3.8 Avaliação de lipídios	28

3.8.1	Extração de lipídios	28
3.8.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	28
3.9	Fotos macroscópicas e histologia	28
3.9.1	Fotos macroscópicas	28
3.9.2	Histologia	28
3.10	Análise estatística	29
3.11	Desenho de iniciadores	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Quadro clínico – Pacientes obesos.....	31
4.2	Análise plasmática dos níveis de insulina.....	32
4.3	Dosagem de leptina em plasma de pacientes obesos e ex-obesos.	33
4.4	Avaliação do perfil plasmático de adipocinas	35
4.5	Análise pareada do perfil de adipocinas	37
4.6	Imagens macroscópicas dos depósitos de tecido adiposo humano	38
4.7	Comparação histológica do tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral	39
4.8	Análise da expressão de genes relacionados à adipocinas	40
4.9	Avaliação da expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico	41
4.10	Avaliação de proteínas marcadoras de função do tecido adiposo.....	42
4.11	Comparação do rendimento total de lipídios em depósitos de tecido adiposo distintos	43
4.12	Análise do perfil de lipídios neutros em tecido adiposo humano.	44
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO	56
7	Referências bibliográficas	58



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

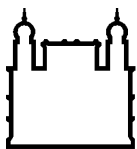
CARACTERIZAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA OBESIDADE.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sally Liechocki

O tecido adiposo desempenha papel fundamental na regulação do balanço energético e na modulação do sistema imune. A obesidade, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, é uma doença de caráter inflamatório crônico e que prejudica esses dois sistemas. Considera-se que depósitos de tecido adiposo distintos respondem de maneira diferente a estímulos lipolíticos, adipocinas e a mediadores lipídicos. Neste trabalho, investigamos o perfil plasmático de mediadores inflamatórios de pacientes obesos (OB), ex-obesos (Ex-OB) e voluntários saudáveis e as características de três depósitos de tecido adiposo humano: subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) em obesos e ex-obesos. Na análise dos níveis plasmáticos de insulina e leptina, observamos que o grupo de pacientes obesos (OB) apresentou níveis mais elevados de ambos os hormônios quando comparados a indivíduos com IMC normal e que após redução ponderal, tal medida foi normalizada. Além disso, em relação a mediadores inflamatórios, ao compararmos indivíduos obesos e controle, observamos diferenças significativas nos níveis de leptina, resistina, *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) e *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1). Não obstante os níveis de leptina do grupo obeso tenham sido similares aos descritos na literatura, as últimas três adipocinas apresentaram maiores níveis no grupo controle, sugerindo que a amostra de indivíduos obesos estudados apresenta um perfil inflamatório reduzido. As outras citocinas avaliadas (IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α , adiponectina e TGF- β) se encontraram no mesmo nível dos voluntários não obesos. Em seguida, amostras de tecido adiposo humano de indivíduos obesos foram obtidas durante cirurgia de gastroplastia. Neste trabalho evidenciamos a diferença macroscópica entre os diferentes depósitos de tecido adiposo. Além disso, as amostras de tecido adiposo de 3 pacientes obesos não diabéticos (ND) e 1 paciente obeso diabético (D) foram submetidas à extração de RNA para análise de genes associados à inflamação e metabolismo lipídico por ensaio de PCR em tempo real. Nos pacientes ND a expressão do gene perilipina (PLIN1) foi maior no tecido VC quando comparado aos tecidos SC e PP. A expressão de PLIN2, ACAT1, FABP4, LEPR foi similar em todos os tecidos destes pacientes analisados. De maneira interessante, foi possível observar que todos os genes avaliados, apresentaram expressão mais alta nos três tecidos do paciente obeso diabético em comparação às amostras de tecido de indivíduos obesos não diabéticos. Avaliamos também os níveis das proteínas adiponectina, perilipina e PPAR- γ nas três amostras de tecido adiposo, através de *Western Blot*. Nossos resultados mostraram que não há diferenças entre os três depósitos de tecido adiposo em paciente obeso e ex-obeso em relação às proteínas avaliadas. Observamos ainda que em amostras de tecido adiposo de pacientes obesos há variações entre os depósitos distintos de tecido adiposo quanto ao conteúdo de lipídios neutros e que tal variação pode ter caráter individual. Juntos, nossos resultados mostram que os distintos depósitos de tecido adiposo possuem variações metabólicas que, conseqüentemente, podem contribuir de maneira diferente às alterações moleculares presentes durante a obesidade.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF HUMAN ADIPOSE TISSUE DEPOTS AND INFLAMMATORY MEDIATORS IN OBESITY

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION

Sally Liechocki

Adipose tissue plays a fundamental role in regulation of energy balance and immune system modulation. Obesity is a chronic inflammatory disease characterized by excess of adipose tissue, with impairment in both systems. It is considered that distinct depots of adipose tissue respond differently to lipolytic stimulus, adipokines and lipid mediators secretion. Here we investigated the plasma cytokines of obese patients, ex-obese patients and healthy individuals (CT) as well the characteristics of distinct depots of human adipose tissue: subcutaneous (SC), preperitoneal (PP) and visceral (VC) of obese and ex-obese patients. In the analysis of plasmatic insulin and leptin levels, we observed that the obese group (OB) presented higher levels of both hormones when compared with normal IMC subjects; we also observed that after weight loss these hormone levels were normalized. Furthermore, in relation to inflammatory mediators, when OB and CT were compared, we saw meaning differences in leptin, resistin, *monocyte chemotatic protein 1* (MCP-1) e *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) levels. Although the leptin levels were similar to those reported in literature, the last three adipokines presented higher levels in control group, suggesting that the obese samples presented a reduced inflammatory profile. The other cytokines (IL-1b, IL-6, IL-8TNF- α , adiponectin and TGF- β) maintained the same level than the healthy donors. Thereafter, samples of human depots adipose tissues of obese patient were obtained during bariatric surgery. Here we evidence the macroscopic differences between distinct depots of adipose tissue. Furthermore samples of 3 non-diabetic obese and 1 diabetic obese patients were submitted to RNA extraction for analysis of inflammatory and lipid metabolism related gene expression by qPCR assay. In non-diabetic obese patients, perilipin (PLIN1) expression was higher in VC when compared to SC and PP adipose tissue. PLIN2, ACAT1, FABP4, LEPR expression remained similar in all fat tissues analysed. Moreover it is interesting to note that gene expression of adipose tissue from diabetic obese patient was higher than non-diabetic obese patient gene expression. We also evaluated adiponectin, perilipina and PPAR- γ proteins levels of these 3 adipose tissue samples, by western blot assay. Our results show no differences between ex-obese and obese distinct depots of adipose tissue. Furthermore in obese adipose tissue samples there are variations between distinct depots of adipose tissue in relation to neutral lipids content suggesting that such variation may have individual character. Taken together our results demonstrated that distinct depots of adipose tissue have metabolic variations that could contribute in a different manner to molecular alterations during obesity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT-1 = do inglês *acetyl-CoA acetyltransferase*

Acrp30 = do inglês *adipocyte complement-related protein*

ADIPOQ = gene para adiponectina

AdipoR = receptor de adiponectina

ADRP = do inglês *adipose differentiation-related protein*

AG = ácidos graxos

AGL = ácidos graxos livres

AMPc = adenosina 3',5'-monofosfato cíclica

AP-1 = do inglês *activating protein 1*

apM1 = do inglês *adipose most abundant transcript-1*

ATGL = do inglês *adipose triglyceride lipase*

C/EBP = do inglês *CCAAT-enhancer-binding proteins*

CE = colesterol éster

CO = colesterol

CT = controle (voluntários hígidos)

DMII = diabetes mellitus tipo II

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

Ex-OB = paciente ex-obeso

FABP4 = do inglês *fatty acid binding protein 4*

GATA = do inglês *GATA domain binding protein*

GBP28 = do inglês *gelatin-binding protein*

GH = do inglês *growth hormone*

GLUT4 = do inglês *glucose transporter type 4*

HAS = hipertensão arterial sistólica

HSL = do inglês *hormone-sensitive lipase*

IGF-1 = do inglês *insulin-like growth factor 1*

IKK = do inglês *IκB kinase*

IL-10 = interleucina 10

IL-1Ra = interleucina 1Ra

IL-6 = interleucina 6

IL-8 = interleucina 8

IMC = índice de massa corporal

IRF = do inglês *interferon regulatory factor 1*

JNK = do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

MAG = monoacilglicerol

MCP-1 = do inglês *monocyte chemotatic protein 1*

MGL = do inglês *monoacylglycerol lipase*.

MSC = do inglês *mesenchymal stem cell*

NFκB = do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

OB = paciente obeso

ObR/LEPR = receptor de leptina

OMS = Organização Mundial de Saúde

PAI-1 = do inglês *plasminogen activator inhibitor 1*

PC = peso do paciente obeso no momento da cirurgia de gastroplastia

PI = peso do paciente obeso no início do programa

PI3K = do inglês *phosphatidylinositol 3 kinase*

PKA = do inglês *protein kinases A*

PLIN1 = gene para perilipina

PLIN2 = gene para ADRP

PP = tecido adiposo pré-peritoneal

PPAR() = do inglês *peroxime proliferator-activated receptor*

Pref-1 = do inglês *preadipocyte factor 1*

qPCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real

RXR = do inglês *retinoid X receptor*

SC = tecido adiposo subcutâneo

SDS – PAGE = dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida

SM = síndrome metabólica

SREBP-1 = do inglês *sterol response element binding protein 1*

STAT = do inglês *signal transduction and activator of transcription*

SVF = do ingles *stromal vascular fraction*

TAG = triacilglicerol

TGF- β = do inglês *transforming growth factor beta*

TLR-4 = do inglês *Toll-like receptor 4*

TNF- α = do inglês *tumor necrosis factor alpha*

VC = tecido adiposo visceral

Wnt = do inglês *wingless-type MMTV integration site family*

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1-1 Mapa global da prevalência de obesidade.	2
Figura 1-2 Obesidade no Brasil.	3
Figura 1-3 Estrutura do adipócito unilocular.	7
Figura 1-4 Esquema da complexa cascata transcricional reguladora da adipogênese.	12
Figura 1-5 Isoformas do receptor de leptina.	14
Figura 1-6 Diagrama do círculo vicioso de hipertrofia do adipócito.	18
Figura 4-2 Análise plasmática dos níveis de insulina.	33
Figura 4-3 Dosagem do nível plasmático de leptina.	34
Figura 4-4 Avaliação geral do perfil de adipocinas.	36
Figura 4 5 Quantificação pareada do perfil de adipocinas.	38
Figura 4 6 Imagens macroscópicas de tecido adiposo.	39
Figura 0-7 Imagens microscópicas de tecido adiposo.	40
Figura 4 8 Avaliação da expressão gênica de LEPR e ADIPOQ.	41
Figura 4 9 Avaliação de genes relacionados ao metabolismo lipídico.	42
Figura 4 10 Avaliação de proteínas marcadoras de função do tecido adiposo por <i>western blot</i> .	43
Figura 4 11 Comparação do rendimento total de lipídios em depósitos distintos de tecido adiposo.	44
Figura 4 12 Análise do perfil de lipídios neutros em tecido adiposo.	45
Tabela 1-1 Critérios para definição de síndrome metabólica.	5
Tabela 4-1 Informações clínicas.	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Atualmente a obesidade representa um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de pessoas obesas quase dobrou desde 1980, chegando aproximadamente a 500 milhões (200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres) de adultos obesos em 2008 e estima-se um total de 1,5 bilhões de pessoas com excesso de peso ou obesidade (figura 1-1).

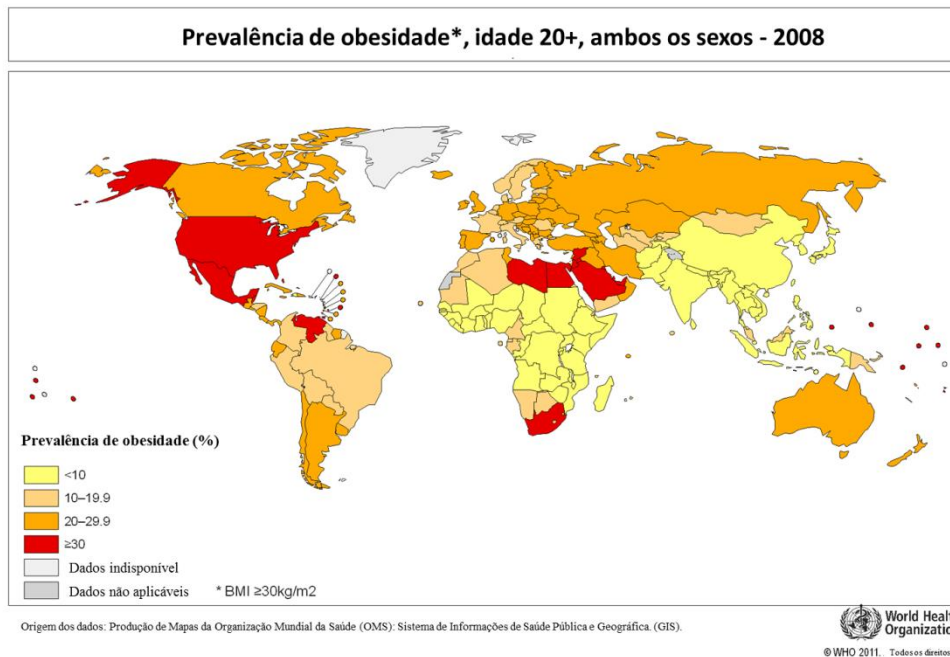


Figura 1-1 Mapa global da prevalência de obesidade. (Adaptado de <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/>)

Dados de 2011 mostraram que cerca de 40 milhões de crianças abaixo dos cinco anos de idade estão com sobrepeso, sendo 30 milhões localizadas em países em desenvolvimento (WHO, 2013a). O excesso de peso e obesidade atinge tanto países ricos quanto países em desenvolvimento. Antes considerada um problema apenas para os Estados Unidos, a obesidade alcançou níveis epidêmicos, destacando-se altos índices em países da América Latina, norte da África e Oriente Médio (Malik e cols., 2013). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, estudos recentes (2012-2013) apontaram um crescimento significativo do número de brasileiros adultos com excesso de peso que atinge pela primeira vez mais da metade da população. O índice de sobrepeso, que em 2006 atingia 43% dos brasileiros acima de 18 anos, chegou a 51%. O aumento do peso engloba ambos os sexos, registrando-se 54% de excesso de peso em homens e 48% em mulheres. O mesmo se aplica à obesidade sendo, atualmente 17% da população brasileira obesa, o que supera o índice de 11% em 2006 (Portal Brasil, 2013).

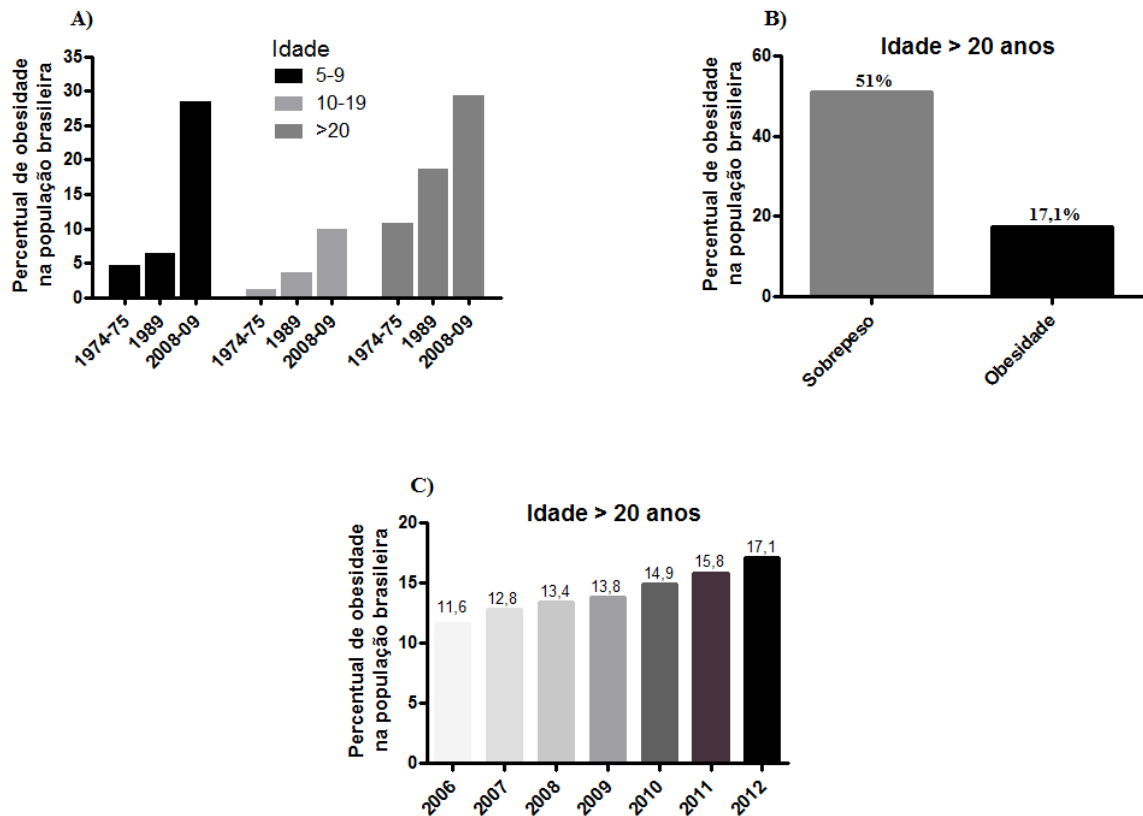


Figura 1-2 Obesidade no Brasil. A) Evolução, segundo faixa etária, do percentual de indivíduos obesos entre a década de 70 e 2009, dados do Programa de Orçamento Familiar (POF) – IBGE 2009; B) Percentual de adultos brasileiros com sobrepeso e obesidade, dados VIGITEL 2012 – Ministério da Saúde; C) Evolução da frequência de brasileiros acima de 20 anos de idade com obesidade, dados VIGITEL 2012 – Ministério da Saúde.

De acordo com a OMS, a obesidade é definida por um excesso de tecido adiposo (hiperplasia e hipertrofia celular). Os graus de obesidade podem ser definidos a partir do índice de massa corporal (IMC). O método mais usual é o IMC e este é obtido pela razão entre o peso e o quadrado da altura (kg/m^2) onde: $\text{IMC} < 25$ - peso normal; $25 < \text{IMC} < 30$ - sobrepeso; $30 < \text{IMC} < 40$ - obesidade; $40 < \text{IMC} < 50$ - obesidade mórbida; $50 < \text{IMC} < 60$ - super obeso e $\text{IMC} > 60$ - super super obeso (Kathleen Renquist, 1998). Além desta classificação feita pelo IMC, a obesidade também pode ser avaliada pela circunferência da cintura pélvica. Este aumento na medida da cintura é correlacionado ao aumento de gordura visceral e esta medida é utilizada na definição de síndrome metabólica, que será descrita adiante. Com estas medidas, a obesidade é dividida em dois tipos: obesidade androide e ginecoide. Obesidade ginecoide é definida quando o excesso de tecido adiposo está localizado principalmente na região glúteo-femural, enquanto que a obesidade androide consiste no maior acúmulo de tecido adiposo na região abdominal. Esta tem sido

constantemente relacionada com o desenvolvimento de complicações clínicas relacionadas à obesidade (Leff.Granneman, 2010).

Atualmente sabe-se que o desenvolvimento de obesidade tem caráter multifatorial. Fatores genéticos e fisiológicos (Bouchard e cols., 1990), sócio-econômicos (Delavari e cols.) e culturais (Crespi, 2010) devem ser considerados, elevando esta doença a um patamar altamente complexo e de difícil tratamento.

1.2 Obesidade e Síndrome Metabólica

Em 1993, Reaven e colaboradores, pela primeira vez, publicaram um trabalho associando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares com um quadro clínico comum: resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão e dislipidemia; tal quadro clínico foi chamado de Síndrome X ou “quarteto mortal”. A primeira definição formal de Síndrome Metabólica (SM) foi feita pela OMS, onde o foco principal era a presença da resistência à insulina, identificada por hiperinsulinemia e intolerância à glicose ou diabetes mellitus tipo II, para que o diagnóstico pudesse ser feito. Além disso, dois dos seguintes fatores deveriam estar presentes: dislipidemia, hipertensão e microalbuminúria. Com o passar dos anos, diversas outras definições foram feitas com o objetivo de se padronizar a identificação da SM, sendo a mais recente definida pela Federação Internacional de Diabetes (FID), onde o quadro de microalbuminúria deixou de ser considerado e a condição de obesidade, especificamente a obesidade central, era fator necessário para estabelecer o diagnóstico desta síndrome (tabela 1-1) (Cornier e cols., 2008).

Tabela 1-1. Critérios para definição de Síndrome Metabólica. (Modificado de Cornier, 2008).

OMS,1995	EGIR, 1999	NCEP: ATPIII, 2001	AACE,2003	IDF, 2006
Elevados níveis de insulina, IFG ou IGT, e dois dos seguintes:	Acima de 25% de insulina em jejum entre indivíduos não diabéticos e dois dos seguintes:	Três ou mais dos seguintes:	IGT ou dois ou mais dos seguintes:	Obesidade abdominal definida por etnia/raça, WC específica e dois dos seguintes:
Obesidade abdominal				
WHR>0,9; IMC $\geq 30\text{kgm}^2$, WC>30polegadas	WC ≥ 94 cm para homens e WC ≥ 80 cm para mulheres	WC>40 polegadas para homens e WC>35 polegadas para mulheres		
Painel lipídico				
TAG>150mg/dl.	TAG $\geq 2,0\text{mmol/l}$	TAG $\geq 150\text{mg/dl}$	TAG $\geq 150\text{mg/dl}$	TAG $\geq 150\text{mg/dl}$
HDL-C<35mg/dl	HDL-C <1,0mg/dl	HDL-C:<40mg/dl para homens e <50mg/dl para mulheres.	HDL-C:<40mg/dl para homens e <50mg/dl para mulheres	HDL-C:<40mg/dl para homens e <50mg/dl para mulheres.
Pressão arterial				
PA>140/90 mmHg	PA $\geq 140/90$ mmHg e nível de glicose em jejum $\geq 6,1$ mmol/l	PA $\geq 130/85$ mmHg e nível de glicose em jejum ≥ 110 mg/dl	Pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg	Pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg e nível de glicose em jejum ≥ 100 mg/dl

Embora a obesidade seja apontada como a causa mais comum para o desenvolvimento de resistência à insulina, nem todos os indivíduos obesos apresentam esta alteração. Entretanto, diversos estudos sugerem que o fator determinante desta alteração será o local de acúmulo deste excesso de gordura, sendo a deposição de tecido adiposo intra-abdominal ou visceral um dos principais responsáveis (Boden, 1997, Boden e Shulman, 2002, Jensen, 1989).

1.3 O Tecido Adiposo

A associação entre o excesso ponderal, o desenvolvimento de síndrome metabólica (Bremer, 2013) e outras co-morbidades como doenças cardiovasculares (Rega-Kaun e cols., 2013), doenças hepáticas (Roden, 2006, Vernon, 2011), diabetes Mellitus tipo II (Colagiuri,

2010a), câncer (Silvestris, 2013) e distúrbios respiratórios (Delgado e cols., 2008) tem sido diretamente correlacionada com a condição de moderada inflamação crônica presente no tecido adiposo do grande obeso. Nos últimos vinte anos, o tecido adiposo foi alvo de intensa pesquisa devido ao rápido crescimento do número de pessoas com sobrepeso/obesidade e com o advento da descoberta da leptina (adiante abordada). O tecido adiposo deixou de ser considerado apenas um local para armazenamento de energia, sendo identificado como um tecido extremamente complexo, com função endócrina e integrante de um intrincado sistema de sinalização para homeostase sistêmica. A caracterização da função endócrina do tecido adiposo foi feita após a observação que tal tecido era capaz de secretar diversas substâncias, chamadas adipocinas (hormônios, citocinas e quimiocinas) (Galic e cols., Kershaw e Flier, 2004, Mohamed-Ali e cols., 1998), agindo de maneira autócrina, parácrina e endócrina.

O tecido adiposo é um tecido misto, sendo composto por diversos tipos celulares: adipócitos maduros, pré-adipócitos, células endoteliais, leucócitos, fibroblastos, células tronco-mesenquimais, entre outras. O tecido adiposo branco é composto em sua maioria por grandes adipócitos esféricos (também chamados de adipócitos uniloculares) (figura 1-2). O tamanho das células adiposas varia de acordo com o conteúdo lipídico, chegando a uma média de 30-130µm de diâmetro e o volume desta célula está associado a sua funcionalidade; onde os adipócitos maiores exibem maior atividade metabólica e secretam mais quimioatraentes para as células do sistema imune (Wronska, 2011). Em adipócitos maduros, uma única gota lipídica ocupa aproximadamente quase todo o volume da célula, sendo cercada por uma monocamada fosfolipídica que contém uma variedade de proteínas com funções estruturais e metabólicas (Brasaemle e cols., 2009, Reue, 2011).

O conjunto de células que compõem o tecido adiposo, com exceção dos adipócitos maduros, é chamado de fração estromal vascular (Peinado e cols., 2012). Apesar de as células adiposas maduras secretarem adipocinas, a fração estromal vascular (SVF, do inglês *stromal vascular fraction*) é a principal responsável pela secreção de algumas destas substâncias (Smorlesi e cols., 2012).

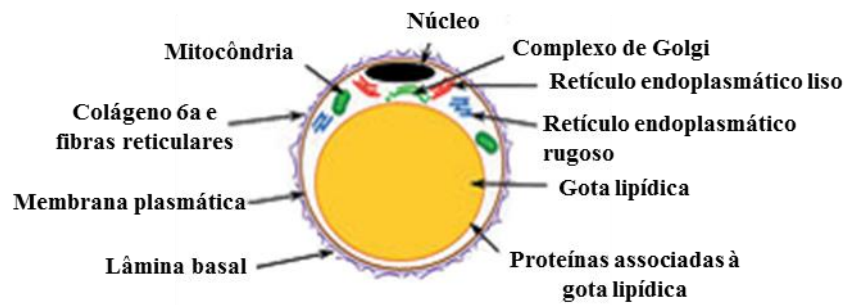


Figura 1-3 Estrutura do adipócito unilocular. Somente algumas organelas foram destacadas; não desenhado em escala. (Modificado de Wronska, 2012)

Uma das características do tecido adiposo branco é a presença de leucócitos como: linfócitos, eosinófilos (Schipper e cols., 2012), neutrófilos (Elgazar-Carmon e cols., 2008) e de maneira majoritária, macrófagos (Weisberg e cols., 2003). Macrófagos são células de população heterogênea que se adaptam em resposta a uma variedade de sinais do microambiente, sendo seu fenótipo definido por este. Macrófagos são usualmente classificados como M1 e M2. Os macrófagos M1, classicamente ativados, têm caráter pró-inflamatório. Os macrófagos M2, alternativamente ativados, foram originalmente caracterizados no contexto da resposta imune tipo Th2. Macrófagos M2 participam da regulação da inflamação, com caráter anti-inflamatório (Shalhoub e cols., 2011). No quadro de obesidade, há um aumento significativo desse infiltrado de células inflamatórias, principalmente macrófagos (M1), formando estruturas muito características chamadas “Crown-like”. Estas estruturas são formadas quando os macrófagos se infiltram no tecido adiposo para remover remanescentes de células adiposas mortas. Devido ao tamanho dos adipócitos e o tempo necessário para essa remoção, ocorre o surgimento de uma situação inflamatória crônica, similar às alterações teciduais geradas por corpo estranho (Smorlesi, Frontini, 2012).

1.3.1 Características dos diferentes depósitos de tecido adiposo

O crescimento do número de indivíduos obesos veio acompanhado com o aumento importante das pesquisas para melhor entendimento do tecido adiposo. Assim, sabe-se que os locais de distribuição do tecido adiposo afetam de maneira diferente o desenvolvimento e a progressão das doenças metabólicas. É importante levar em consideração a característica da distribuição desse excesso de tecido adiposo na obesidade e não só considerar a massa total de gordura na análise desta doença. As diferenças de contribuição de cada depósito resultam das diferenças em sua estrutura, perfil de expressão de proteínas, responsividade a estímulos

endócrinos e nervosos, nutrientes, suprimento de oxigênio, entre outros (Wronska e Kmiec, 2012).

A distribuição do tecido adiposo pode ser dividida em dois depósitos principais: subcutâneo e visceral. O tecido adiposo subcutâneo forma uma camada embaixo da pele, na hipoderme; enquanto que o tecido adiposo visceral pode ser dividido em três depósitos majoritários: (i) omento – tecido adiposo circunjacente aos intestinos; (ii) mesentérico – tecido adiposo mais profundo, sendo encontrado entre os intestinos e o (iii) retroperitoneal – localizado perto dos rins, na região dorsal da cavidade abdominal. Além desses três principais depósitos, há um quarto depósito de tecido adiposo na região abdominal, chamado tecido adiposo pré-peritoneal. Embora presente em grande quantidade no grande obeso, sendo um contribuinte importante para o volume total de tecido adiposo abdominal, este tecido ainda é muito pouco descrito na literatura (Enevoldsen e cols., 2001, Fernandez e cols., 2010). Pequenas quantidades de tecido adiposo visceral também são encontradas em torno de órgãos específicos, como o coração (tecido adiposo epicárdico), estômago (tecido adiposo epigástrico) e vasos sanguíneos (tecido adiposo perivascular) (Lee e cols., 2013).

Diferenças em relação à diferenciação de adipócitos já foram observadas entre depósitos de tecido adiposo subcutâneo e visceral (omento); As células pré-adiposas isoladas do primeiro apresentaram maior rapidez na diferenciação e proliferação deste tipo celular do que o tecido adiposo visceral (Tchkonia e cols., 2005). Um mecanismo para tal efeito seria o fato de que pré-adipócitos derivados de depósitos de tecido adiposo visceral são menos responsivos à indução da adipogênese, via PPAR γ (Tchkonia e cols., 2002). Também foi observada discrepância na resposta lipolítica destes depósitos de tecido adiposo, tendo o tecido adiposo visceral uma resposta lipolítica basal, induzida por catecolamina, mais elevada do que o tecido adiposo subcutâneo (Ahmadian e cols., 2010).

1.4 Adipogênese

Os adipócitos são derivados de células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cell*) pluripotentes que possuem capacidade para se diferenciarem em diversos tipos celulares: adipócitos, miócitos, osteócitos, condrócitos. Sob determinado estímulo, estas células, que residem na fração vascular estromal do tecido adiposo e também na medula óssea, podem entrar em processo de diferenciação restringindo-se à linhagem de adipócitos (Tang, 2012). Esta diferenciação pode ser dividida nas seguintes etapas: diferenciação de MSC em pré-adipócitos e diferenciação de pré-adipócitos em células adiposas maduras. Na primeira etapa da adipogênese, ocorre o comprometimento da célula-

tronco mesenquimal com a linhagem de adipócitos; tornando-se um pré-adipócito. Tal conversão não pode ser claramente distinguida morfológicamente, porém a célula precursora perde a capacidade de se diferenciar em outro tipo celular. Na segunda etapa deste processo, o pré-adipócito passa a apresentar características de um adipócito maduro. Esta célula desenvolve a maquinaria necessária para síntese e transporte de lipídios, sensibilidade à insulina e secreção de proteínas específicas de adipócitos (Rosen e MacDougald, 2006).

O processo de adipogênese envolve a regulação da expressão de um conjunto de genes. Dentro desse rígido controle transcricional destacam-se: PPAR γ (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), os membros da família C/EBP (*CAAT/enhancer binding proteins*) e membros da família AP-1 (do inglês *activating protein 1*), sendo estes fatores essenciais para o processo de diferenciação em adipócito. Além disto, destacam-se outros fatores de transcrição que facilitam a maturação do adipócito: membros da família STAT (do inglês *signal transduction and activator of transcription*) e SREBP-1 (do inglês *sterol response element binding protein 1*). Não menos importantes são os reguladores negativos da diferenciação adipogênica: Pref-1 (*preadipocyte factor 1*) e os membros das famílias Wnt e GATA (Sarjeant e Stephens, 2012). O evento da adipogênese sofre ainda um controle endócrino e por hormônios esteroides (estrogênio, androgênio e glicocorticoides) e peptídicos (GH e IGF-1).

Os PPAR são fatores de transcrição pertencentes à super família de receptores nucleares de hormônios, possuindo os domínios estruturais clássicos dos receptores nucleares (Feige e cols., 2006). Os PPAR ativam a transcrição através da ligação específica a elementos de resposta no DNA, chamados elementos de resposta a PPAR (PPREs, do inglês *PPAR response elements*) e para isso tornam um heterodímero obrigatório com o RXR (RXR, do inglês *retinoid x receptor*) (Christodoulides e Vidal-Puig, 2010). PPARs são ativados por uma larga variedade de ligantes endógenos, como por exemplo, ácidos graxos livres (Nagy e cols., 1998) e prostaglandinas (Kliwer e cols., 1995). Essas observações sugerem que os PPAR atuam como “sensores de lipídios”, dando a estes receptores um papel importantíssimo na regulação do metabolismo lipídico e de carboidratos (Christodoulides e Vidal-Puig, 2010). Existem três formas de receptores PPAR: PPAR α , PPAR γ e PPAR δ (também chamado de PPAR β). Apenas os dois últimos homólogos desempenham papel no processo de adipogênese.

O PPAR γ é o principal regulador da adipogênese. É transcrito em três variantes diferentes que dão origem a duas isoformas proteicas: os transcritos PPAR γ 1 e PPAR γ 3 resultam na isoforma PPAR γ 1, presente em diversos tecidos e o transcrito de PPAR γ 2, resulta na isoforma PPAR γ 2 (presente predominantemente no tecido adiposo) (Cowherd e cols.,

1999). O PPAR γ é necessário e suficiente para a diferenciação do adipócito. A importância deste receptor foi descrita em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Tontonoz e colaboradores (1994) demonstraram, *in vitro*, a participação do PPAR γ na diferenciação de pré-adipócitos e que sua expressão ectópica em fibroblastos não adipogênicos estimulava a adipogênese na presença de ligantes de PPAR γ . Em 1999, Rosen e colaboradores mostraram a necessidade de ação de PPAR γ ao apresentarem a inabilidade de células PPAR γ -null de contribuir para a formação de adipócitos em animais quiméricos. O PPAR γ não é apenas crucial para a adipogênese, mas é também importantíssimo para a manutenção do estado diferenciado. A introdução de uma forma dominante negativa de PPAR γ por um adenovírus em adipócitos 3T3-L1 causa retrocesso na diferenciação, com perda do acúmulo de lipídios e diminuição da expressão de marcadores característicos de adipócitos maduros (Tamori e cols., 2002). O PPAR δ , embora distribuído de maneira ubíqua em tecidos de mamíferos, apresenta também potente ação no metabolismo do tecido adiposo e na homeostase energética. Porém, sua ação parece estar envolvida apenas nas primeiras etapas do processo de diferenciação (Christodoulides e Vidal-Puig, 2010).

Os C/EBP pertencem à família de fatores de transcrição com estrutura básica de zíper de leucina, que incluem: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP ϵ e C/EBP ξ . No entanto, apenas os fatores C/EBP α , C/EBP β e C/EBP δ parecem ter participação no processo de adipogênese. Embora não sejam exclusivos da linhagem de adipócitos, são expressos em etapas definidas durante a adipogênese e cada um possui papel regulatório definido nesse processo (Fajas e cols., 1998). Os fatores de transcrição C/EBP β e C/EBP δ são induzidos em estágios precoces durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 quando sob estímulo hormonal (Cao e cols., 1991); o que é seguido pela indução de PPAR γ e C/EBP α . C/EBP β e C/EBP δ parecem ter papel importante na iniciação da programação adipogênica. McKnight e colaboradores demonstraram que C/EBP β e δ são induzidos imediatamente depois da indução da diferenciação, enquanto que a expressão de C/EBP α não ocorre até 4-5 dias depois do início da diferenciação (Cao, Umek, 1991). Em contraste com os efeitos precoces de C/EBP β e δ na expressão de PPAR γ e na diferenciação de adipócitos, C/EBP α desempenha importante papel nos estágios mais tardios da adipogênese, sustentando a expressão elevada de PPAR γ e, conseqüentemente, mantendo o estado diferenciado do fenótipo dos adipócitos (Fajas, Fruchart, 1998). Além disso, a alta expressão de C/EBP α na fase final da adipogênese é induzida por PPAR γ . Com isso, parece haver um “feedback” positivo entre ambos, aumentando a expressão desses dois fatores (Wu e cols., 1999a, Wu e cols., 1999b).

Além dos fatores PPAR, C/EBP e AP-1 responsáveis por induzir o processo de diferenciação de adipogênica, outros fatores também são importantes para facilitar o processo

de maturação dos adipócitos. A família STAT é composta por sete proteínas (STAT-1, 2, 3, 4, 5A, 5B e 6), onde cada uma tem uma distribuição única e regula a expressão de genes específicos de tecidos (Sarjeant e Stephens, 2012). Os membros da família STAT são ativados principalmente por receptores de citocinas e hormônios. Quando ocorre a ativação destes receptores por seus ligantes, há o início de uma cascata de sinalização que resulta na fosforilação da proteína STAT no resíduo de tirosina, dimerização e translocação para o núcleo, onde ocorre a modulação da transcrição (Schindler e Darnell, 1995). Os primeiros estudos de expressão de STAT em células 3T3-L1 revelaram que STAT-1, STAT-3, STAT-5A e STAT-5B são altamente induzidas durante a adipogênese em camundongos (Stephens e cols., 1996). Os mesmos resultados para STAT-5A e STAT-5B foram encontrados no estudo *in vitro* da diferenciação de pré-adipócitos de tecido adiposo subcutâneo humano (Harp e cols., 2001). A expressão de STAT-3 aumenta durante a fase proliferativa da diferenciação de células 3T3-L1 (Deng e cols., 2006) e a expressão ectópica de um dominante negativo de STAT-3 suprime a diferenciação adipogênica neste mesmo tipo celular (Wang e cols., 2009). O envolvimento de STAT-5 na adipogênese já foi largamente estudado. A expressão ectópica de C/EBP β e δ é acompanhada do aumento nos níveis de STAT-5A e STAT-5B. Estas duas proteínas agem de maneira coordenada na regulação de PPAR γ e C/EBP α durante a diferenciação de células 3T3-L1, sob diversas condições (Leff, Granneman, 2010). A proteína STAT-3 também participa de outro processo importante em adipócitos. A ativação da cascata de sinalização do receptor de leptina ObRb, que será descrita mais adiante.

A regulação do processo de adipogênese ocorre através do balanço de fatores de transcrição que são capazes de induzir a diferenciação e de fatores que bloqueiam esse processo. O fator Pref-1 é uma proteína transmembrana, altamente expressa em pré-adipócitos. No entanto, durante o desenvolvimento do adipócito, ocorre diminuição significativa dos níveis dessa proteína (Sarjeant e Stephens, 2012). A diminuição de Pref-1 durante a diferenciação em adipócitos coincide com o aumento de C/EBP β e C/EBP δ , que ocorre previamente à indução de C/EBP α e PPAR γ . A indução de Sox9 pela proteína Pref-1 durante os primeiros estágios da adipogênese, mantém a célula no estado de pré-adipócito, suprimindo a transcrição de C/EBP β e C/EBP δ ao se ligarem diretamente à região promotora desses dois fatores de transcrição (Hudak e Sul). Outro fator responsável pela regulação negativa da adipogênese são os membros da família Wnt. Este grupo é composto por mais de 16 glicoproteínas que possuem efeitos pleiotrópicos na diferenciação e proliferação celular. A sinalização das proteínas Wnt, via receptor Frizzled, inibe a diferenciação em adipócito através da redução de PPAR γ e C/EBP α (Ross e cols., 2000).

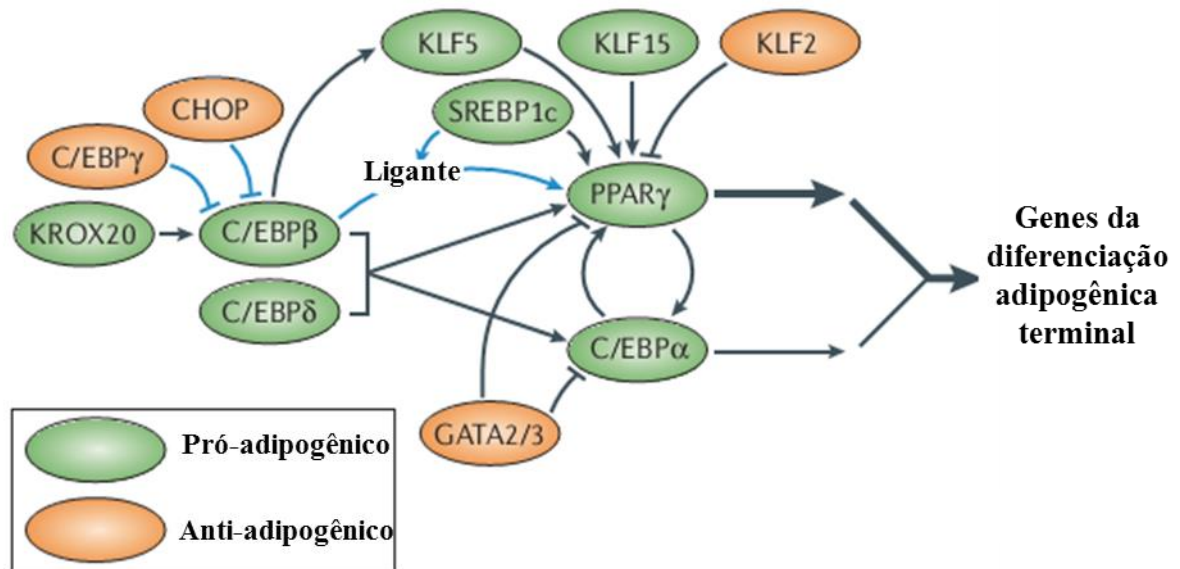


Figura 1-4 Esquema da complexa cascata transcricional reguladora da adipogênese. O PPAR γ situa-se no núcleo da cascata de transcrição que regula a adipogênese. A expressão de PPAR γ é regulada por diversos fatores pró (verde) e anti-adipogênicos (laranja). C/EBP α é regulado por uma série de interações proteína-proteína inibitória. Algumas famílias de fatores de transcrição possuem vários membros que participam da adipogênese, como *Krüppel-like factor* (KLFs). As linhas pretas indicam os efeitos na expressão gênica, enquanto que as linhas azuis representam efeitos na atividade proteica. (Modificado de Rosen, 2006).

1.5 O tecido adiposo como um órgão endócrino

A visão tradicional do tecido adiposo ser apenas um reservatório passivo para a reserva de energia já não é mais aceita. Embora o potencial do tecido adiposo de atuar de maneira endócrina na regulação energética tenha sido proposto por Kennedy há 60 anos (Leff, Granneman, 2010), foi apenas com a descoberta da síntese e secreção da leptina que o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão endócrino. Hoje, o tecido adiposo é reconhecido por expressar e secretar uma variedade enorme de peptídeos bioativos, que atuam no próprio tecido, de forma autócrina e parácrina, e também de maneira sistêmica (Kershaw e Flier, 2004). A proposta de Kennedy era que deveria existir um sinal lipostático circulante que atuaria no sistema nervoso central, em particular no hipotálamo, e que este sinal seria um dos responsáveis pelo controle da ingestão calórica (Kennedy, 1953). Nos anos seguintes, vários estudos foram conduzidos envolvendo camundongos C57BL/6 com modificações genéticas: *ob/ob* (obesos) e *db/db* (diabéticos). Embora as modificações nestes camundongos fossem em genes diferentes, ambos apresentavam os mesmos sintomas de hiperfagia, obesidade,

diabetes, atividade física e termoregulação reduzida. Coleman e colaboradores, em um estudo de parabiose, sugeriram a existência de um fator humoral (ausente no camundongo ob/ob e ineficaz no camundongo db/db), que seria responsável pelo desenvolvimento dessas síndromes (Coleman, 1973). Porém, a determinação desse fator humoral só foi estabelecida, quando em 1994, houve a identificação e sequenciamento da proteína produto do gene ob, a leptina (Zhang Y, 1994).

A leptina é um polipeptídeo de 16 kDa, com 167 aminoácidos e é secretada pelos adipócitos. Esta proteína recebe constantemente a denominação de adipocina devido à sua semelhança estrutural com a família de citocinas de quatro cadeias longas dupla-hélice, como a interleucina 6 (IL -6), oncostatina M e outras (Gertler, 2009). Esta característica comum a citocinas está relacionada com sua ação pleiotrópica. Além de atuar no hipotálamo regulando o controle da ingesta e o gasto energético, a leptina participa de diversos outros processos fisiológicos. A leptina apresenta diversas funções no sistema imune e endócrino, que incluem reprodução, homeostase da glicose, hematopoese, angiogênese, osteogênese e inflamação (Paz-Filho e cols., 2012). O receptor de leptina pertence à classe I da família dos receptores de citocinas, tendo homologia com o receptor de IL-6 e com o receptor de G-CSF (Tartaglia e cols., 1995). O receptor de leptina (ObR) possui, atualmente, seis isoformas já descritas, resultantes de processamento alternativo (figura 1-4). Existem quatro isoformas de membrana truncadas (curtas): ObRa, ObRc, ObRd e ObRf, que não possuem região intracelular e uma isoforma solúvel, ObRe, que não possui tanto a porção intracelular quanto o domínio transmembrana (Lollmann e cols., 1997, Paz-Filho, Mastronardi, 2012). A isoforma longa, ObRb, é a única que possui domínio intracelular de aproximadamente 300 aminoácidos e que é capaz de iniciar a transdução do sinal (Tartaglia, 1997). O receptor ObRb é altamente expresso em neurônios hipotalâmicos e em outros tipos celulares como células T, macrófagos e células vasculares endoteliais (Friedman e Halaas, 1998). É sabido que os níveis de leptina aumentam conforme aumenta o tecido adiposo, gerando um quadro de hiperleptinemia no grande obeso e conseqüentemente, resistência à leptina. Assim, tendo a leptina tanto ação central quanto periférica na regulação de diversos processos fisiológicos, é possível que o quadro de hiperleptinemia e resistência à leptina seja um importante fator para as alterações metabólicas presentes na patologia da obesidade.

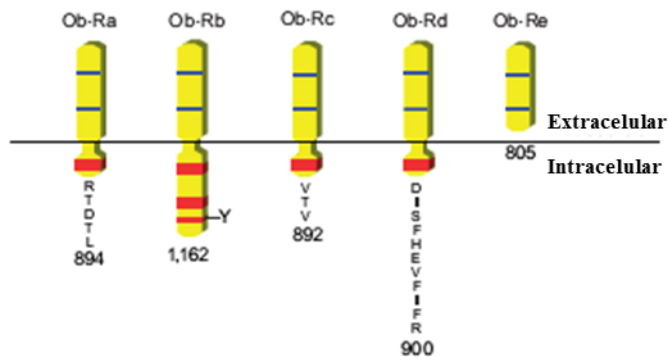


Figura 1-5 Isoformas do receptor de leptina. Todas as isoformas compartilham a mesma porção extracelular, porém diferem na porção C-terminal. Quatro das cinco isoformas possuem quatro domínios transmembrana, mas somente Ob-Rb é capaz de ativar a cascata de sinalização via JAK-STAT. A isoforma Ob-Re é troncada e é secretada. Adaptada de Friedman and Halaas, *Nature* 1998.

Outro hormônio, não menos importante, e que merece bastante destaque na obesidade é a adiponectina. A adiponectina, sintetizada pelo gene ADIPOQ, é a mais abundante das adipocinas, circulando em altas concentrações (5-30ug/ml) em humanos (Leff.Granneman, 2010). Esta proteína é produzida exclusivamente por adipócitos e, ao contrário da leptina, tem seus níveis reduzidos na obesidade (Scherer, 2006). A adiponectina, também chamada de Acrp30 (do inglês *adipocyte complement-related protein of 30 kDa*), apM1 (do inglês *adipose most abundant transcript-1*) ou GBP28 (do inglês *gelatin-binding protein of 28 kDa*) foi descrita por quatro diferentes grupos, independentemente. Este polipeptídeo apresenta homologia estrutural com o fator C1q do sistema complemento e com colágeno, é sintetizado em subunidades simples, e sofre modificações pós-translacionais, que levam à multimerização desta proteína (Leff.Granneman, 2010). A adiponectina é secretada no plasma em diversos complexos de tamanhos diferentes (alto, médio e baixo peso molecular) e aparentemente, possuem papéis fisiológicos distintos (Scherer, 2006). A ação da adiponectina se dá por meio de dois receptores acoplados à proteína G: AdipoR1 e AdipoR2. O primeiro é encontrado principalmente no músculo esquelético e o segundo é encontrado majoritariamente no fígado, embora ambos tenham expressão bastante ubíqua (Yamauchi e cols., 2003a).

A adiponectina atua em múltiplos tecidos e tipos celulares na regulação de diversos processos fisiológicos. Diversos estudos já demonstraram que baixos níveis de adiponectina estão associados a estados inflamatórios crônicos como obesidade (Arita e cols., 1999), resistência à insulina, diabetes Mellitus tipo II (Kern e cols., 2003, Spranger e cols., 2003, Weyer e cols., 2001) e doenças cardiovasculares (Yamauchi e cols., 2003b).

A resistina é outro hormônio produzido exclusivamente por adipócitos. Sua descrição foi feita pela primeira vez em 2001 (Steppan e cols., 2001). Esta proteína de aproximadamente 12 kDa têm sido, desde sua descoberta, associada ao quadro de resistência à insulina associado à obesidade; tendo sido a origem do seu nome baseada neste efeito. A resistina é expressa em adipócitos de roedores (Steppan, Bailey, 2001), em pré-adipócitos e células adiposas maduras em humanos (McTernan e cols., 2002) e também em macrófagos humanos (Patel e cols., 2003). Rajala e colaboradores, em um estudo envolvendo camundongos ob/ob, demonstraram que os níveis de resistina aumentam com a obesidade e que sua expressão é regulada por PPAR γ (Rajala e cols., 2004).

A função endócrina do tecido adiposo envolve a secreção de muitas outras moléculas além da leptina, adiponectina e resistina. A variedade de adipocinas secretadas pelo tecido adiposo inclui a visfatina (Sonoli e cols.), a omentina (Jaikanth e cols., Tan e cols., 2010), a irisina (Timmons e cols.), assim como diversas citocinas inflamatórias clássicas: TNF- α , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, PAI-1, TGF- β , entre outras. O papel de algumas destas moléculas na disfunção do tecido adiposo será discutida em um tópico distinto.

1.6 Tecido adiposo e inflamação.

A primeira associação feita entre a inflamação do tecido adiposo e seu papel nas complicações sistêmicas da obesidade foi feito em 1993 pelo grupo do Hotamisligil (Hotamisligil e cols., 1995). Isso foi sugerido quando o mesmo grupo identificou, em diferentes modelos experimentais de obesidade e diabetes, grande expressão de TNF- α no tecido adiposo (Hotamisligil e cols., 1993). Outro fator importante para o estudo do quadro inflamatório do tecido adiposo foi a identificação do grande infiltrado de macrófagos neste tecido. Tal descoberta deu às células inflamatórias o papel de maiores contribuidoras da produção de citocinas no tecido adiposo (Leff, Granneman, 2010).

A secreção elevada de mediadores inflamatórios no tecido adiposo na obesidade pode causar resistência à insulina em adipócitos. Estudos com culturas de adipócitos demonstraram que o tratamento com TNF- α leva a uma diminuição da sinalização de insulina e subsequentemente na captação de glicose (Engelman e cols., 2000, Hotamisligil e cols., 1994), via ativação de IRS-1 (do inglês *insulin receptor substrate 1*). Essa ativação se dá por intermédio das proteínas quinases JNK (do inglês *c-Jun N-terminal kinase*) e/ou IKK (do inglês *I κ B kinase*), que fosforilam os resíduos serina do IRS-1, na presença de mediadores inflamatórios ou nutrientes. Essas proteínas quinases não só inibem a ação da insulina através de moléculas salvo da cascata de sinalização da insulina, como regulam processos

transcricionais por meio da ativação de AP-1, NF κ B e IRF (do inglês *interferon regulatory factor 1*), resultando no aumento da expressão de citocinas inflamatórias (Gregor e Hotamisligil, 2011) e conseqüentemente, na exacerbação da inibição de vias metabólicas. Além disso, o TNF- α leva a uma redução da expressão de PPAR γ (Guilherme e cols., 2008) em adipócitos, diminuindo assim, tanto o processo de adipogênese, como a manutenção da expressão gênica e função das células adiposas. A regulação negativa de PPAR γ está associada à diminuição dos níveis de adiponectina (Iwaki e cols., 2003), que é reconhecida como uma adipocina com características anti-inflamatórias, o que acarreta ainda mais o agravamento do quadro inflamatório do tecido adiposo no indivíduo obeso.

Conforme aqui já descrito, o tecido adiposo é um tecido bastante heterogêneo sendo composto por uma variedade de tipos celulares, como células adiposas maduras e a fração estromal vascular, composta por pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. Embora a produção de adipocinas como leptina, TNF- α , resistina e adiponectina por adipócitos maduros já tenha sido repetidamente demonstrada, diversos estudos associam o maior perfil inflamatório à SVF (Canello e cols., 2006, Hamaguchi e cols., 2012). No conjunto de leucócitos presentes no tecido adiposo, encontram-se: células pró-inflamatórias (macrófagos M1, neutrófilos, linfócitos CD8⁺, mastócitos) que aumentam conforme agravamento da obesidade e células anti-inflamatórias (macrófagos M2, eosinófilos, células T reguladoras) que diminuem proporcionalmente ao acúmulo de tecido adiposo. Macrófagos M1 são o principal tipo de célula pró-inflamatória presente no tecido adiposo do grande obeso. Um dos principais fatores para o aumento do infiltrado de macrófagos é o elevado número de células adiposas mortas, como consequência da hipertrofia do tecido adiposo. Os macrófagos circundam estas células mortas (estruturas “*Crown-like*”), fagocitando restos celulares e gotas lipídicas livres (Zeyda e Stulnig, 2007). A expressão elevada de quimiocinas como MCP-1 (do inglês *monocyte chemotactic protein-1*) no tecido adiposo do obeso leva ao aumento deste perfil inflamatório. O aumento de ácidos graxos livres seja em decorrência da morte de adipócitos ou devido à disfunção deste tipo celular, o que é característico da obesidade, promove aumento da expressão e secreção de adipocinas, via receptor *Toll-like 4* (TLR-4, do inglês *Toll-like receptor 4*), tanto em macrófagos quanto em adipócitos (Shi e cols., 2006).

1.7 Lipotoxicidade

A obesidade mórbida, que acarreta o desenvolvimento de alterações metabólicas severas, estabeleceu-se como uma das mais emergentes e graves crises de saúde pública. Tradicionalmente, assume-se que o estado energético positivo induz a expansão ininterrupta

do tecido adiposo, aumentando assim a capacidade de armazenamento deste tecido. Porém, o acúmulo ectópico de lipídios no quadro de obesidade, principalmente em órgãos como o fígado, pâncreas e músculo esquelético, levantam um questionamento a respeito dessa propriedade (Leff.Granneman, 2010). O estado de constante inflamação e as alterações metabólicas presentes no tecido adiposo durante a obesidade resulta em uma disfunção deste tecido. As etapas da adipogênese e maturação dos adipócitos são bastante complexas e finamente reguladas em uma sequência de eventos coordenados geneticamente. Alterações nesta regulação resultam no comprometimento na capacidade de armazenamento lipídico como também síntese e secreção de adipocinas importantes na regulação da resposta à insulina (Leff.Granneman, 2010).

O tecido adiposo tem como função primordial responder ao estado nutricional do organismo. Assim, em um estado pós-prandial, o tecido adiposo armazena eficientemente a energia na forma de lipídios neutros, em sua maioria triacilglicerol. Durante o jejum, o tecido adiposo disponibiliza, através de lipólise, ácidos graxos livres para serem metabolizados (Sethi e Vidal-Puig, 2007). No estado alimentado, a sinalização por insulina induz lipogênese em adipócitos, enquanto que a diminuição dos níveis desta proteína compele o adipócito à lipólise. A expansão do tecido adiposo durante o agravamento da obesidade leva a um aumento progressivo da resistência à insulina. Esta por sua vez, não é capaz de fazer o bloqueio eficiente da lipólise, gerando um fornecimento constante de lipídios circulantes.

Além disso, o aumento do tecido adiposo em resposta ao fornecimento excessivo de nutrientes resulta do equilíbrio de dois processos: hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. A expansibilidade do tecido adiposo é limitada e parece ser característica individual, sendo que os mecanismos que a definem ainda não foram claramente estabelecidos. Virtue e colaboradores sugeriram que a associação de mecanismos genéticos, como a participação do PPAR γ na hiperplasia do tecido adiposo (diferenciação de células precursoras de adipócitos); a limitação mecânica através da matriz extracelular (ME) - a hipertrofia do adipócito induz o aumento da pressão da ME sobre o mesmo, elevando a produção de adipocinas e à ruptura celular; e fatores inibidores da angiogênese, seriam capazes de limitar a capacidade de expansão do tecido adiposo, impedindo que o mesmo seja suficientemente competente para o armazenamento do excesso de lipídios e por conseguinte, ocorre aumento do nível de moléculas lipídicas circulantes (figura 1-6) (Virtue e Vidal-Puig, 2010). A hipótese da expansibilidade do tecido adiposo postula que ocorre primeiramente uma disfunção do tecido adiposo que leva a um acúmulo de lipídios em outros órgãos.

O grupo de Vidal-Puig foi o primeiro a introduzir o conceito de lipotoxicidade na obesidade, relacionando as complicações metabólicas desta doença com os efeitos tóxicos

específicos de cada órgão, que seriam causados por um excesso de nutrientes na forma de espécies reativas de lipídios. O conceito de lipotoxicidade descreve a situação em que a formação de espécies reativas de lipídios em órgãos que não o tecido adiposo (capacitado para tal função) leva a uma reação tóxica, ocasionando resistência à insulina, estresse oxidativo, disfunção e morte celular (Leff, Granneman, 2010).

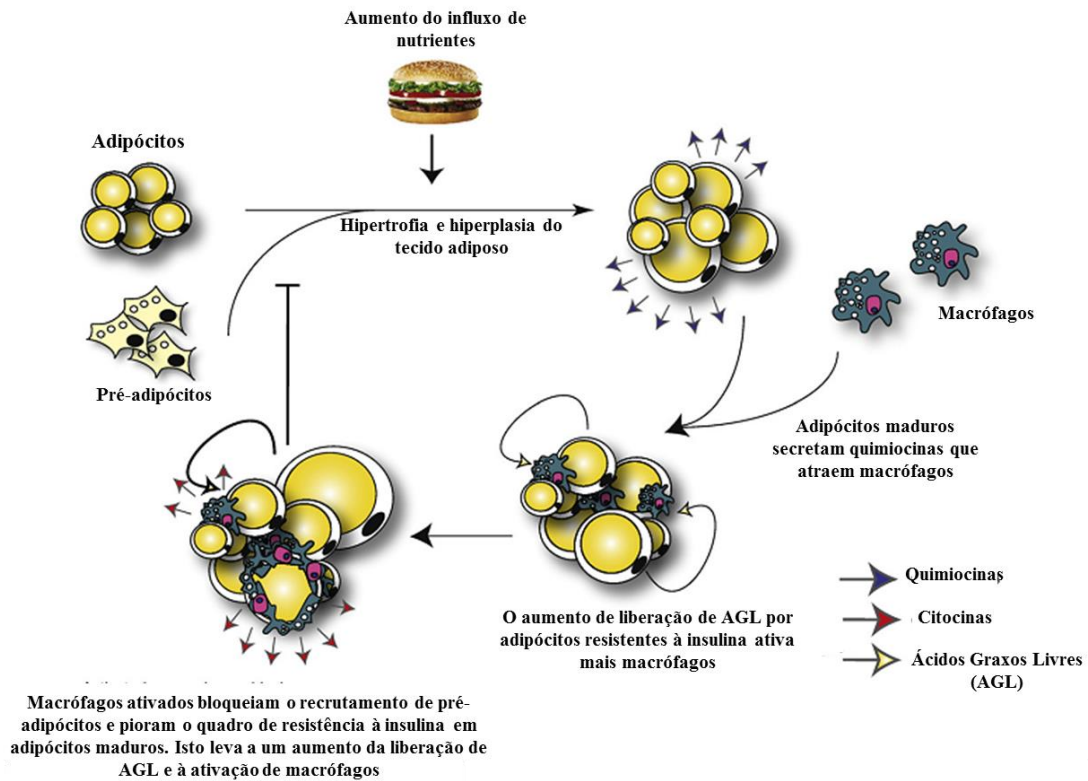


Figura 1-6 Diagrama do círculo vicioso de hipertrofia do adipócito. A hipertrofia do adipócito leva a um recrutamento e ativação de macrófagos e aumento da liberação de ácidos graxos livres. Macrófagos ativados secretam citocinas que pioram a sensibilidade do adipócito à insulina e aumentam a liberação de AGL. Adaptado de Virtue e Vidal-Puig, *Biochimica et Biophysica Acta* 2010.

1.8 Justificativa

Em decorrência do crescimento da prevalência da obesidade mórbida em nosso país, urge a necessidade de um maior conhecimento a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese do problema e também do processo inflamatório associado à obesidade. O presente estudo propõe que a análise do perfil inflamatório plasmático do paciente obeso e do comportamento deste frente à redução ponderal, a caracterização dos depósitos de tecido adiposo humano distintos e avaliação da contribuição de cada tecido quanto à expressão de genes relacionados à inflamação e ao metabolismo lipídico, a análise do perfil proteico e do conteúdo lipídico possa contribuir de maneira positiva para uma maior compreensão das funções do tecido adiposo e das alterações metabólicas complexas presentes na obesidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as diferenças entre diferentes depósitos de tecido adiposo humano e o perfil plasmático de mediadores inflamatórios durante a obesidade.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o perfil plasmático de mediadores inflamatórios em pacientes obesos acompanhados pelo Programa Multidisciplinar de Atendimento ao Paciente Obeso – HUCFF/UFRJ;
- ✓ Comparar o perfil plasmático de adipocinas em pacientes com obesidade mórbida e pacientes ex-obesos, avaliando a contribuição da perda de peso para o quadro inflamatório crônico presente na obesidade;
- ✓ Analisar as diferenças entre os tecidos adiposos humanos (subcutâneo, pré-peritoneal e visceral) em relação à expressão gênica e a presença de moléculas associadas ao metabolismo lipídico e inflamação;
- ✓ Avaliar o perfil lipídico dos três diferentes depósitos de tecido adiposo humano (SC, PP e VC), obtidos durante cirurgia de gastroplastia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Voluntários

3.1.1 Voluntários Obesos

Neste trabalho foram avaliadas amostras (tecido adiposo e plasma) de pacientes participantes do Programa de Atendimento Multidisciplinar ao Obeso Mórbido, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, que foram submetidos à cirurgia de gastroplastia. Foram incluídos no estudo pacientes com IMC acima de 40, portadores ou não de hipertensão e/ou diabetes mellitus tipo II e que não possuíam quaisquer outras moléstias não associadas à condição de obesidade mórbida.

3.1.2 Voluntários Sadios

Foram utilizadas como controle, amostras de sangue de voluntários sadios, coletadas Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ. Todos os voluntários apresentavam-se hígidos e com IMC normal.

3.2 Coleta do tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral foram coletadas em sala de cirurgia, durante a gastroplastia realizada no HUCFF-UFRJ. Logo após a coleta, as amostras foram submetidas a um rápido processo de dissecação para remoção do excesso de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e partes de tecido, danificadas pelo bisturi elétrico. Em seguida, pedaços de aproximadamente 100mg foram separados e congelados diretamente em nitrogênio líquido, onde ficaram armazenados até o momento do experimento.

Também foram separadas amostras de aproximadamente 30mg para análise histológica. Estas foram fixadas em formaldeído 10% e em seguida, submetidas ao processo de impregnação de parafina.

3.3 Coleta e processamento de sangue

Cerca de 10 mililitros de sangue de indivíduos obesos foram recolhidos durante o momento pré-cirúrgico, com os pacientes em jejum. O sangue coletado foi transferido para tubos de coleta específicos para separação de plasma e soro – Tubo *BD Vacuntainer Buffer Na Citrate®*, catálogo 369714 (contendo solução-tampão de citrato de sódio 3,2%) e Tubo *BD Vacuntainer SST® II Advance®*, catálogo 367955 (revestido de sílica por pulverização e contendo gel de polímero para separação de soro), respectivamente.

Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 RPM, durante 15 minutos, em centrífuga clínica. Foram separadas alíquotas de 500 µl de plasma/soro e estas foram armazenadas em nitrogênio líquido.

3.4 Comitê de Ética

A autorização para coleta e manipulação de sangue e tecido adiposo humano em nosso laboratório foi concedida pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número 022/11

3.5 Western Blot

3.5.1 Lise do Tecido Adiposo e Dosagem de proteínas

Aproximadamente 100mg de tecido adiposo foram colocados em tubo de polipropileno de 2 ml e macerados com homogeneizador de tecidos com 1mL de tampão de lise (Tris – HCl 100mM; EDTA 50mM; SDS 10% e coquetéis de inibidores de protease).

Após a lise, o tecido processado foi submetido à centrifugação (13200rpm/15 minutos/4°C) e o lisado de proteínas foi transferido para novo tubo de polipropileno de 1,5 ml, descartando-se a fração lipídica e o pellet contendo restos celulares. Este processo foi realizado duas vezes.

A quantificação de proteínas do lisado foi realizada segundo o método de Bradford, conforme especificações do kit *Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay, Pierce*. A leitura da reação foi feita através de espectrofotometria a 595 nm.

3.5.2 Gel de eletroforese

Foram aplicadas 10 µg de proteínas de cada homogeneizado de tecido adiposo humano em gel SDS-PAGE (8%, 10% ou 12% de bis/acrilamida, conforme proteína a ser observada). O padrão de peso molecular utilizado foi o Rainbow™ (Amersham). Foi realizada corrida eletrolítica por 90 minutos a 120V (Tris Base 250 mM, Glicina 2M, SDS 34 mM). As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), em sistema molhado a 200 mA por 2 horas (tampão de transferência Tris-HCl 25 mM (pH 8,3); glicina 192 mM e metanol 20% (v/v)). Após transferência, a membrana foi corada com solução 0,1% vermelho Ponceau (p/v) em ácido acético 5% e em seguida, lavada com água deionizada.

3.5.3 Imunodeteção de proteínas

Para o bloqueio de ligações inespecíficas, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 40 minutos com Tampão TBST- Leite 5% (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1% Tween® 20 e 5% de leite em pó desnatado, pH 8,0) a 25°C sob agitação. Após bloqueio, a membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários por vez: anti-perilipina (Biorbyt) 1:1000; anti-adiponectina (Novus Biological) 1:1000; anti-PPAR γ (H-100) 1:1000. Todos os anticorpos foram diluídos em tampão de bloqueio. Em seguida, a membrana foi lavada com 10 ml de Tampão TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1% Tween 20, pH 8,0) por cinco vezes durante 2 minutos e depois incubada com anticorpo secundário ligado à peroxidase por 1h, a 25°C sob agitação.

Logo depois, a membrana foi lavada cinco vezes por 2 minutos com Tampão TBST. Finalmente, a formação do complexo antígeno-anticorpo foi revelada por reação de quimioluminescência, utilizando o kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate® (Thermo Scientific) e exposição de filme de raio-X Amersham Hyperfilm ECL (24 × 30 cm) (GE Healthcare) por intervalos variados.

3.6 Dosagem de adipocinas

3.6.1 Ensaio multiplex

Para detecção das adipocinas leptina, adiponectina, resistina, TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e PAI-1 foi utilizado o kit MILLIPLEX MAP Human Adipocyte Magnetic Bead Panel, de acordo com o protocolo do fabricante. A placa de 96 poços foi preparada adicionando-se 200 μ l/poço de tampão de ensaio durante 10 minutos. Em cada poço foi adicionado 25 μ l da curva padrão e das amostras (em duplicata), e então foi adicionado o mix de microesferas conjugadas com os anticorpos monoclonais contra as citocinas em questão. A placa ficou sob agitação por 16 horas a 4 °C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem, e 50 μ l do anticorpo de detecção biotilado foram adicionados. Após nova incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, foi feita adição de 50 μ l de estreptoavidina conjugada ao fluoróforo. Novamente, a placa permaneceu ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente, antes dos poços serem lavados.

Foram adicionados 100 μ l de tampão *Sheath Fluid* em cada poço e a placa ficou sob agitação por 5 minutos para ressuspender as microesferas. Em seguida, as amostras foram analisadas por citômetro dotado de dois feixes de lasers. As intensidades de fluorescência das amostras foram comparadas com a respectiva curva padrão e analisadas no sistema Luminex 200™ System, conforme instruções do fabricante.

3.6.2 ELISA

A dosagem de leptina, insulina, IL-8 e TGF- β foi mensurada por meio do ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) segundo informações do kit (RD System). Placas de 96 poços de fundo plano foram cobertas com anticorpo de captura por poço e incubadas por aproximadamente 16 h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com solução de lavagem (PBS/Tween 0,05%) e incubadas durante 1 h, com a solução de bloqueio (PBS/BSA 1%) à temperatura ambiente.

A curva padrão foi diluída em solução PBS/BSA 1%/Tween 20 0,05%, conforme instruções do fabricante. A curva padrão e as amostras foram aplicadas nas placas (50 μ l /poço), e incubadas por aproximadamente 16 h a 4°C. Após a lavagem das placas com solução de lavagem específica, o anticorpo de detecção foi adicionado por poço, também diluído em solução de bloqueio/Tween 20 0,05%. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se streptoavidina-peroxidase (diluição 1:200, RD). Após 30 minutos à

temperatura ambiente, as placas foram lavadas com solução de lavagem e, em seguida, foi adicionada solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (Próquimos) 2N (25 µl /poço) e a leitura feita no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max).

3.7 PCR em tempo real

A análise da expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral foi realizada através da técnica de PCR em tempo real (do inglês *Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, *qRT-PCR*). Para a purificação do RNA mensageiro (mRNA) das amostras foi utilizado o *RNAeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Applied Biosystem), segundo instruções do fabricante. Em seguida foi feita a produção das fitas de DNA complementar (cDNA) a partir de 200ng de RNA, com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Applied Biosystem), também de acordo com instruções do fabricante.

Como controle normalizador da reação foi utilizado o gene constitutivo β -actina. Foram utilizadas para estas reações sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e o termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações foram feitas em duplicata para cada gene, utilizando 1µl de cada um dos diferentes cDNA, 0,5 µl da sonda e 5 µl de tampão universal *PCR Mastermix TaqMan®*, gerando um volume final de 10 µl. As condições da reação foram: 60°C por 2 minutos, seguido de 95° C por 10 minutos e 40 ciclos:95°C por 15 segundos e 60°C por 1minuto.

A análise dos dados foi feita por meio do cálculo $2^{\Delta Ct}$, onde ΔCt é a diferença entre as médias das duplicatas de cada gene alvo e a média das duplicatas do controle endógeno (Livak e Schmittgen, 2001).

Abaixo estão listadas as sondas utilizadas:

ACAT-1	Hs00608002_m1
ADIPOQ	Hs00605917_m1
FABP4	Hs01086177_m1
LEPR	Hs00174497_m1
PLIN1	Hs00160173_m1
PLIN2	Hs00605340_m1

3.8 Avaliação de lipídios

3.8.1 Extração de lipídios

Cerca de 50mg de tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral foram submetidos ao método de extração de lipídios totais *Bligh and Dyer* (Bligh e Dyer, 1959). Em seguida, a fração orgânica foi secada à temperatura de 37 °C sob vapor de nitrogênio e solubilizada em CHCl₃ : CH₃OH (1:1 v/v) até a concentração de 20µg/µl.

3.8.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para realização da cromatografia em camada delgada, foi usada como fase estacionária uma placa de sílica de 10 cm X 5,5 cm. A mesma foi lavada com a seguinte mistura de solventes (fase móvel): Hexano/Éter dietílico/Ácido Acético 6: 4: 0,5 v/v. Em seguida, foi aplicado 10 µg de cada padrão (TAG, CO e CE) e 100 µg de cada amostra. As amostras e padrões foram eluídos com a mesma fase móvel descrita acima. A corrida foi revelada por queima total de carbono, através da utilização de ácido sulfúrico 30% e calor.

3.9 Fotos macroscópicas e histologia

3.9.1 Fotos macroscópicas

As imagens foram registradas em sala de cirurgia, com o auxílio de uma câmara digital com zoom e o tamanho das amostras de tecido adiposo mensurado com uma régua comum de 30 cm.

3.9.2 Histologia

Os blocos de parafina contendo as amostras de tecido adiposo foram cortados em seções de 5 µm, aderidos em lâmina de vidro e corados com mistura de hematoxilina= e eosina. As lâminas foram analisadas em lente de 20x no microscópio ótico OLYMPUS (IX81) equipado com câmara digital e processados pelo programa *ImagePro*.

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software, La Jolla, EUA*). As análises das quantificações de adipocinas e de PCR em tempo real foram realizadas pelo teste ANOVA não paramétrico e teste Kruskal-Wallis como pós-teste ou teste t de Student (para as análises pareadas). Os dados foram demonstrados por média e erro padrão e foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$.

3.11 Desenho de iniciadores

Neste projeto estava previsto a análise da expressão gênica dos diferentes depósitos de tecido adiposo por meio de PCR em tempo real de larga escala (Fluidigm®). Foi necessário o desenho dos iniciadores de todos os genes-alvo. Nesta etapa a sequência dos genes foi verificada no banco de genes *UCSC Genome Browser – Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz*. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa online *Primer3web* e a qualidade e sequência das fitas senso e antisenso foram avaliadas com o programa online *Primer Blast* do *National Center of Biotechnology Information*. Os iniciadores estão descritos no Anexo I.

4 RESULTADOS

4.1 Quadro clínico – Pacientes obesos

Os pacientes analisados neste estudo foram todos integrantes do Programa Multidisciplinar de Atendimento ao Obeso Mórbido, conduzido no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ. Neste programa, os pacientes são acompanhados por uma equipe multidisciplinar composta por médicos (clínicos, cardiologistas, endocrinologistas, fisiatras), fisioterapeutas, nutricionistas, profissionais de educação física, psicólogos. Esses profissionais acompanham os pacientes selecionados durante as fases pré e pós-operatória, avaliando o perfil de cada paciente e sua evolução clínica.

Os candidatos ao estudo foram selecionados a partir de critérios estabelecidos, $40 \leq \text{IMC} \leq 70$; ausência de doença infecciosa aguda ou crônica e/ou inflamatória; idade entre 18 e 65 anos e indivíduos que não tenham sido submetidos a outras técnicas de cirurgia bariátrica anteriormente. Na tabela abaixo, encontram-se algumas informações pertinentes obtidas durante a fase pré-operatória de todos os pacientes com obesidade mórbida avaliados neste trabalho.

<i>Informações clínicas</i>									
Paciente	Sexo	Idade	IMC	PI (kg)	PC (kg)	HAS	DM II	Ppós (kg)	IMCpós
OB01	M	48	50,06	136	127,5	P	I	88	33,4
OB02	M	27	42,7	116,01	115	A	A	76,6	28,1
OB03	M	34	62,3	155,05	157,01	P	I	119	46,5
OB04	M	60	52,1	118,01	117,8	P	P	87	38,3
OB05	M	57	48,2	107,8	106	A	P	82,1	33,5
OB06	M	36	52	169	155	A	P	-	-
OB07	M	36	39,4	115,4	112	A	A	-	-
OB08	M	30	46,1	129,5	128	A	A	96	34,9
OB09	H	31	49,9	153,3	148	A	A	-	-
OB10	H	33	57	230	178,5	P	A	-	-
OB11	M	55	41,7	122,8	126	P	A	-	-
OB12	M	23	51	159,2	157,8	A	A	-	-
OB13	M	40	38,7	108,8	108	P	A	-	-
OB14	M	24	45,5	116,7	116	A	A	-	-
OB15	M	32	48,4	123,7	123	A	A	-	-
OB16	M	27	49,02	145	140	A	A	-	-
OB17	M	44	52,3	141,8	130,9	P	A	-	-
OB18	M	42	52,6	156,5	153,6	P	A	-	-
OB19	M	-	-	127,5	130	-	-	-	-
OB20	M	50	-	86	86,5	P	A	-	-
OB21	M	44	54,4	136,5	128,8	P	A	-	-
OB23	H	36	57	-	169	P	A	-	-
OB24	H	46	50,5	-	155	P	A	-	-
OB25	M	19	-	-	-	A	A	-	-
OB26	M	61	40,3	-	90,7	P	P	-	-
Mediana	-	36	49,98	129,5	128,4	-	-	87,5	34,2

Tabela 4-1. Informações clínicas. Sexo (M=mulher e H=homem); IMC (kg/m^2); PI – peso (kg) no início do programa; PC – peso (kg) no momento cirúrgico; Ppos – peso após cirurgia; HAS – hipertensão arterial sistêmica (A=ausente e P=presente) e DM II - Diabetes Mellitus tipo II (A = ausente, P = presente e I = intolerância a glicose) e IMCpós – IMC (kg/m^2) pós-cirurgia.

4.2 Análise plasmática dos níveis de insulina

Com o intuito de avaliar o perfil de resistência à insulina dos indivíduos participantes deste estudo, obesos e ex-obesos – pacientes que após cirurgia de gastroplastia (6 meses a 1 ano), apresentaram perda de peso significativa – fizemos a quantificação dos níveis plasmáticos de insulina. A coleta das amostras de sangue foi realizada com os pacientes e voluntários sadios (utilizados como controle) em jejum de 8-12 horas.

Assim como encontrado na literatura (Zeyda e Stulnig, 2009), foram observados no plasma de pacientes obesos níveis elevados de insulina ($11,06 \mu\text{U/ml} \pm 1,46$), que chegam a quase o dobro da concentração plasmática encontrada no grupo controle ($6,13 \mu\text{U/ml} \pm 1,53$) (figura 4-2A). Com a redução significativa de IMC, ocorre a diminuição dos níveis plasmáticos de insulina ($5,81 \mu\text{U/ml} \pm 1,34$). Com exceção do paciente OB01 que possuía concentração plasmática considerada normal e que não se alterou, apesar da perda de peso (figura 4-2B).

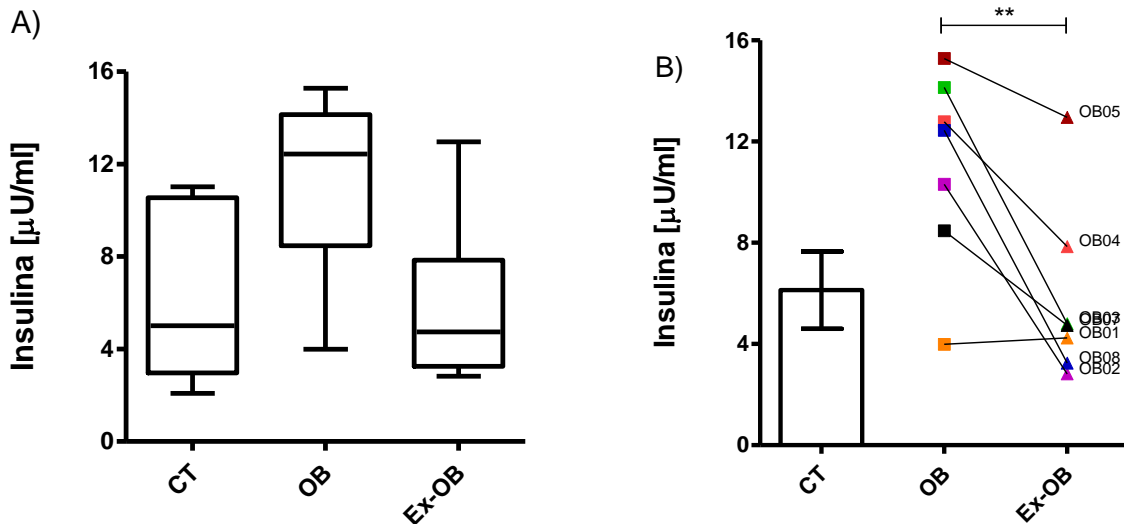


Figura 4-2. As amostras de plasma de 7 voluntários saudáveis (CT) e de 7 pacientes obesos (OB) pré-cirurgia e ex-obesos (Ex-OB) pós-cirurgia (amostras pareadas) foram avaliadas por ensaio imunoenzimático – ELISA, para quantificação dos níveis de insulina. A) Visão geral comparativa do perfil plasmático de insulina entre CT, OB e Ex-OB. Gráfico representado por mediana e desvio-padrão. B) Análise pareada do grupo obeso e do grupo ex-obeso. Controle representado por média e erro-padrão. ** para $p < 0,01$.

4.3 Dosagem de leptina em plasma de pacientes obesos e ex-obesos.

Os níveis plasmáticos de leptina atuam são bons de obesidade. Esta proteína que é produzida de maneira proporcional ao montante de tecido adiposo tem grande participação nas alterações metabólicas (Wang e cols., 1999) e imunes (Fernandez-Riejos e cols., 2010) presentes no indivíduo obeso. Assim, a análise dos níveis circulantes desta proteína torna-se bastante importante para o estudo da obesidade. Na figura 4-3A observamos a comparação entre três diferentes grupos. O grupo de pacientes obesos (OB) apresentou mais que o dobro da quantidade média de leptina ($56,11 \mu\text{g/ml} \pm 8,3$) quando comparado ao grupo CT ($20,9 \mu\text{g/ml} \pm 4,7$), conforme esperado. Após redução de peso, os pacientes do grupo Ex-OB

apresentaram níveis semelhantes ao grupo controle. A figura 4-3B mostra a análise pareada entre obesos e ex-obesos. Todos os pacientes obesos avaliados mostraram queda acentuada da concentração de leptina após redução ponderal. Estes resultados confirmam a relação proporcional dos níveis de leptina com o montante de tecido adiposo.

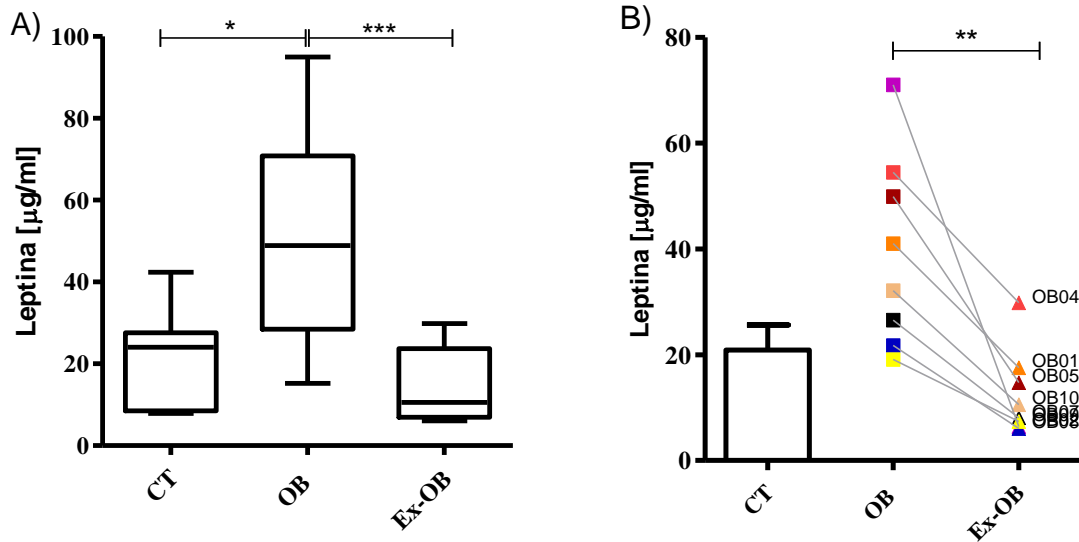


Figura 4-3 Dosagem do nível plasmático de leptina. Amostras de plasma de três grupos: controle (CT), obeso (OB) e ex-obeso (Ex-OB) foram avaliadas quanto aos níveis de leptina por meio de ensaio imunoenzimático – ELISA. A) Comparação entre os três diferentes grupos, onde foram analisados: 07 voluntários saudáveis, 21 pacientes obesos e 09 pacientes ex-obesos. Gráfico representado por mediana e desvio-padrão. B) Análise pareada entre pacientes obesos e ex-obesos ($n=9$); CT foi usado para controle de normalização dos níveis de leptina. Controle representado por média e erro. Entenda-se * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$ e *** para $p\leq 0,0002$.

4.4 Avaliação do perfil plasmático de adipocinas

Para avaliação do perfil de adipocinas dos pacientes obesos e ex-obesos, amostras de sangue foram recolhidas durante o procedimento cirúrgico e de 6 meses a 1 ano após gastroplastia, respectivamente. O plasma foi utilizado para a determinação dos níveis das seguintes adipocinas: adiponectina, leptina, resistina, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 e PAI-1 por Multiplex e IL-8 e TGF- β , por ELISA. Ao compararmos o grupo obeso com o grupo controle, observamos diferenças significativas apenas nas dosagens de leptina (figura 4-4B), resistina (figura 4-4C), MCP-1 (figura 4-4E) e PAI-1 (figura 4-4F). A concentração de leptina foi mais alta em indivíduos obesos quando comparada a indivíduos saudáveis, conforme descrito na literatura e já retratado na figura 4-3. Não houve diferença nos níveis de leptina entre controle e ex-obesos. Surpreendentemente, os níveis plasmáticos de resistina, MCP-1 e PAI-1 dos pacientes obesos foram menores do que os observados no grupo controle. Além disso, no grupo ex-obeso, a concentração plasmática destas adipocinas foi ainda mais baixa do que em indivíduos saudáveis. De maneira interessante também foi observado em quase todas as outras adipocinas analisadas uma tendência para uma concentração plasmática maior no grupo controle do que no grupo de obesos e ex-obesos, com exceção da IL-8 (figura 4-4I) e IL-1 β (figura 4-4G) que foram semelhantes em todos os grupos.

Tais resultados sugerem que o grupo de pacientes obesos e ex-obesos avaliados neste projeto apresentam um perfil inflamatório reduzido.

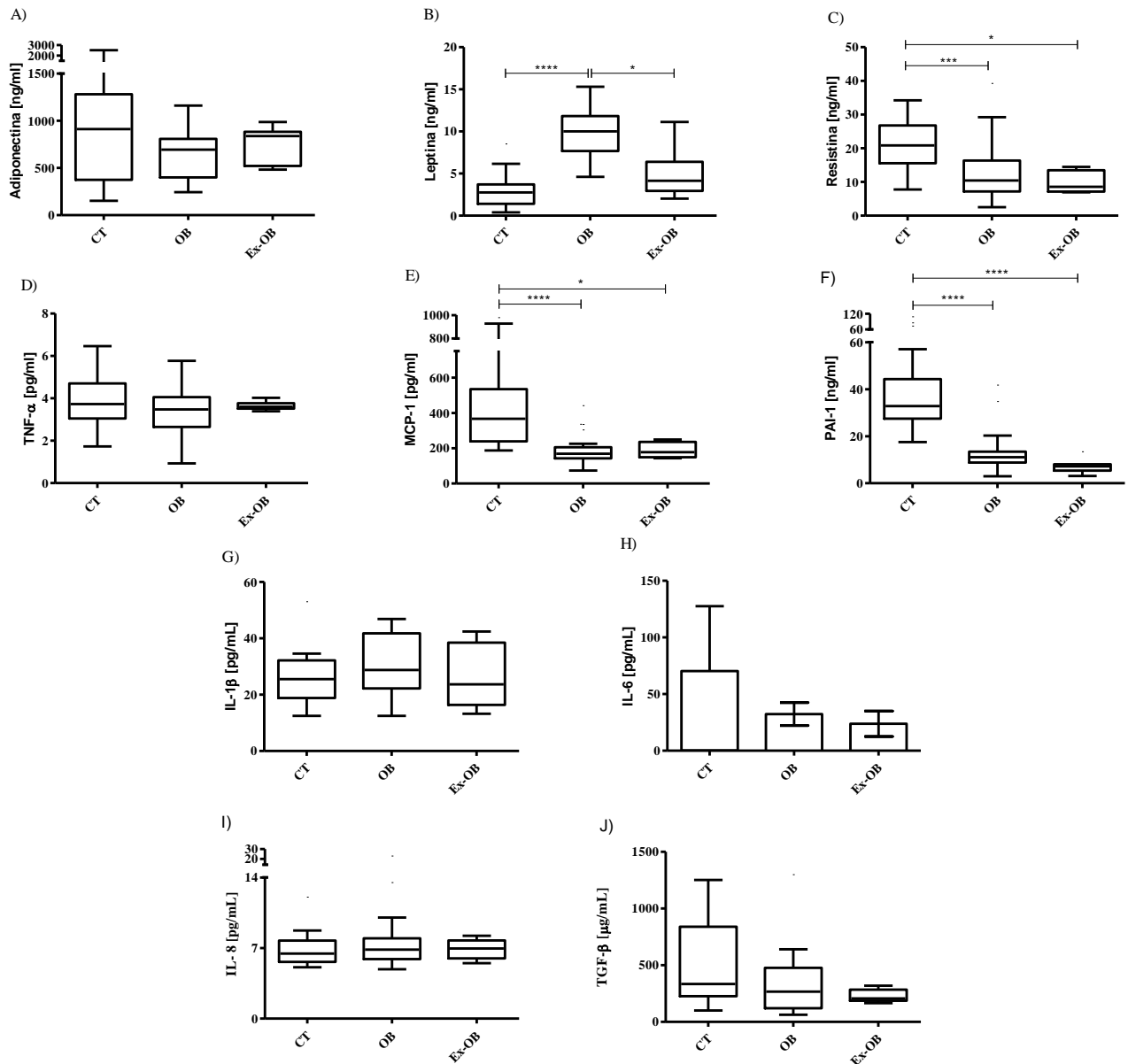


Figura 4-4 Avaliação geral do perfil de adipocinas. Quantificação dos níveis de adipocinas em plasma de três diferentes grupos: CT- grupo controle, composto por 22 voluntários saudáveis; OB – grupo de obesidade mórbida, composto por 23 pacientes obesos e Ex-OB – grupo de ex-obesos, composto por 7 pacientes que perderam peso após cirurgia de gastroplastia (A-F). O número de CT e OB variou nos ensaios (G) e (H), sendo 9 e 10, respectivamente; assim como nos ensaios (I) e (J), sendo 12 e 21 respectivamente. O quadro de adipocinas avaliadas corresponde a: A) Adiponectina, B) Leptina, C) Resistina, D) TNF- α , E) MCP-1, PAI-1, G) IL-1 β e F) IL-6. A quantificação das adipocinas foi realizada via ensaio Multiplex (A-H) e ELISA (I e J). Gráficos representados por mediana e desvio-padrão. Para * $p < 0,05$; para *** $p \leq 0,0002$ e para **** $p < 0,0001$

4.5 Análise pareada do perfil de adipocinas

Com o objetivo de avaliar o comportamento do quadro inflamatório em decorrência da perda de peso foi realizada uma análise pareada dos plasmas de pacientes obesos e ex-obesos (n=7). Dentro dessa análise todos os pacientes eram mulheres, sendo 2 obesas diabéticas (OB04 e OB05) ou com intolerância à glicose (OB01 e OB03), 3 pacientes com hipertensão arterial (HAS) (OB01, OB03 e OB04) e 3 pacientes que não apresentavam HAS e nem diabetes mellitus tipo II (DM II). Os pacientes com DM II ou intolerância à glicose (OB01, OB03-05) apresentaram o mesmo comportamento de variação nos níveis de adipocinas, quando analisados pós-redução de peso. Nestes pacientes foi observada uma diminuição nos níveis de leptina, MCP-1, PAI-1, IL-6, TGF- β e não houve alteração nos níveis de TNF- α . Em pacientes diabéticos foi observado aumento nos níveis de adiponectina após perda de peso, enquanto que para os dois pacientes OB01 e OB03 que só apresentavam intolerância à glicose, houve diminuição da concentração desta proteína. Em relação aos pacientes OB02, OB07 e OB08 que não possuíam nem hipertensão arterial nem diabetes, apenas na dosagem de leptina houve padrão similar de diminuição da concentração deste hormônio. Já para as adipocinas IL-1 β e IL-8, aparentemente cada paciente respondeu de maneira diferente. A dosagem do restante das outras adipocinas apresentou perfil bastante controverso.

De uma maneira geral, na análise comparativa entre os dois grupos – obesos e ex-obesos - a redução de peso sugere uma mudança no perfil inflamatório destes indivíduos. Embora, individualmente haja um comportamento diferente nos níveis de cada adipocinas avaliada, observa-se que a perda de peso leva a adoção de uma população mais homogênea em relação aos níveis circulantes de adipocinas, com maior destaque para TNF- α , MCP-1, IL-8 e TGF- β .

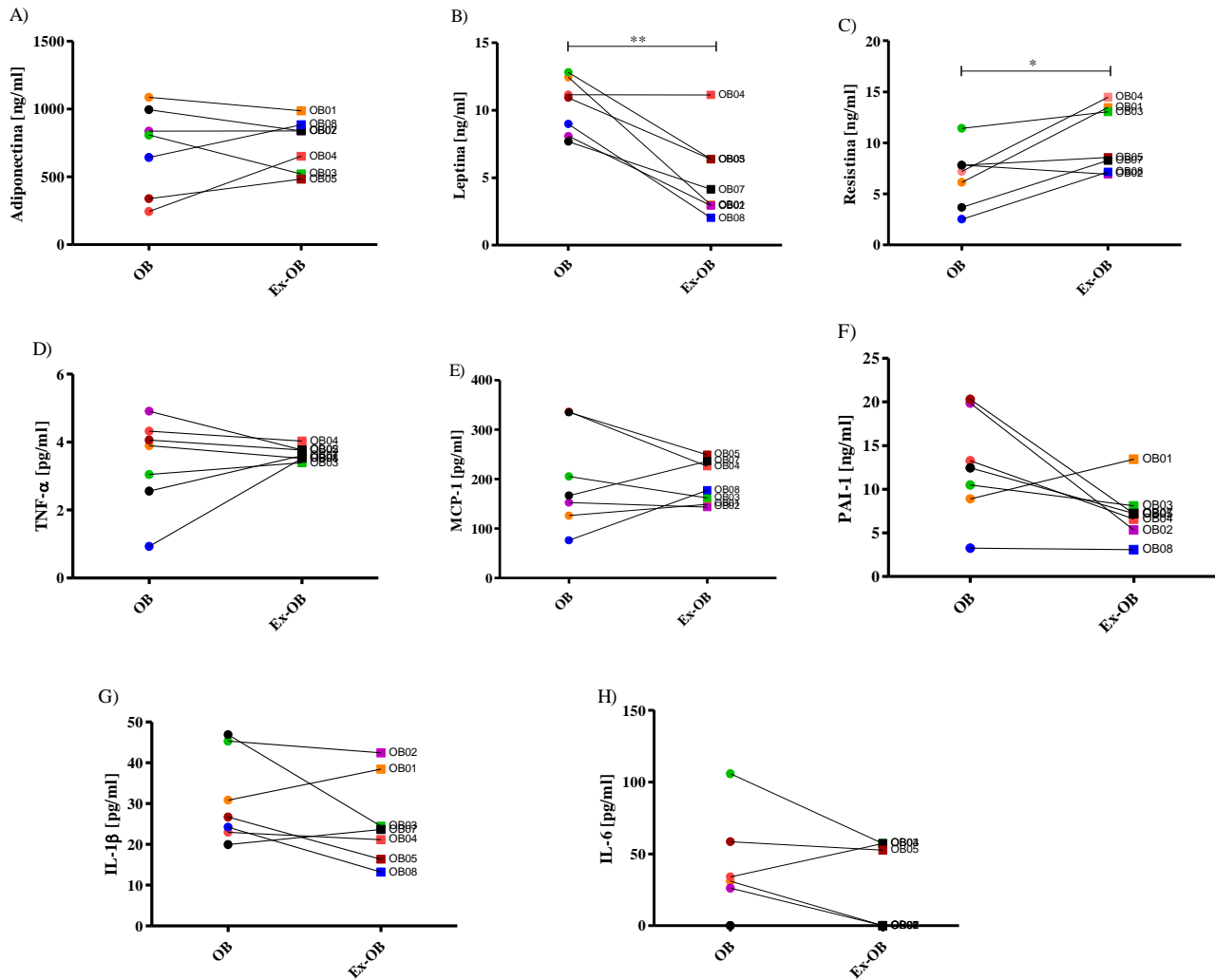


Figura 4-5 *Quantificação pareada do perfil de adipocinas.* Amostras de plasma de 07 pacientes obesos e ex-obesos (amostras pareadas) foram quantificadas para o seguinte perfil de adipocinas: A) Adiponectina, B) Leptina, C) Resistina, D) TNF- α , E) MCP-1, F) PAI-1, G) IL-1 β , H) IL-6, I) IL-8 e J) TGF- β . As análises de A-H foram obtidas por ensaio Multiplex, enquanto que para I-J obteve-se por ELISA. * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$.

4.6 Imagens macroscópicas dos depósitos de tecido adiposo humano

O interesse de estudar os diferentes depósitos de tecido adiposo na obesidade foi baseado, não só devido às diferenças de contribuição de cada um para o quadro inflamação crônica e resistência à insulina, mas pelas características discrepantes entre eles observadas macroscopicamente. Na figura 4-5 é possível identificar a olho nu diferenças importantes: o tecido adiposo subcutâneo apresenta coloração um pouco mais amarelada, com formação de lóbulos de tamanho pequeno a médio, entremeados com tecido conjuntivo. O tecido adiposo pré-peritoneal apresenta coloração mais clara, com formação de lóbulos de tamanho médio a grande, sendo coberto por uma espessa camada de tecido conjuntivo. Há presença de vasos

sanguíneos de calibre mais grosso. O tecido adiposo visceral apresenta lóbulos pequenos com grande quantidade de tecido conjuntivo entremeado, coloração aproximada ao tecido adiposo pré-peritoneal e rica vascularização.

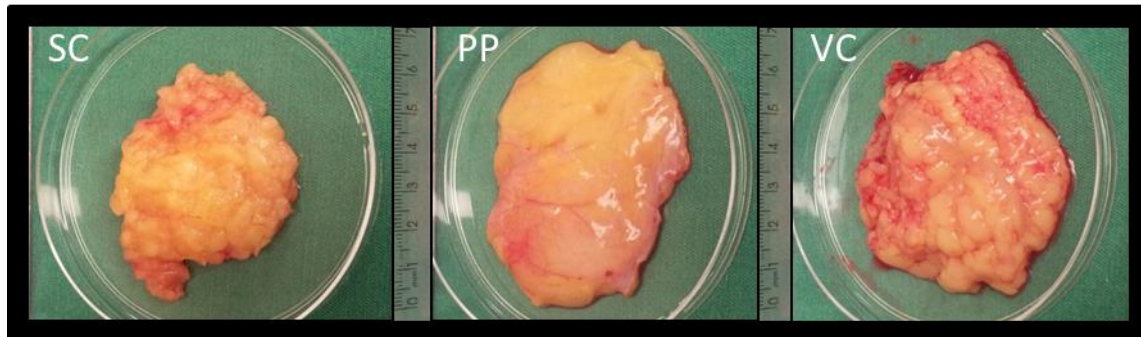


Figura 4-6 **Imagens macroscópicas de tecido adiposo.** *Imagens de três diferentes depósitos de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) foram tiradas durante momento cirúrgico. As fotos foram tiradas utilizando-se câmera digital com zoom e o tamanho da amostra de tecido foi medido com auxílio de uma régua de 30 cm.*

4.7 Comparação histológica do tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral

Além da observação das características macroscópicas do tecido adiposo, fizemos uma coloração com mistura de hematoxilina e eosina para verificar se poderia ser observada, diferença entre o tamanho dos adipócitos nos diferentes depósitos de tecido adiposo. A figura 4-7 mostra que parece haver diferenças marcantes no tamanho das células adiposas, embora seja necessária uma investigação sistemática para confirmação desta observação, uma vez que já está descrito na literatura uma possível correlação entre o tamanho do adipócito e o grau de resistência à insulina (O'Connell e cols., 2010).

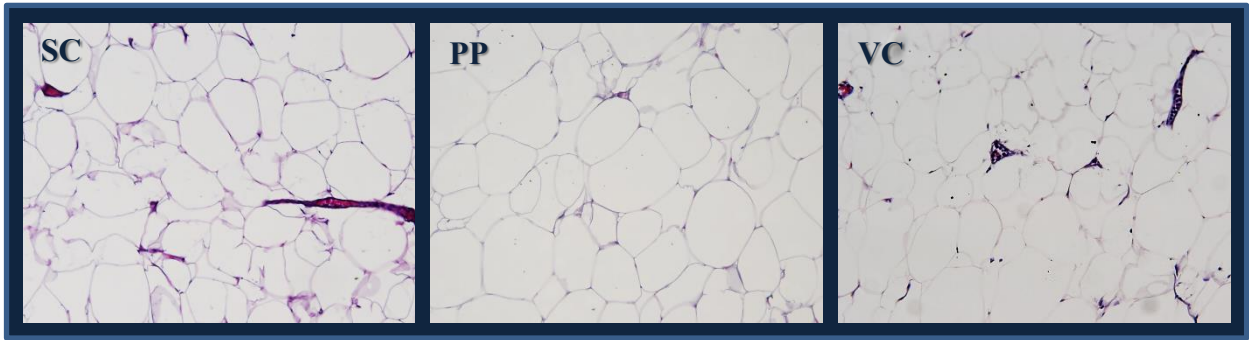


Figura 4-7 *Imagens microscópicas de tecido adiposo.* Amostras de tecido adiposo subcutâneo (SC), pré-peritoneal (PP) e visceral (VC) foram coradas com hematoxilina-eosina e as imagens obtidas por microscopia ótica com mesmo aumento (20x). Todas as modificações de tamanho de imagem para montagem da figura foram feitas de forma acoplada.

4.8 Análise da expressão de genes relacionados à adipocinas

Com intuito de verificar a contribuição de cada depósito de tecido adiposo para a produção de citocinas, foi realizado um ensaio inicial por meio da técnica de PCR em tempo real, para verificação da expressão gênica de adiponectina – ADIPOQ (figura 4-8B) e do receptor de leptina – LEPR (figura 4-8A), onde a primeira está associada ao perfil anti-inflamatório e a segunda, ao perfil pró-inflamatório. Observou-se diferença significativa entre o tecido subcutâneo e o tecido visceral em relação à expressão de LEPR. No entanto, nenhuma diferença foi constatada entre o tecido pré-peritoneal e os outros dois depósitos de tecido adiposo avaliados. Em relação à ADIPOQ, os três tecidos apresentaram expressão semelhante.

Além da comparação entre diferentes depósitos de tecido adiposo, foi feita a comparação entre um grupo de pacientes obesos não diabéticos (ND) e 1 paciente obeso diabético. De maneira interessante, observamos que o paciente obeso com quadro de diabetes estabelecido apresenta níveis de expressão gênica (ADIPOQ e LEPR) mais elevado do que os indivíduos obesos não diabéticos.

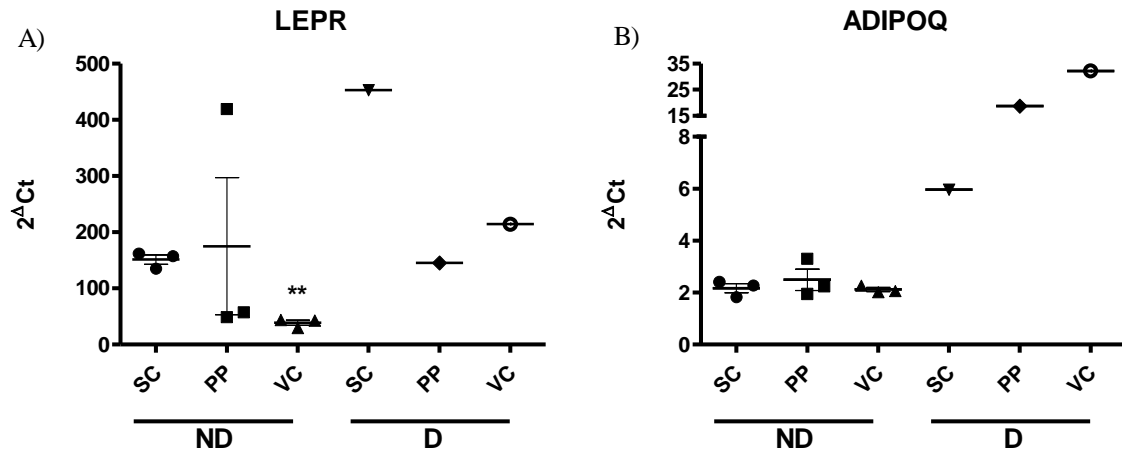


Figura 4-8 Avaliação da expressão gênica de LEPR e ADIPOQ. Amostras de três depósitos de tecido adiposo humano foram avaliadas por PCR em tempo real. Os tecidos subcutâneo (sc), pré-peritoneal (pp) e visceral (vc) obtidas durante cirurgia de gastroplastia foram submetidas à extração de RNAm. A expressão gênica do receptor de leptina – LEPR (A) e de adiponectina – ADIPOQ (B) foram analisadas em pacientes obesos não diabéticos (ND, n=3) e o paciente obeso diabético (D, n=1). Os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina e estão representadas como expressão relativa de RNAm. ** $p < 0,01$.

4.9 Avaliação da expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico

Para a caracterização dos depósitos de tecido adiposo, a análise das proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico é muito relevante. Como já descrito na introdução deste trabalho, a lipotoxicidade resultante do quadro de obesidade tem participação importante no desenvolvimento do estado inflamatório crônico desta patologia. Tendo isto em vista, foi realizada análise comparativa entre os três depósitos de tecido adiposo: subcutâneo, pré-peritoneal e visceral, em relação à expressão de PLIN1, PLIN2, FABP4 e ACAT-1. Apenas a expressão de PLIN1 (figura 4-9A) mostrou-se significativamente diferente entre o tecido subcutâneo e o tecido visceral de pacientes obesos não diabéticos, sendo mais elevada neste último tecido. Para os outros três genes, não foram observadas divergências entre os três tecidos: SC, PP e VC.

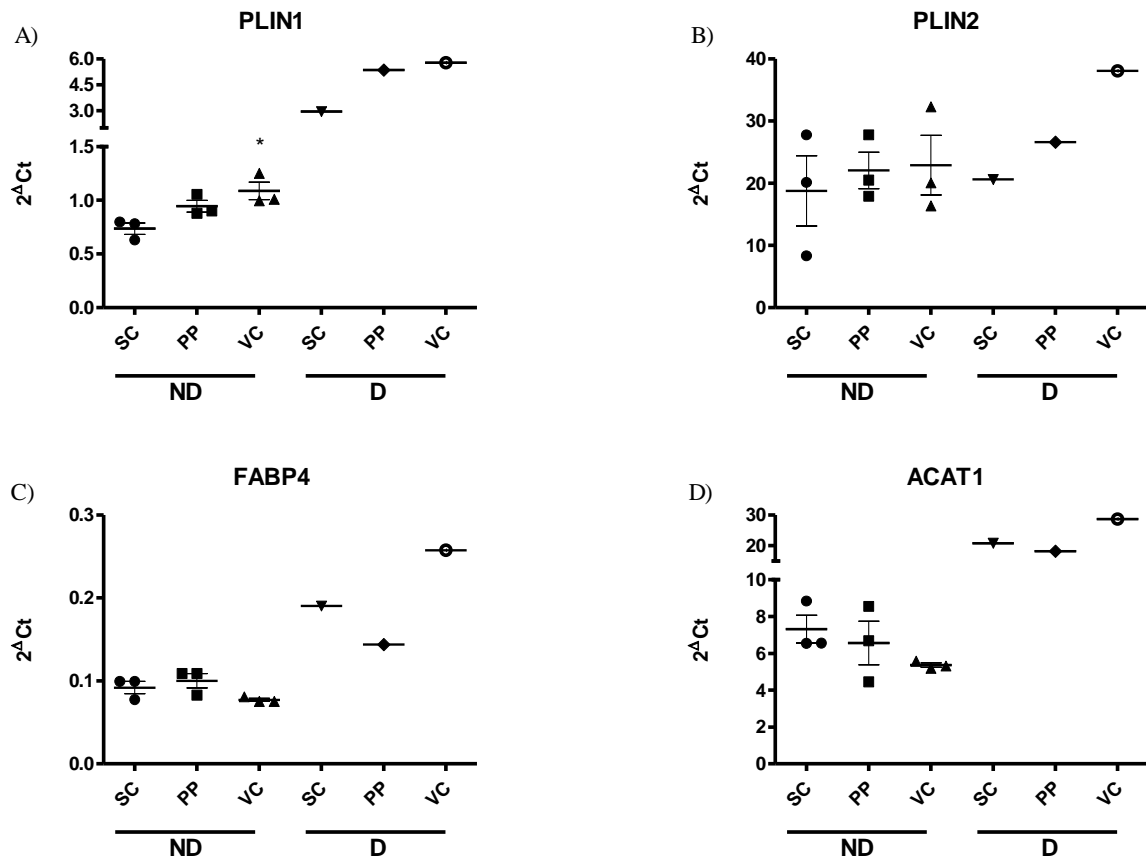


Figura 4-9 Avaliação de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Amostras de três depósitos distintos de tecido adiposo foram avaliadas por PCR em tempo real. Os tecidos subcutâneo (sc), pré-peritoneal (pp) e visceral (vc) de pacientes obesos não-diabéticos (ND, n=3) e paciente obeso diabético (D, n=1) obtidos durante cirurgia de redução de estômago foram submetidas à extração de RNAm. O metabolismo lipídico foi avaliado pela expressão gênica de *PLIN1*(A), *PLIN2*(B), *FABP4*(C) e *ACAT1*(D). Os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina e representados como expressão relativa de RNAm. * para $p < 0,05$.

Assim como na avaliação da expressão de genes relacionados à expressão de adipocinas, procederam-se duas análises: entre os depósitos de tecido e entre pacientes ND e o paciente obeso diabético. Da mesma forma que observado na expressão de *LEPR* e *ADIPOQ*, todos os genes avaliados no paciente diabético, mostraram níveis de expressão mais elevados.

4.10 Avaliação de proteínas marcadoras de função do tecido adiposo.

Na análise da função do tecido adiposo, utilizamos da técnica de *Western Blot*, para avaliar 3 proteínas marcadoras de função do adipócito: adiponectina (análise de função endócrina), perilipina (análise de função lipolítica) e *PPAR- γ* (adipogênese e lipogênese). A

comparação entre amostras de tecido adiposo subcutâneo, pré-peritoneal e visceral de paciente obeso e amostra de tecido subcutâneo de paciente ex-obeso gerou um resultado curioso: em relação à perilipina e PPAR γ , todas as amostras apresentaram quantidades semelhantes. Em relação à adiponectina, não podemos afirmar se há ou não diferenças entre os tecidos do paciente obeso e entre o tecido adiposo sc do paciente ex-obeso, uma vez que não houve quantidade detectável desta proteína.

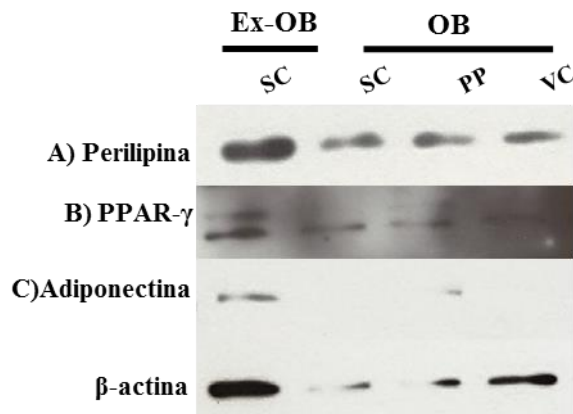


Figura 4-10 Avaliação de proteínas marcadoras de função do tecido adiposo por Western blot. Amostras de três depósitos de tecido adiposo subcutâneo (sc), pré-peritoneal (pp) e visceral (vc) de paciente obeso (n=1) e de tecido adiposo subcutâneo de paciente ex-obeso (n=1) foram avaliadas através de Western blot para a presença de perilipina (A), PPAR γ (B) e adiponectina (C). Para este ensaio foram utilizados 10 μ g de proteína e anticorpos específicos para as proteínas de interesse.

4.11 Comparação do rendimento total de lipídios em depósitos de tecido adiposo distintos

Com o intuito de avaliar a quantidade total de lipídios fornecida por cada depósito de tecido adiposo, submetemos as amostras de tecido subcutâneo, pré-peritoneal e visceral à extração lipídica pelo método *Bligh and Dyer* e pesamos o extrato lipídico total seco. O gráfico acima mostra a razão entre a quantidade de partida de tecido adiposo e o rendimento de extrato de lipídios totais (mg), sendo esta razão maior no tecido adiposo subcutâneo. Tanto o tecido pré-peritoneal quanto o tecido visceral apresentaram um rendimento semelhante na extração de lipídios.

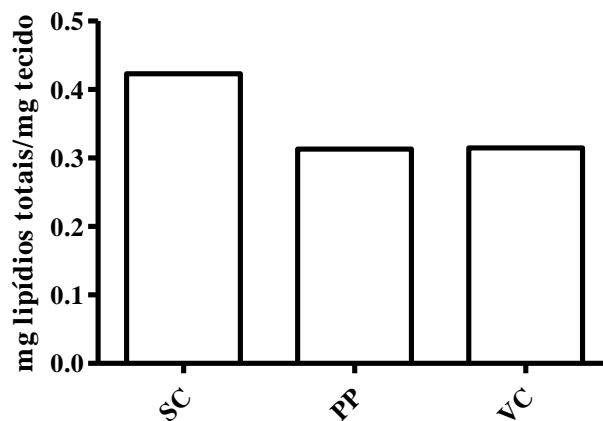


Figura 4-11 Comparação do rendimento total de lipídios em depósitos distintos de tecido adiposo. Amostra de aproximadamente 50 mg de tecido adiposo subcutâneo (sc), pré-peritoneal (pp) e visceral (vc) foram submetidas à extração lipídica pelo método Bligh and Dyer. Observa-se no gráfico a razão entre o total de lipídios obtidos e a quantidade inicial de tecido adiposo ($n=1$).

4.12 Análise do perfil de lipídios neutros em tecido adiposo humano.

Com objetivo de avaliar a composição lipídica de cada depósito de tecido adiposo, fizemos uma análise inicial do perfil de lipídios neutros por meio da técnica de cromatografia em camada delgada. Esta análise foi feita em dois pacientes, ambas mulheres sem hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo II. A princípio, foi avaliada a presença de triacilglicerol (TAG), colesterol (CO) e éster de colesterol (CE). Embora, apresentando um quadro clínico aparentemente semelhante, o perfil de lipídios neutros foi diferente entre o OB25 (figura 4-12A) e OB02 (figura 4-12B). No primeiro paciente (OB25), há maior quantidade de TAG no tecido subcutâneo, seguido do tecido adiposo pré-peritoneal e em menor quantidade no tecido adiposo visceral. Observa-se ainda, maior quantidade de colesterol no tecido adiposo pré-peritoneal do que nos outros dois tecidos.

No segundo paciente (OB02), os três depósitos de tecido adiposo apresentaram, aparentemente, mesma quantidade de TAG e CO. Em nenhum dos dois pacientes foi observado presença éster de colesterol na quantidade de amostra aplicada (100 μ g).

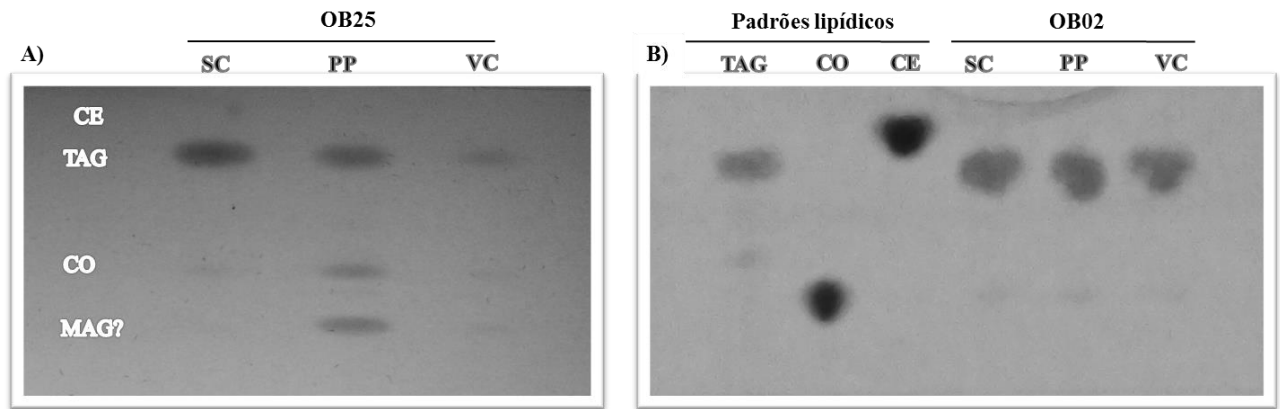


Figura 4-12 Análise do perfil de lipídios neutros em tecido adiposo. Amostras de tecido adiposo subcutâneo (sc), pré-peritoneal (pp) e visceral (vc) foram processadas para extração lipídica (método Bligh and Dyer) e submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD), nas condições específicas para análise de lipídio neutro (Hexano, Éter dietílico, Ácido Acético) . Em (A) e (B) observamos o perfil lipídico de paciente obeso OB25 e OB02, respectivamente. O ensaio foi conduzido com um total de 100 µg de extrato lipídico por amostra e 10 µg por padrão de lipídio, sendo estes: triacilglicerol (TAG), éster de colesterol (CE), colesterol (CO) e monoacilglicerol (MAG).

5 DISCUSSÃO

A associação entre a obesidade e o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II tem sido alvo de estudos há décadas (Hamman, 1992, Swinburn e cols., 1991). Indivíduos obesos com frequência desenvolvem resistência à insulina. Esta é caracterizada pela diminuição da habilidade da insulina em inibir a saída de glicose do fígado e em promover a captura de glicose pelas células musculares e adiposas (Qatanani e Lazar, 2007). A resistência à insulina é fator chave para o desenvolvimento de DMII. Esta é uma doença metabólica progressiva e multifatorial. A hiperglicemia, característica principal desta patologia é causada por diversas alterações metabólicas como a diminuição da secreção de insulina, o desenvolvimento de resistência à insulina, a produção excessiva de glucagon e a deterioração da função e quantidade de células β , no pâncreas (Colagiuri, 2010b). Assim como a obesidade, a incidência global de DM II é cada vez maior, sendo estimado um total de 347 milhões de indivíduos diabéticos. Segundo a OMS, em 2004 cerca de 3,4 milhões de pessoas morreram em decorrência de elevada taxa de glicemia. Estima-se que em 2030 a diabetes será a sétima principal causa de morte (WHO, 2013b). A insulina tem efeito em diversos tipos celulares, em particular o adipócito. Em células adiposas, a insulina promove o armazenamento de triglicerídeos por diversos mecanismos, que incluem (i) o aumento da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, estimulando o transporte de glicose e a lipogênese, assim como a inibição da lipólise e (ii) também através do aumento da captura de ácidos graxos a partir de lipoproteínas circulantes, ao aumentar a atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo (Kahn e Flier, 2000).

Resistência à insulina é o termo usado para se referir à deficiência de resposta à insulina no que diz respeito à captura, metabolismo e armazenamento de glicose. Na obesidade e na diabetes, a resistência à insulina manifesta-se pela diminuição do transporte e do metabolismo de glicose estimulado por insulina, no tecido adiposo e no músculo esquelético (Kahn e Flier, 2000). Estas alterações podem ser associadas também a uma diminuição, em adipócitos, de GLUT4. Além disso, já foi demonstrado que em adipócitos de pacientes obesos com DMII há uma diminuição na expressão de IRS-1 e que é necessário um nível muito mais elevado de insulina para que IRS-2 seja capaz de induzir ativação de PI3K (Rondinone e cols., 1997).

A atuação dos adipócitos como células endócrinas indica a associação entre a obesidade e a resistência à insulina e diabetes. A secreção de moléculas, como TNF- α e leptina, pelo tecido adiposo induzem alterações na ação da insulina, que apresentam papel importante no desenvolvimento desta condição frequentemente presente em obesos mórbidos (Al-Suhaimi e Shehzad, 2013, Torres-Leal e cols., 2010). O TNF- α , que em adipócitos age inibindo a lipogênese e aumentando a lipólise, inibe de maneira moderada a autofosforilação

do IR, assim como inibe fortemente a fosforilação de IRS-1, nos resíduos de tirosina (Hotamisligil, Murray, 1994). A leptina também atua alterando a sinalização de insulina, através de seu receptor ObRb. Após ativação do receptor de leptina, ocorre autofosforilação de JAK2, esta então, pode ativar IRS-1 e disparar a cascata de sinalização do receptor de insulina. Entretanto, na obesidade mórbida, é observado um quadro elevado de hiperleptinemia que resulta em resistência à leptina e esta diminui a sensibilidade à insulina (Yadav e cols., 2012). Considerando estes efeitos, a leptina parece modular a resposta à insulina, porém ainda não está bem esclarecida esta relação causa-efeito.

A análise comparativa entre o grupo de pacientes obesos e voluntários sadios mostrou um aumento da concentração plasmática de insulina nos pacientes obesos (figura 4-2A). Este nível plasmático de insulina é reduzido quando avaliamos esses mesmos pacientes que deixaram de ser obesos, após cirurgia de gastroplastia (figura 4-2B). Estes resultados são semelhantes aos descritos na literatura, os quais mostram que indivíduos obesos apresentam um nível de insulina elevado (Bagdade e cols., 1967) e que a redução de peso restaura a sensibilidade à insulina (Holte e cols., 1995). No entanto, nos pacientes com quadro de diabetes mellitus tipo II instalado, não há recuperação completa nos níveis de insulina após gastroplastia. Como esperado, os resultados exibidos na figura 4-3 complementam o dado acima discutido. Quando observamos os níveis de leptina plasmático, pacientes obesos apresentaram maior concentração plasmática deste hormônio quando comparados a indivíduos com IMC normal. Com a redução ponderal após a cirurgia, a concentração plasmática de leptina foi restabelecida, apresentando-se semelhante a do grupo controle. Como já descrito, a secreção de leptina é proporcional à quantidade de tecido adiposo, apresentando o grande obeso um quadro de hiperleptinemia. Após a cirurgia de gastroplastia, o indivíduo perde quantidade significativa de massa de tecido adiposo, o que leva à normalização dos níveis de leptina plasmática (figura 4-3A). Tal perfil é observado tanto em pacientes obesos não diabéticos (OB01-OB10) quanto em pacientes obesos diabéticos (OB04 e 05), embora esta redução seja menos expressiva nestes dois (figura 4-3B).

A obesidade é considerada uma doença que cursa com moderada inflamação crônica e esta inflamação leva a um crescente infiltrado de macrófagos e outras células do sistema imune no tecido adiposo. Assim como as células imunes, os adipócitos são capazes de secretar uma variedade de moléculas pró e anti-inflamatórias que atuam de forma parácrina e sistêmica, contribuindo para as alterações clínicas presentes no obeso (Harford e cols., 2011). Fizemos a análise do perfil plasmático de adipocinas em pacientes obesos, comparando ao grupo de voluntários sadios. De maneira surpreendente, os pacientes com obesidade mórbida demonstraram concentração plasmática de quase todas as adipocinas analisadas semelhantes

ou inferiores ao grupo de voluntários saudáveis (figura 4-4), com exceção da leptina, tal como foi observado no resultado discutido acima (figura 4-4B). Além disso, em relação à dosagem de resistina (figura 4-4C), MCP-1 (figura 4-4E) e PAI-1 (figura 4-4F) que são adipocinas caracteristicamente pró-inflamatórias e que têm participação importante no desenvolvimento de outras co-morbidades associadas à obesidade (DMII e doenças cardiovasculares), o grupo controle mostrou níveis significativamente maiores do que o grupo OB e Ex-OB. Embora altos níveis de adipocinas circulantes estejam associados ao quadro de obesidade (Tilg e Moschen, 2006), nossos resultados foram discrepantes aos dados encontrados na literatura. Todos os pacientes incluídos neste estudo são obesos mórbidos com $IMC \geq 40$. Sendo assim, acreditamos que o acompanhamento clínico prévio à cirurgia de gastroplastia tenha tido papel fundamental na redução desses marcadores inflamatórios. No do Programa Multidisciplinar de Atendimento ao Obeso Mórbido – HUCFF/UFRJ, o paciente antes de ser submetido à cirurgia bariátrica, começa seu tratamento após avaliações com diversos grupos de profissionais. Este paciente durante o período pré-cirúrgico passa por um controle alimentar, acompanhamento de profissionais de educação física e fisiatras, onde são passados exercícios físicos de acordo com a limitação de cada indivíduo, acompanhamento cardiológico, entre outros. Neste ínterim, o indivíduo que antes não apresentava normalmente hábitos saudáveis, passa a exercê-los de maneira rotineira, onde alguns apresentam até ligeira redução de peso (tabela 4-1). Não obstante, todos os voluntários usados no grupo controle fossem hígidos e com IMC considerado normal, não foi feito nenhum acompanhamento semelhante ao do indivíduo obeso presente neste estudo (como controle nutricional e exercício físico), o que pode justificar os níveis mais elevados destas moléculas inflamatórias (Calder e cols., 2009). Pretendemos estender essa parte do estudo com resultados obtidos no início do acompanhamento pré-cirúrgico, ou seja, tão logo o paciente entre no programa. Se esta redução nos níveis de mediadores inflamatórios for confirmada, será possível mostrar a melhora da condição clínica do paciente mesmo sem o procedimento cirúrgico.

Além da comparação dos níveis de adipocinas entre pacientes obesos e voluntários saudáveis, outra avaliação mostrou-se importante: a comparação pareada deste perfil inflamatório entre os pacientes com obesidade e após redução ponderal (figura 4-5). De maneira interessante, nesta análise, apenas a leptina (figura 4-5B) e a resistina (figura 4-5C), mostraram-se estatisticamente diferentes entre o grupo OB e Ex-OB, nos quais ocorreu redução e aumento, respectivamente, dos níveis plasmáticos circulantes com a perda de peso. Em relação à leptina, assim como já demonstrado na figura 4-3, a redução dos níveis de leptina foi proporcional à redução da massa de tecido adiposo, como esperado (Xenachis e cols., 2001). A resistina é majoritariamente secretada por adipócitos e macrófagos presentes no

tecido adiposo visceral. Elevados níveis desta proteína levam a uma superprodução de glicose pelo fígado e inibição do processo de diferenciação adipogênico, porém os mecanismos envolvidos ainda não são claros (Steppan, Bailey, 2001, Wolf, 2004). Apesar de já ter sido demonstrado em ratos, que elevados níveis de resistina induzem resistência à insulina hepática e aumento da produção de glicose, em humanos este assunto é bastante controverso (Lee e cols., 2003). Assim como nossos resultados, Koebnick e colaboradores observaram um aumento nos níveis de resistina em consequência da perda de peso (Elloumi e cols., 2009, Koebnick e cols., 2006), porém outro estudo mostrou nenhuma alteração na quantidade de resistina circulante em decorrência do emagrecimento (Reinehr e cols., 2006); tornando-se evidente a necessidade de maior investigação.

Outro ponto interessante na análise pareada destes pacientes é observada na figura 4-5D. Estudos associaram a diminuição dos níveis plasmáticos de TNF- α com a redução do peso (Dandona e cols., 1998, Kern e cols., 1995) e a melhora da sensibilidade à insulina. Entretanto, no nosso estudo não foi observada esta variação. Quando fazemos a análise pareada, assim como no trabalho de Xenachis (2001), as variações entre obesos e não obesos não foram significativas, não podendo ser associadas, por exemplo, à redução de insulina (figura 4-2). Tais resultados mostram que não há uma relação imediata do nível de adipocinas com a insulina, de maneira a evidenciar ainda mais a complexidade dos mecanismos que levam à resistência à insulina. Ainda em relação à análise comparativa do perfil plasmático inflamatório entre obesos e ex-obesos, observamos que a redução de peso levou a um comportamento mais homogêneo desta população, principalmente nos níveis de TNF- α , MCP-1, IL-8 e TGF- β (figura 4-5 D, E, I e J). Embora este resultado seja bastante interessante, é necessária maior investigação (com número maior de indivíduos) para confirmação de tal comportamento.

Além da análise do perfil de mediadores inflamatórios destes pacientes com obesidade mórbida, pretendemos caracterizar três diferentes depósitos de tecido adiposo (SC, PP e VC) obtidos durante cirurgia de gastroplastia e analisar se as características de cada depósito podem ser associadas a contribuições distintas em relação à liberação de adipocinas. O interesse em avaliar e comparar estes três depósitos de tecido adiposo teve início com a observação das características macroscópicas distintas entre eles (coloração, tamanho dos lóbulos, vascularização). Além disso, os diferentes depósitos de tecido adiposo também variam em relação ao tamanho da célula adiposa e esta variação de tamanho parece estar diretamente relacionada às variações metabólicas entre os tecidos (figura 4-7) (Tchoukalova e cols., 2008). O'Connell e colaboradores, avaliaram o tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos com presença ou ausência de desordens metabólicas. Durante este estudo,

os autores observaram relação direta entre o tamanho do adipócito do omento e os graus de resistência à insulina e de esteatose hepática. O tamanho do adipócito oriundo do tecido adiposo subcutâneo também correlacionou-se com o grau de deposição de gordura no fígado, porém não se observou correlação com os distúrbios metabólicos da obesidade (O'Connell J, 2010). De especial interesse, destaca-se o tecido adiposo pré-peritoneal. Este depósito – observado apenas em indivíduos obesos – é acessado e descartado durante a cirurgia de gastroplastia e apresenta-se visualmente diferente do tecido adiposo subcutâneo e visceral. Temos como hipótese que este tecido pode contribuir de forma diferente para as alterações metabólicas destes pacientes (figura 4-6). O tecido adiposo pré-peritoneal é pouco descrito na literatura, em contraste aos estudos de tecido adiposo subcutâneo e visceral na obesidade. (Tchernof e Despres, 2013, , Vohl e cols., 2004). Tendo isso em vista, torna-se necessário um estudo com número maior de pacientes, que permita verificar se há diferença entre os depósitos de tecido adiposo avaliados (sc, pp e vc), e se esta diferença reflete alterações metabólicas presentes no grande obeso.

O conceito do tecido adiposo como um depósito de lipídios inerte mudou radicalmente nas últimas décadas, sendo agora também considerado um órgão secretor ativo, com função reguladora na modulação do apetite, no gasto de energia, na sensibilidade à insulina, no sistema endócrino e reprodutivo, no metabolismo ósseo, na inflamação e na imunidade (Fantuzzi, 2005). No contexto de inflamação e imunidade, o tecido adiposo secreta uma variedade de moléculas que atuam de maneira local (autócrina/parácrina) e sistêmica (endócrina), já citadas neste trabalho. A leptina e a adiponectina apresentam-se como as adipocinas mais abundantes produzidas pelos adipócitos, sendo a primeira de caráter pró-inflamatório e a segunda, anti-inflamatório. Em indivíduos obesos, a resistência hipotalâmica à leptina, decorrente da hiperleptinemia, tem sido associada diretamente ao desenvolvimento da resistência à insulina (Correia e Rahmouni, 2006). Além disto, esta proteína estimula a secreção de diversos mediadores inflamatórios como, por exemplo, TNF- α , IL-6, IL-8. De fato, o receptor de leptina é encontrado em diversos tipos celulares do sistema imune, destacando-se monócitos/macrófagos, sendo estas células abundantes no tecido adiposo do obeso mórbido (Fernandez-Riejos e cols., 2010). Embora neutrófilos também respondam quimiotaticamente à leptina, até agora só foi observada a presença da forma curta do Ob-R. Esta isoforma não possui capacidade plena de transdução do sinal e não se sabe ao certo sua função. A leptina também é capaz de modular a ativação de eosinófilos e isto tem sido alvo de estudos na relação asma-obesidade.

No tecido adiposo, particularmente na obesidade, a leptina tem papel importante na manutenção do estado de inflamação crônica do grande obeso. A adiponectina tem sido

correlacionada com maior sensibilidade à insulina e diminuição da incidência de doenças cardiovasculares. Embora presente em altas concentrações, esta proteína tem níveis circulantes menores em indivíduos obesos do que em indivíduos magros, e apesar de ser secretada exclusivamente por adipócitos, sua concentração é inversamente proporcional à massa de tecido adiposo (Lihn e cols., 2005). Esta contradição ainda não foi explicada na literatura e acreditamos que a resposta poderá ser encontrada pela análise dos diferentes depósitos de tecido adiposo. O receptor de adiponectina (AdipoR) também está presente em células do sistema imune, principalmente monócitos, células B e células NK (Pang e Narendran, 2008). A adiponectina é capaz de estimular a produção de IL-10 e IL-1RA (citocinas anti-inflamatórias) em uma variedade de células mielóides (monócitos, células THP-1, células dendríticas, macrófagos). Macrófagos tratados com adiponectina foram caracterizados pela redução de IFN- γ , assim como por uma limitada habilidade de evocar a proliferação de células T. Isso indica a adiponectina como uma importante proteína reguladora de processos imunológicos, principalmente pela modulação da função macrofágica (Wolf AM, 2004).

Assim, para que pudéssemos avaliar a contribuição de diferentes depósitos de tecido adiposo (sc, pp, e vc) para o quadro inflamatório dos obesos presentes neste estudo, foi feita a análise da expressão gênica de duas proteínas relacionadas com este contexto: a leptina e a adiponectina. Van Harmelen e colaboradores demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo expressa (mRNA) e secreta mais leptina que o tecido adiposo visceral (omento) (Kloting e cols., 2009, Van Harmelen V, 1998). Assim como os dados encontrados para leptina, nossos resultados demonstram que o tecido adiposo subcutâneo também apresenta maior expressão de LEPR do que o tecido adiposo visceral (figura 4-8A). O tecido pré-peritoneal aparentemente possui uma expressão gênica intermediária entre estes outros dois depósitos. Em relação à expressão de adiponectina, nossa avaliação resultou em níveis de expressão gênica semelhantes nos três tecidos analisados, ao contrário do observado na literatura, em que o tecido adiposo visceral (no obeso) apresenta níveis inferiores de expressão de ADIPOQ, quando comparados com o tecido adiposo subcutâneo (figura 4-8B) (Fisher e cols., 2002). A análise do paciente diabético mostra que tanto LEPR quanto ADIPOQ, apresentam um nível de expressão mais elevado, sendo provável que este comportamento se deva ao fato de que o paciente com diabetes mellitus tipo II possui já bem estabelecido um quadro metabólico e endócrino muito mais alterado do que em um paciente apenas com obesidade mórbida. No entanto, entendemos que para todas essas análises, só poderemos ter uma conclusão definitiva com os resultados obtidos de um número maior de pacientes.

Quanto à secreção de adiponectina nos depósitos de tecido adiposo sc, pp e vc, o mesmo resultado é observado: não há diferença significativa entre estes três depósitos no indivíduo obeso avaliado e nem em comparação com o tecido adiposo subcutâneo do paciente ex-obeso (figura 4-10C). No entanto, é necessário continuar tal investigação com número maior de amostras uma vez que já foi descrito na literatura que pacientes que perderam peso obtiveram aumento significativo nos níveis circulantes de adiponectina. (Dalmas e cols., 2011).

O estado inflamatório crônico presente na obesidade e os diversos componentes patológicos desta condição têm sido associados à disfunção do tecido adiposo. A lipotoxicidade advinda do desbalanço entre os processos de lipogênese e lipólise têm sido alvo de estudos e é proposta como um dos principais fatores do agravamento da desregulação metabólica presente na obesidade. Triacilgliceróis constituem a maior parte da reserva de lipídios no tecido adiposo. Assim, fatores que controlam o armazenamento e a mobilização de TAG nos adipócitos são importantes reguladores do acúmulo de gordura em diversos depósitos de tecido adiposo. TAG surgem nos adipócitos através de duas principais rotas: síntese de novo a partir de precursores não lipídicos e pela captura de ácidos graxos do plasma (Lafontan e Langin, 2009). A lipólise no tecido adiposo tem sido considerada uma via metabólica simples e bem compreendida, onde catecolaminas, peptídeos natriuréticos e insulina são considerados seus principais reguladores, em humanos. O desbalanço entre a hidrólise e a síntese de TAG pode ter papel importante na obesidade. No entanto, não há a completa compreensão de como restabelecer estes processos no obeso. Durante este processo, o TAG intracelular é submetido à hidrólise através da ação de três principais lipases: ATGL (do inglês *adipose triglyceride lipase*), HSL (do inglês *hormone-sensitive lipase*) e MGL (do inglês *monoacylglycerol lipase*). De maneira recíproca, altas taxas de lipólise em conjunto com a metabolização prejudicada de ácidos graxos livres (AGL) pelo músculo esquelético e fígado, podem ser os maiores contribuidores para as anormalidades metabólicas presentes em indivíduos obesos e no desenvolvimento de DMII.

Adipócitos maduros contêm em sua estrutura uma única gota lipídica que ocupa a maior parte do citosol. As gotas lipídicas são consideradas organelas dinâmicas que possuem papel primordial no armazenamento intracelular de lipídios e no processo de lipólise. Para que este último ocorra, as lipases presentes no citosol são ancoradas às proteínas estruturais da gota lipídica (perilipina, ADRP e TIP47) (Brasaemle e cols., 2004), permitindo acesso à região hidrofóbica onde estão se localizam os TAG. AGL são altamente tóxicos para células e esse caráter lipotóxico é associado à patologia da obesidade e da diabetes mellitus tipo II (Virtue e Vidal-Puig, 2010). O armazenamento dos AGL na gota lipídica dos adipócitos

protege a célula dos efeitos nocivos dessas moléculas. A perilipina é a proteína estrutural de gota lipídica mais ativada por estímulos hormonais lipolíticos e é essencial para a atuação das lipases da célula adiposa. Outra proteína que merece destaque no processo de lipólise é a FABP4 (do inglês *fatty acid binding protein-4*). FABP4 localiza-se no citosol do adipócito e está envolvida com o tráfego de ácidos graxos e ácido retinóico (Matarese e Bernlohr, 1988); esta proteína age como uma chaperona, facilitando a captura de AGL e a lipólise (Furuhashi e Hotamisligil, 2008, Hotamisligil e cols., 1996). Sua importância no processo de liberação de AG foi observada em estudos onde camundongos nocautes para FABP4 tiveram uma diminuição na capacidade lipolítica basal e um aumento significativo nos níveis de AG intracelular (Hotamisligil, Johnson, 1996).

Na análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, onde PLIN1, PLIN2, FABP4 e ACAT1 referem-se aos genes das proteínas perilipina, ADRP, FABP4 e ACAT1, respectivamente, observamos que apenas em relação à proteína estrutural de gota lipídica, perilipina, houve diferença de expressão entre os tecidos (figura 4-9). O tecido adiposo visceral apresentou níveis maiores de PLIN1 quando comparados ao tecido adiposo subcutâneo (figura 4-9A). Tal resultado corrobora com achados na literatura onde o tecido adiposo visceral apresenta maior capacidade lipolítica do que os tecidos adiposos subcutâneo e glúteo-femural (Arner, 1995, Wajchenberg, 2000). Essa maior capacidade lipolítica é atribuída ao tecido adiposo visceral devido à elevada presença de receptores de catecolaminas (β -adrenérgico, $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -adrenérgico), que participam substancialmente da regulação da lipólise e da sua baixa responsividade ao controle antilipolítico realizado pela insulina e seu receptor (Londos, 2004). A regulação da lipólise por catecolaminas ocorre após ativação dos receptores β -adrenérgico, em especial o receptor $\beta 3$. Por meio de proteína Gs, estes ativam a enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc e conseqüentemente, ativando PKA. Esta por sua vez, leva à ativação da HSL e à fosforilação da perilipina. A perilipina quando fosforilada muda de conformação e acomoda a HSL – que migra para a superfície da gota lipídica, facilitando a ancoragem da HSL e, conseqüentemente, o processo de lipólise (Sztalryd e cols., 2003, Tansey e cols., 2004).

Embora tenha sido observada a diferença em relação ao nível de expressão gênica de PLIN1 no tecido adiposo visceral, esta não foi detectada quando observamos a expressão da proteína via *Western blot* (figura 4-10A). Nesta análise, todos os três depósitos de tecido adiposo (sc, pp e vc) apresentaram a mesma quantidade de perilipina. Sendo assim, é necessária uma análise mais ampla para se determinar a contribuição de cada um desses três depósitos de tecido, para o elevado nível de ácidos graxos livres circulantes presentes no obeso. Em outro estudo em humanos *in vivo*, foi encontrada uma maior resposta lipolítica do

tecido adiposo subcutâneo quando comparado ao tecido adiposo pré-peritoneal (Enevoldsen, Simonsen, 2001).

Juntamente com a análise das proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, julgamos importante avaliar o conteúdo lipídico majoritário de cada depósito de tecido adiposo, uma vez que alguns estudos sugeriram a existência de diferenças de composição lipídica em relação ao depósito de tecido adiposo (Hirsch e cols., 1960, Kotronen e cols., 2010). Entretanto, na maioria dos estudos sobre tecido adiposo, não existe menção ao tecido adiposo pré-peritoneal, tanto em relação às análises lipídicas quanto proteicas. Na avaliação da quantidade total de lipídios (figura 4-11), os tecidos PP e VC apresentam rendimentos semelhantes ao tecido adiposo subcutâneo; porém o dado obtido é proveniente do estudo de apenas um paciente. Quando observamos o perfil de lipídios neutros de dois pacientes, notamos que em cada um houve um comportamento diferente para os três depósitos de tecido adiposo (figura 4-12). Na primeira análise (OB25), o tecido adiposo SC apresentou maior quantidade de TAG do que os tecidos PP e VC, sendo que o tecido adiposo visceral demonstrou quantidade inferior de triacilglicerol e o tecido adiposo pré-peritoneal ocupou posição intermediária. Quanto à quantidade de colesterol, o tecido PP apresentou maior quantidade deste lipídio quando comparados aos tecidos SC e VC. Na análise do segundo paciente (OB02), foi observado uma mudança neste padrão. Neste paciente a fração de TAG é a majoritária de acordo com o primeiro paciente assim como com a literatura. No entanto, não houve diferença entre os três depósitos, tanto em relação ao conteúdo de TAG como em relação ao CO. Estes dados são interessantes, mesmo com poucos tecidos analisados, pois já demonstra que existem diferenças individuais significativas entre os mesmos, o que não é muito questionado na literatura.

Tendo isto em vista, torna-se ainda mais evidente a necessidade de uma investigação mais aprofundada do conteúdo lipídico de cada depósito, uma vez que apesar do tecido adiposo visceral ser considerado (tradicionalmente) o maior contribuidor para a patologia da obesidade, observa-se nitidamente uma variação individual, podendo sugerir que mais que a localização, o conteúdo lipídico também é primordial para tal designação.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as observações feitas neste trabalho, podemos concluir que:

- ✓ Tal como retratado na literatura, pacientes obesos apresentam concentração plasmática mais elevada de insulina e leptina. Após redução de peso, ocorre reversão deste quadro que sugere estar associado diretamente com a melhora do quadro clínico do paciente, principalmente no que concerne à sensibilidade à insulina e diabetes Mellitus tipo II;
- ✓ Os pacientes incluídos neste estudo apresentaram baixos níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios (TNF- α , MCP-1, PAI-1 e resistina) quando comparados a indivíduos com IMC normal. O que sugere que o acompanhamento pré-cirúrgico é importante na melhora do quadro clínico do grande obeso e na sua recuperação pós-cirurgia de gastroplastia.
- ✓ Os três depósitos de tecido adiposo, embora da mesma região abdominal, apresentam diferenças macroscópicas, sugerindo que tais características morfológicas estejam correlacionadas com funções diferentes para cada depósito;
- ✓ Os três depósitos de tecido adiposo SC, PP e VC apresentam algumas variações quanto à expressão gênica de proteínas relacionadas à inflamação (LEPR) e ao metabolismo lipídico (PLIN1). A menor expressão de LEPR no tecido adiposo visceral sugere uma maior resistência à leptina neste tecido quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo;
- ✓ Os tecidos SC, PP e VC variam em relação ao conteúdo lipídico, aparentemente tanto na quantidade quanto no tipo de lipídio. Desta forma, é possível sugerir que além da localização de cada depósito de tecido adiposo, seu conteúdo lipídico pode estar relacionado à contribuição de cada tipo de tecido para as co-morbidades associadas à obesidade, principalmente em relação à DM II.

7 Referências Bibliográficas

Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*2010 May;42(5):555-9.

Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res*2013;18:12.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, e cols. . Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*1999 Apr 2;257(1):79-83.

Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*1995 Aug;27(4):435-8.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte D, Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*1967 Oct;46(10):1549-57.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*1959 Aug;37(8):911-7.

Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*1997 Jan;46(1):3-10.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*2002 Jun;32 Suppl 3:14-23.

Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, e cols. . The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*1990 May 24;322(21):1477-82.

Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*2004 Nov 5;279(45):46835-42.

Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, Marcinkiewicz A, Rothenberg A. Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem*2009 Jun;326(1-2):15-21.

Bremer AA, Jialal, I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *Journal of Obesity*2013;2013:393192.

Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, e cols. . Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*2009 May;101 Suppl 1:S1-45.

Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, e cols. . Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*2006 Jun;55(6):1554-61.

Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*1991 Sep;5(9):1538-52.

Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol*2010 Apr 29;318(1-2):61-8.

Colagiuri S. Diabesity: therapeutic options. *Diabetes, Obesity and Metabolism*2010a;2(6):463-73

Colagiuri S. Diabesity: therapeutic options. *Diabetes Obes Metab*2010b Jun;12(6):463-73.

Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*1973 Aug;9(4):294-8.

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, e cols. . The metabolic syndrome. *Endocr Rev*2008 Dec;29(7):777-822.

Correia ML, Rahmouni K. Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*2006 Nov;8(6):603-10.

Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE, Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*1999 Feb;10(1):3-10.

Crespi MCWaCM. The influence of childhood and adolescent environmental exposure to a westernized environment on the relation between body mass index and adiposity in young Asian American women. *The American Journal of Clinical Nutrition*2010;93(5):1168-7.

Dalmas E, Rouault C, Abdennour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, e cols. . Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr*2011 Aug;94(2):450-8.

Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*1998 Aug;83(8):2907-10.

Delavari M, Sonderlund AL, Swinburn B, Mellor D, Renzaho A. Acculturation and obesity among migrant populations in high income countries--a systematic review. *BMC Public Health*;13:458.

Delgado J, Barranco P, Quirce S. Obesity and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*2008;18(6):420-5.

Deng J, Hua K, Caveney EJ, Takahashi N, Harp JB. Protein inhibitor of activated STAT3 inhibits adipogenic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*2006 Jan 20;339(3):923-31.

Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res*2008 Sep;49(9):1894-903.

Elloumi M, Ben Ounis O, Makni E, Van Praagh E, Tabka Z, Lac G. Effect of individualized weight-loss programmes on adiponectin, leptin and resistin levels in obese adolescent boys. *Acta Paediatr*2009 Sep;98(9):1487-93.

Enevoldsen LH, Simonsen L, Stallknecht B, Galbo H, Bulow J. In vivo human lipolytic activity in preperitoneal and subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2001 Nov;281(5):E1110-4.

Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lisanti MP, Scherer PE. Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*2000 Oct;14(10):1557-69.

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*1998 Apr;10(2):165-73.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*2005 May;115(5):911-9; quiz 20.

Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*2006 Mar;45(2):120-59.

Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martin-Romero C, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, e cols. . Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm*2010;2010:568343.

Fernandez M, Acuna MJ, Reyes M, Olivares D, Hirsch S, Bunout D, e cols. . Proliferation and differentiation of human adipocyte precursor cells: differences between the preperitoneal and subcutaneous compartments. *J Cell Biochem*2010 Oct 15;111(3):659-64.

Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ, e cols. . Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res*2002 Nov-Dec;34(11-12):650-4.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*1998 Oct 22;395(6704):763-70.

Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*2008 Jun;7(6):489-503.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* Mar 25;316(2):129-39.

Gertler A. *Leptin and Leptin Antagonists*. Austin - Texas: Landes Bioscience; 2009.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*2011;29:415-45.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*2008 May;9(5):367-77.

Hamaguchi K, Itabashi A, Kuroe Y, Nakano M, Fujimoto E, Kato T, e cols. . Analysis of adipose tissues and stromal vascular cells in a murine arthritis model. *Metabolism*2012 Dec;61(12):1687-95.

Hamman RF. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev*1992 Dec;8(4):287-338.

Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*2011 Nov;70(4):408-17.

Harp JB, Franklin D, Vanderpuije AA, Gimble JM. Differential expression of signal transducers and activators of transcription during human adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*2001 Mar 9;281(4):907-12.

Hirsch J, Farquhar JW, Ahrens EH, Jr., Peterson ML, Stoffel W. Studies of adipose tissue in man. A microtechnic for sampling and analysis. *Am J Clin Nutr*1960 Jul-Aug;8:499-511.

Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L, Lithell H. Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*1995 Sep;80(9):2586-93.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*1995 May;95(5):2409-15.

Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*1996 Nov 22;274(5291):1377-9.

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*1994 May 24;91(11):4854-8.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*1993 Jan 1;259(5091):87-91.

Hudak CS, Sul HS. Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*;4:79.

Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, e cols. . Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*2003 Jul;52(7):1655-63.

Jaikanth C, Gurumurthy P, Cherian KM, Indhumathi T. Emergence of omentin as a pleiotropic adipocytokine. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* Jul;121(7):377-83.

Jensen M, Haymond, MW, Rizza, RA, Cryer, PE, Miles, JM. Influence of body fat distribution on free-fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 1989;80:1168-73.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*2000 Aug;106(4):473-81.

Kathleen Renquist B. **Obesity Classification** *Obesity Surgery*1998;8:480.

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*1953 Jan 15;140(901):578-96.

Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*2003 Jul;52(7):1779-85.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*1995 May;95(5):2111-9.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*2004 Jun;89(6):2548-56.

Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*1995 Dec 1;83(5):813-9.

Kloting N, Berthold S, Kovacs P, Schon MR, Fasshauer M, Ruschke K, e cols. . MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One*2009;4(3):e4699.

Koebnick C, Wagner K, Garcia AL, Gruendel S, Lahmann PH, Weickert MO, e cols. . Increase in serum resistin during weight loss in overweight subjects is related to lipid metabolism. *Int J Obes (Lond)*2006 Jul;30(7):1097-103.

Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepaa AL, e cols. . Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obesity (Silver Spring)*2010 May;18(5):937-44.

Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*2009 Sep;48(5):275-97.

Lee HY, Despres JP, Koh KK. Perivascular adipose tissue in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*2013 Oct;230(2):177-84.

Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, e cols. . Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*2003 Oct;88(10):4848-56.

Leff. Granneman. *Adipose Tissue in Health and Disease*: Wiley BlackWell; 2010.

Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*2005 Feb;6(1):13-21.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods*2001 Dec;25(4):402-8.

Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun*1997 Sep 18;238(2):648-52.

Londos C. Hormone-Sensitive Lipase, Perilipins, and the Control of Lipolysis in Adipocytes. In: Wilkins, LW, editor. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. 3 ed. Philadelphia2004.

Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol*2013 Jan;9(1):13-27.

Matarese V, Bernlohr DA. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem*1988 Oct 5;263(28):14544-51.

McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, e cols. . Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*2002 May;87(5):2407.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*1998 Dec;22(12):1145-58.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*1998 Apr 17;93(2):229-40.

O'Connell J, Lynch L, Cawood TJ, Kwasnik A, Nolan N, Geoghegan J, e cols. . The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLoS One*2010;5(4):e9997.

O'Connell J LL, Cawood T.J,Kwasnik A, Nolan N, Geoghegan J,McCormick A, O'Farrelly C, O'Shea D. The Relationship of Omental and Subcutaneous Adipocyte Size to Metabolic Disease in Severe Obesity. *Plos One*2010;5(4).

Pang TT, Narendran P. The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci*2008 Dec;1150:143-5.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, e cols. . Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*2003 Jan 10;300(2):472-6.

Paz-Filho G, Mastronardi C, Franco CB, Wang KB, Wong ML, Licinio J. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*2012 Dec;56(9):597-607.

Peinado JR, Pardo M, de la Rosa O, Malagon MM. Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics*2012 Feb;12(4-5):607-20.

Portal Brasil MS. Obesidade atinge mais da metade da população brasileira, aponta estudo.: 28/08/2013; 2013 [cited 2013 15/09/2013]; Available from: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2013/08/27/populacao-adulta-brasileira-possui-maioria-de-obesos-aponta-estudo>.

Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*2007 Jun 15;21(12):1443-55.

Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, e cols. . Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*2004 Jul;53(7):1671-9.

Rega-Kaun G, Kaun C, Wojta J. More than a simple storage organ: Adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*2013 Jul 11;110(3).

Reinehr T, Roth CL, Menke T, Andler W. Resistin concentrations before and after weight loss in obese children. *Int J Obes (Lond)*2006 Feb;30(2):297-301.

Reue K. A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res*2011 Nov;52(11):1865-8.

Roden M. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes—pathogenesis and clinical relevance. *NATURE CLINICAL PRACTICE ENDOCRINOLOGY & METABOLISM* 2006;2(6).

Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 15;94(8):4171-5.

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Dec;7(12):885-96.

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, e cols. . Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 2000 Aug 11;289(5481):950-3.

Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 Sep;4(9):a008417.

Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 2006 Jun;55(6):1537-45.

Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995;64:621-51.

Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012 Aug;23(8):407-15.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 2007 Jun;48(6):1253-62.

Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C. Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *J Inflamm (Lond)* 2011;8:9.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006 Nov;116(11):3015-25.

Silvestris GDPaF. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Journal of Obesity* 2013;2013.

Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 2012 Dec;13 Suppl 2:83-96.

Sonoli SS, Shivprasad S, Prasad CV, Patil AB, Desai PB, Somannavar MS. Visfatin--a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* Jan;15(1):9-14.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, e cols. . Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003 Jan 18;361(9353):226-8.

Stephens JM, Morrison RF, Pilch PF. The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1996 May 3;271(18):10441-4.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, e cols. . The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001 Jan 18;409(6818):307-12.

Swinburn BA, Nyomba BL, Saad MF, Zurlo F, Raz I, Knowler WC, e cols. . Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians. *J Clin Invest*1991 Jul;88(1):168-73.

Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, e cols. . Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*2003 Jun 23;161(6):1093-103.

Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*2002 Jul;51(7):2045-55.

Tan BK, Adya R, Randeve HS. Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*2010 Jul;20(5):143-8.

Tang QQ, Lane, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*2012;81:715-36.

Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life*2004 Jul;56(7):379-85.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*1997 Mar 7;272(10):6093-6.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, e cols. . Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*1995 Dec 29;83(7):1263-71.

Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*2013 Jan;93(1):359-404.

Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* Jan;93(1):359-404.

Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Tchoukalova Y, Karagiannides I, Forse RA, e cols. . Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*2002 May;282(5):R1286-96.

Tchkonia T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, e cols. . Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2005 Jan;288(1):E267-77.

Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpyak MV, Votruba SB, Wendland E, Jensen MD. Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *Am J Clin Nutr*2008 Jan;87(1):56-63.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*2006 Oct;6(10):772-83.

Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, Atherton PJ. Is irisin a human exercise gene? *Nature* Aug 30;488(7413):E9-10; discussion E-1.

Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, Tirapegui J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem Funct*2010 Dec 2;28(8):623-31.

Van Harmelen V RS, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, Arner P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*1998;47(6):913-7.

Vernon GB, A. ; Younossi Z. M. . Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*2011;34(3).

Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*2010 Mar;1801(3):338-49.

Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, e cols. . A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res*2004 Aug;12(8):1217-22.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*2000 Dec;21(6):697-738.

Wang D, Zhou Y, Lei W, Zhang K, Shi J, Hu Y, e cols. . Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates adipocyte differentiation via peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *Biol Cell*2009 Jan;102(1):1-12.

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

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, e cols. . Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*2001 May;86(5):1930-5.

WHO. Obesity and overweight. Março, 2013; 2013a [cited 2013 15/09/13]; Available from: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>

WHO. Diabetes. 2013b [cited 2013 28/10/2013]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.

Wolf AM WD, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(2):630-5.

Wolf G. Insulin resistance and obesity: resistin, a hormone secreted by adipose tissue. *Nutr Rev*2004 Oct;62(10):389-94.

Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*2012 Jun;205(2):194-208.

Wronska A, Kmiec, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*2011 Jun;205(2):194-208.

Wu Z, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*1999a Dec;11(6):689-94.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, e cols. . Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*1999b Feb;3(2):151-8.

Xenachis C, Samojlik E, Raghuwanshi MP, Kirschner MA. Leptin, insulin and TNF-alpha in weight loss. *J Endocrinol Invest*2001 Dec;24(11):865-70.

Yadav A, Kataria MA, Saini V. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*2012 Feb 18;417:80-4.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, e cols. . Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*2003a Jun 12;423(6941):762-9.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, e cols. . Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*2003b Jan 24;278(4):2461-8.

Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett*2007 Oct 15;112(2):61-7.

Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*2009;55(4):379-86.

Zhang Y PR, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*1994:425-32.

ANEXO I

Primer			
	Gene	Sense	Antisense
1	PLIN2	CAGACCATTCTCAGCTCCA	GCTTATCCTGAGCATCTGAA
2	PLIN1	TACTGACAACGTGGTGGACA	GTTGTCGATGTCCCGAATT
3	PRKACA	CCACAACCTGACTGGATTGCC	AGTFACTCGTATCCCCAGGG
4	LIPE	CACCCATAGTCAAGAACCCT	GACCGAGTCGTCCAGCAT
5	ATGL	AAGAGGAAGCTGGGCAGG	TCTCTGTAGGCGGCGCAG
6	CGI-58	CCAGCATCCAGTCCTTACGA	CGCAGATCTCCTTTACTTTCTGG
7	CAV1	GCGACCCTAAACACCTCAAC	TGCCGTCAAACCTGTGTGTC
8	RAB18	AAGGCCTGAAATTTGCACGA	GGCACATTGTACACCATCACA
9	LPL	TGCAGAAAGGAAAGGCACC	TCACAGAATTCACATGCCGT
10	ANGPTL4	GGACAAGAACTGCGCCAA	CGGAAGTACTGGCCGTTGA
11	FABP4	GGGCCAGGAATTTGACGAAG	TCTGCACATGTACCAGGACA
12	FABP5	GGTGCATTGGTTCAGCATCA	AGATCCGAGTACAGGTGACA
13	PPARg	TTAGATGACAGCGACTTGGC	TGTCTTCAATGGGCTTCACA
14	PPARd	CTGTCAAGTTCAACGCCCTG	TGGAACGTTTCATGAGGCCT
15	AMPK	CTGAACCACCTATACGCGCT	CCCAGCTCTTCATATGGGCT
16	ACLS1	TGGGAAGGATTCTGGTCTGA	TGGAGTCAGAAGGCCATTGT
17	ACLS3	TTTGAGTCCTGAACCGTGGGA	ATTCGCTCAATGTCCGCCT
18	PIK3CD	GCTGCTCAAAGACATCCAG	CACGGAGGGCTTCGTTAAAC
19	ACLS5	TGGGAAAGAAAGTGGCCTTAAA	GGTGTCAAGAGCCCATTTTCA
20	FATP1	CGTCTATGGGGTGGCTGTT	TCCTGGTATATCGCGTTGGG
21	FATP4	TGCACAAAACAGGAACCTACA	TGCACAAAACAGGAACCTACA
22	INSR	CATGGATGGAGGGTATCTGGA	GGGTTGAATTGCCAGCACAT
23	LEP	TTGTCACCAGGATCAATGACA	TGGAGCCCAGGAATGAAGTC
24	LEPR	TCCTGGGCACAAGGACTTAA	TGTTTGTGTCCCTGGGTACT
25	JAK2	TGGAGCTTTGGAGTGGTTCT	TGGAACACGATCATCTGTCCT
26	STAT3	CCCCGCACTTTAGATTCATTGA	GGTCAACTCCATGTCAAAGGT
27	STAT5A	GGCTCCCTATAACATGTACCCA	TAAGAGTTCCTCCACGTGCC
28	STAT5B	GTCCCAGGCTCACTATAACA	CGTCCATTGTGTCTCCAGA
29	SOCS2	CGGGAGCTCGGTCCAGACA	GTAGTCTGAATGCGAGCTATCT
30	SOCS3	GTACGATGCCCCGCTTTAAG	CTGGTTGGCTTCTGTGCTT
31	IRS1	AACCTCAGTCCTAACCGCAA	AAGTCTCGGAGCTATGCCTC
32	IRS2	TTGTCCCACCACTTGAAGGA	AAACAGTGCTGAGCGTCTTC
33	PI3KCG	GTGCTAACCCCTGACTTCT	TTTGTGTGATGACGAAGGGC
34	AKT1	CTTTCAGGGCTGCTCAAGAA	CGATGCTGCATGATCTCCTT
35	mtor	CATTGGAGACGGTTTGGTGA	TCATCATGAGAGAAGTCCCGA
36	s6k	TCGAAGATTTATTGGCAGCCC	AAGCACCTCTTCCCCAGAAA
37	4EBP	CGGGGACTACAGCACGAC	CACAGGTGAGTTCCGACACT
38	PDE3B	GTGGTGATGATGAAGACGGTG	AGCTGACAAAATATTCGCCGT
39	ADIPOQ	CCTGGTGAGAAGGGTGAGAA	CTTCAGCCCCGGGTACTC
40	ADIPOQR1	CTCGAATTCCTGAGCGCTTC	GAAGTGGACAAAGGCTGCTG
41	APPL1	ACATCAAGCGGGAGAAGTGA	GCCAGTCCAACAGAATCACA

	Gene	Sense	Antisense
42	RAB5	CACAGTCCTATGCAGATGACA	TTTGTGGTTCATTCTTTGGCAA
43	p38MAPK	TGGAGCAGTATTACGACCCG	AGGCAAGTCATCCAATTCCA
44	IKK(CHUK)	GCAAATGAGGAACAGGGCAA	AGCAACAACCTCCATAGGTTTG
45	NFKB	TCCTGCTCCTTCCAAAACAC	TCGGTGTAGCCCATTGTCT
46	RETN	AGCCATCAATGAGAGGATCCA	CTGGAGGTGACGCTCTGG
47	NAMPT	GCAGGGAATTTTGTACTACTGG	CCTTGCCATTCTTGAAGACAGT
48	ITLN1	CTTGTGTGCTGGAATGAGGG	GGAAGTGGCCTCTGGAAAGTA
49	Pref1	GCCCTCATCATCCACGCA	GCCCTCATCATCCACGCA
50	SLC2A4	CAACTGGACGAGCAACTTCA	GGAGGACCGCAAATAGAAGG
51	MAPK8(JNK1)	TGGAGGAGAGAACCAAGAATG	ACAGACGACGATGATGATGGA
52	MAPK9(JNK2)	ACAAAGAAGTCATGGATTGGGA	GGCGTTGCTACTTACTGCTG
53	IL1a	ACTGCCAAAGATGAAGACCA	TTAGTGCCGTGAGTTTCCCA
54	IL1b	ACTGAAAGCTCTCCACCTCC	CCCAAGGCCACAGGTATTTT
55	IL4	GATTCCTGAAACGGCTCGAC	ACTCTGGTTGGCTTCTTCA
56	IL6	CCAGAGCTGTGCAGATGAGT	CATTTGTGGTTGGGTCAGGG
57	IL8	CAAGGAAAACGGGTGCAGA	TGGCATCTTCACTGATTCTTGG
58	IL10	TACGGCGCTGTCATCGATTT	TCAAACACTCATGGCTTTGT
59	TNFa	GTGCTGTACCTCCATCGTGT	TCTCCTCATAGATTCCGGCC
60	MCP1	GCAAGTGTCCCAAAGAAGCT	TTTGGGTTTGCTTGTCCAGG
61	CCR2	AGTTCAGAAGGTATCTCTCGGT	GGCGTGTGTTGTTGAAGTCACT
62	MIF	GAACCGCTCCTACAGCAAGCT	GCGAAGGTGGAGTTGTTCCA
63	TGF-b1	CTACCATGCCAACTTCTGCC	CCGGGTTATGCTGGTTGTAC
64	PAI-1	CCCGAGGAGATCATCATGGA	GGGTCAGGGTTCATCACTT
65	CCL3	TGGCTCTCTGCAACCAGTTC	CACTGGCTGCTCGTCTCAA
66	HIF-1a	GTGAACAGAATGGAATGGAGCA	TCATAACTGGTCAGCTGTGGT
67	TLR4	AGTTTCCAGAACTGCAGGT	CTTAGGCTCTGATATGCCCA
68	RANTES	GCCACATCAAGGAGTATTTCT	ACACACTTGGCGGTTCTTTC
69	CD68	CTTTCACCAGCTGTCCACCT	AAGATGGACCGGTCAGTGG
70	HLADRA	AGCCCAACGTCCTCATCTGT	TCGAAAGCCACGTGACATTGA
71	CD14	CTCAATCTGTCGTTGCTGG	GTCTGTTGCAGCTGAGATCG
72	NOS2(iNOS)	TGAATGAGGAGCAGGTCGAG	CTGTCCTTCTTCGCTCGTA
73	MBP	AGGGCACGCTTCCAAAATT	GGTGGGTTTTTCAGCGTCTAG
74	EPO	GTGGATAAAGCCGTCAGTGG	GTGATTGTTCCGAGTGGAGC
75	MPO	TGCATCATCGGTACCCAGTT	ATCCGGGGCAATGAGATCTG
76	CD1a	CATCTTGGCGGTGATAGTGC	AAAGGAGAAGGGTGACGAGG
77	LPIN1	ACAGGAACATGCAAAGACCA	GGGAAAGTCTGAAGAATGGCT
78	CEBPA	CGCAACAACATCGCGGTG	GGTCATTGTCACTGGTCAGC
79	SREBF1	ATCTGTGAGAAGGCCAGTGG	CCACAAGAAGCAGGTCACAC
80	NCOA3	CATCAGGAAATTTGGCCAGGA	TCTGTCCCATGTGACCACTG
81	VEGFA	ATCCTGTGTGCCCTGATG	CTTGGTGAGGTTTGTATCCGC
82	CXCL12	GCCAACGTCAAGCATCTCAA	TTCGGGTCAATGCACACTTG
83	F13A1	AAACCCTGCGAAATGTCTGG	CACACTTCTTCCCACTGCAC

	Gene	Sense	Antisense
84	IL1RN	ATGTGCCTGTCCTGTGTCAA	CTGTTCTCGCTCAGGTCAGT
85	HPGDS	GCTCACGTATAATGCGCCTC	CCCAGTAGAAGTCTGCCCAA
86	RBP4	GCCTCTTTCTGCAGGACAAC	AGTCTGTGTCGACGATCCAG
87	ABCD1	GACGTGGAAGGCAAGATCTT	ACTGTAGCAAGTGTGTGTGG
88	B2M	AAGATGAGTATGCCTGCCGT	ATGCGGCATCTTCAAACCTC
89	PGK1	AAAGTCAGCCATGTGAGCAC	CTGAGAGCATCCACCCCAG
90	LDHA	GCACCCAGTTTCCACCATG	TGTCCCAAATGCAAGGAACA
91	DGAT1	CTCATGCAGTTTGGAGACCG	CACTTGTGCACAGGGATGTT
92	ACACA	AGGAGGATGGTGTCTCACTCG	TGGAATCCATGGCAACCTCT
93	PTEN	GCCAACCGATACTTTTCTCCA	GCTAGCCTCTGGATTTGACG
94	GPAM	GGGGAGGAACAGCGAGATT	GGCCAAGGAGTCTCTGTAA
95	IGFBP2	CAAGGGTGGCAAGCATCAC	GACCTGGTCCAGTTCCTGTT
96	PI3KCA	GGAGCCCAAGAATGCACAAA	GAGATTGGCATGCTGTGCGAA