

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

GLÁUCIA SOUZA DE ALMEIDA

**Efeito da leptina sobre leucócitos em modelo murino  
de obesidade induzida por dieta**

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

**Orientadora:** Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro

**RIO DE JANEIRO**

2017

Almeida, Gláucia Souza de .

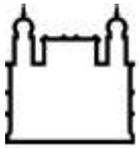
Efeito da leptina sobre leucócitos em modelo murino de obesidade induzida por dieta / Gláucia Souza de Almeida. - Rio de janeiro, 2017.  
65 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Clarissa Menezes Maya Monteiro.

Bibliografia: f. 58-63

1. Leptina. 2. Neutrófilos. 3. Obesidade. 4. Obesidade induzida por dieta.  
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Autora: GLÁUCIA SOUZA DE ALMEIDA**

**Efeito da leptina sobre leucócitos em modelo murino  
de obesidade induzida por dieta**

**ORIENTADOR: Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro**

**Aprovada em: 14/07/2017.**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Dr. Marcelo Pelajo Machado - Presidente**

**Prof. Dr. João Régis Ivar Carneiro**

**Prof. Dra. Carmen Cabanelas Pazos de Moura**

**Prof. Dr. Vinícius Frias – Revisor e Suplente Interno**

**Prof. Dra. Christianne Bandeira de Melo – Suplente Externa**

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2017.

Aos meus pais, Rudinei e Ivoneide, pelos valores e amor que recebi.

A minha orientadora, Clarissa, por acreditar em mim.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Dra Clarissa Menezes Maya Monteiro. Muita obrigada, não só pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho, mas por toda a compreensão, suporte e ajuda para que essa tese se finalizasse. Obrigada pela sua generosidade e amizade.

À Dra. Patrícia Torres Bozza, obrigada pelas preciosas sugestões para o desenvolvimento deste projeto.

À equipe leptina: Sally, Lohanna, Jessica, Narayana, Mariana e Jamile pela imensa ajuda, apoio e companheirismo. Não tenho palavras para dizer o quanto a ajuda de vocês foi importante nesses anos de tese. Obrigada por todo o suporte.

A Dra. Adriana Vallochi pela ajuda imensurável dentro e fora do laboratório. Você teve um papel essencial para a conclusão dessa tese.

Em especial, ao Dr. Hugo Caire, Dra. Adriana Ribeiro Silva, Dra. Rachel Novaes, Dra. Patrícia Reis, Dr. Valber Frutuoso, Dra. Cecília Jacques, Dr. Thiago Moreno e a Dra. Tatiana Maron pelas discussões de resultados.

Aos demais membros do Laboratório de Imunofarmacologia: Livia, Vinicius, Juliana, Ester, Léo, Ana Paula, Alan, Luciana, Surrage, Eugênio, Isabel, Isaclaudia, André, Cassiano, Ligia pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos queridos Edson e Rose. Obrigada pela ajuda inestimável.

À coordenação da pós-graduação e à secretaria acadêmica, obrigada por todo suporte e compreensão em relação as dificuldades encontradas no desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Em especial ao Dr. Rubem e a Dra. Iara. Sem o auxílio fundamental de vocês, essa tese não seria possível.

Aos órgãos de apoio científico Capes, Capes-SUS, CNPq, PAPES- FIOCRUZ, FAPERJ, FIOCRUZ.

Aos meus pais, por todo amor e esforço para que eu pudesse chegar até aqui. Sem vocês não teria conseguido.

À Natália, amiga querida, por estar sempre ao meu lado apesar de todas as dificuldades. A sua preocupação e carinho foram muito importantes.

Às amigas Silvia e Thalita. Obrigada por se fazerem presentes mesmo apesar da distância. O apoio de vocês foi essencial.

Ao Guilherme, pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão. Obrigada por me ajudar a crescer e por estar sempre ao meu lado.

A Deus, por tudo.

*Nós levamos nas mãos, o futuro  
De uma grande e brilhante Nação  
Nosso passo constante e seguro  
Rasga estradas de luz na amplidão.*

*Nós sentimos no peito, o desejo  
De crescer, de lutar, de subir  
Nós trazemos no olhar o lampejo  
De um risonho e fulgente porvir.*

*Vivemos para o estudo  
Soldados da ciência  
O livro é nosso escudo  
E arma a inteligência.*

*Por isso sem temer  
Foi sempre o nosso lema  
Buscarmos no saber  
A perfeição suprema.*

*Estudaram aqui, brasileiros  
De um enorme e subido valor  
Seu exemplo, segui companheiros  
Não deixemos o antigo esplendor.*

*Alentemos ardente a esperança  
De buscar, de alcançar, de manter  
No Brasil a maior confiança  
Que só pode a ciência trazer.*

*Vivemos para o estudo  
Soldados da ciência  
O livro é nosso escudo  
E arma a inteligência.*

*Por isso sem temer  
Foi sempre o nosso lema  
Buscarmos no saber  
A perfeição suprema.*

*Hino dos alunos do Colégio Pedro II  
Música: Francisco Braga; Letra: Hamilton Elia*

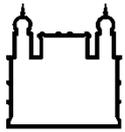
*“Considero essencial à honestidade que se procurem os melhores argumentos contrários à posição que se está sustentando.”*

*Kenneth Arrow, 1992*

## SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
SUMÁRIO DE FIGURAS	xiii
SUMÁRIO DE TABELAS	xv
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Obesidade</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Leptina</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Leptina: sensor nutricional e energético</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Leptina e sistema imune</b>	<b>9</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	<b>12</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Animais</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Jejum pernoite</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Resistência hipotalâmica</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Injeção de leptina</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Eutanásia</b>	<b>16</b>
<b>3.7. Obtenção do lavado peritoneal</b>	<b>16</b>
<b>3.8. Contagem diferencial</b>	<b>17</b>
<b>3.9. Quantificação de TNF-<math>\alpha</math>, leptina e CXCL1/KC</b>	<b>17</b>
<b>3.10. Medição de glicemia</b>	<b>17</b>
<b>3.11. Detecção de corpúsculos lipídicos</b>	<b>17</b>
3.11.1. Coloração por ósmio	17
3.11.2. Coloração por <i>Oil Red O</i>	18
<b>3.12. Obtenção de plasma</b>	<b>18</b>
<b>3.13. Análise estatística</b>	<b>18</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>19</b>
Modelo de resistência hipotalâmica associada à obesidade induzida por dieta rica em sacarose e lipídios (HHD, <i>high-fat, high-sucrose diet</i> )	20

	Leptina modula a participação do tecido adiposo durante jejum prolongado _____	26
	Neutrófilos de animais obesos são responsivos aos efeitos da leptina <i>in vivo</i> _____	36
	O efeito da leptina é reprodutível em fêmeas de C57Bl/6 e machos de BALBc _____	44
5.	<b><i>Discussão</i></b> _____	<b>48</b>
6.	<b><i>Conclusões</i></b> _____	<b>55</b>
7.	<b><i>Referências Bibliográficas</i></b> _____	<b>57</b>
8.	<b><i>Anexos</i></b> _____	<b>64</b>



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## RESUMO

### **Efeitos da leptina sobre leucócitos em modelo murino de obesidade induzida por dieta**

Leptina é uma adipocina que atua como sensor do estado nutricional e energético e, por meio da sinalização hipotalâmica, promove o efeito clássico de inibição da ingesta alimentar. A expansão do tecido adiposo é acompanhada pelo aumento dos níveis plasmáticos de leptina. No entanto, durante a obesidade, o efeito de inibição da ingesta não é intensificado, o que caracteriza a resistência hipotalâmica à leptina. A leptina é importante na regulação do sistema neuroimunoendócrino, uma vez que o estado nutricional interfere na montagem da resposta imune. Tal regulação ocorre através da sinalização no sistema nervoso central, assim como da atuação direta sobre células periféricas, que apresentam receptor de leptina, LepR. Níveis plasmáticos aumentados de leptina na obesidade contribuem para a ativação de macrófagos e linfócitos, mas o papel da leptina na ativação e migração de neutrófilos ainda é controverso, uma vez que neutrófilos não apresentam a isoforma longa do receptor de leptina, LepRb. Previamente, nosso grupo investigou os mecanismos *in vivo* relacionados à migração de neutrófilos induzida por leptina. Foi estabelecido que a leptina induz a migração de neutrófilos, dependente da sinalização por TNFR1 e CXCL1/KC. O objetivo desta tese foi investigar a ação da leptina sobre leucócitos expostos à hiperleptinemia. Para isso, um modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica foi estabelecido em camundongos C57Bl/6 machos. Para investigar como o estado nutricional interfere na resposta de leucócitos à leptina, animais do modelo de obesidade foram desafiados com jejum prolongado, com ou sem participação de leptina exógena. Foi estabelecido que animais alimentados com ração hipercalórica (4727 cal/g), rica em sacarose (17% em calorias e 20% em gramas) e gordura (45% em calorias e 24% em gramas) apresentam resistência hipotalâmica, além do aumento de peso corporal e de níveis sanguíneos de glicose e leptina, comparados com animais alimentados com ração normocalórica (3850 cal/g), com fornecimento normal de sacarose (8% em cal e 8% em g) e gordura (9% em cal e 4% em g). Camundongos foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem injeção de 1 mg/kg de leptina *i.p.*; sendo o jejum mantido por mais 6 h ou 24 h. Foi observado que, 6 h após receberem leptina, o tecido adiposo epididimal dos animais alimentados com ração normocalórica ou hipercalórica foi preservado, em relação aos animais que continuaram em jejum sem receberem leptina. Para a investigação da resposta inflamatória à leptina exógena, animais do modelo de obesidade foram submetidos a jejum pernoite; foi realizada a injeção de 1 mg/kg de leptina *i.p.* e o jejum foi mantido por 1 h, 6 h ou 24 h, quando a resposta inflamatória intraperitoneal foi avaliada. Foi observado que neutrófilos foram recrutados para a cavidade peritoneal em 1 h, 6 h e 24 h, em ambos grupos, alimentados com ração normocalórica ou hipercalórica. A migração em animais obesos envolve a participação de CXCL1/KC e TNF- $\alpha$ . Camundongos C57Bl/6 fêmeas e Balb/c machos também apresentam recrutamento de neutrófilos em resposta à leptina. Em conjunto, estes dados sugerem que a leptina é capaz de intervir na utilização de energia na ausência de ingesta alimentar, de modo que leucócitos se mantêm responsivos à leptina exógena mesmo em um modelo de obesidade com resistência hipotalâmica.

## ABSTRACT

### **Leptin effects on leukocytes on mouse model of diet-induced obesity**

Leptin is an adipokine that acts as a sensor of the nutritional-energetic status and promotes, through the hypothalamic signaling, the classical effect of food-intake inhibition. Increased adipose tissue size is accompanied by increased plasma levels of leptin. However, during obesity, the hypothalamic effect of food-intake inhibition is not intensified, which characterizes the hypothalamic resistance to leptin. Leptin plays an important role in the regulation of the neuroimmunoendocrine system, since nutritional status interferes with the assembly of the immune response. Such regulation occurs both through the central nervous system signaling and in the direct action on peripheral cells, which present leptin receptor, LepR. Increased plasma levels of leptin in obesity contribute to the activation of macrophages and lymphocytes, but the role of leptin in the activation and migration of neutrophils is still controversial, since neutrophils do not have the long isoform of leptin receptor, LepRb. Previously, our group investigated *in vivo* mechanisms related to leptin-induced neutrophil migration. Leptin was established to induce neutrophil migration dependent on TNFR1 and CXCL1/KC signaling. The objective of this work was to investigate the action of leptin on leukocytes exposed to hyperleptinemia. For this, a hypercaloric diet-induced model of obesity was established in male C57Bl/6 mice. To investigate how nutritional status interferes with the leukocyte response to leptin, animals from the obesity model were challenged with prolonged fasting, with or without participation of exogenous leptin. It was established that animals fed with hypercaloric ration (4727 cal/g), rich in sucrose (17% in calories and 20% in grams) and fat (45% in calories and 24% in grams) presented hypothalamic resistance, in addition to increased body weight, and glucosis and leptin rates in blood, when compared to animals fed with normocaloric ration (3850 cal/g), with normal supply of sucrose (8% in calories and 8% in grams) and fat (9% in calories and 4% in grams). The animals were fasted overnight and then received 1mg/kg of leptin i.p., with maintenance of the fast for another 6h or 24h. It was observed that, 6 h after receiving leptin, epididymal adipose tissue from animals fed with normocaloric or hypercaloric ration was preserved in relation to animals that continued fasting without receiving leptin. For the investigation of the inflammatory response to exogenous leptin, animals from the obesity model were fasted overnight and injected with 1 mg/kg of leptin i.p.; fasting was maintained for 1h, 6h and 24h, when the intraperitoneal inflammatory response was evaluated. It was observed that neutrophils were recruited to the peritoneal cavity at 1h, 6h and 24h in both groups fed with normocaloric or hypercaloric ration. Migration in obese animals involves the participation of CXCL1/KC and TNF-alpha. C57Bl/6 female and male Balb/c animals also show recruitment of neutrophils in response to leptin. Together, these data suggest that leptin is able to intervene in energy utilization in the absence of dietary intake, so that leukocytes remain responsive to leptin even in a model of obesity with hypothalamic resistance.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO – 5-lipooxigenase

AMPK (*cAMP-activated protein kinase*) – proteína cinase ativada por AMPc

$\alpha$ -MSH (*melanocyte-stimulating hormone*) –  $\alpha$ -hormônio estimulante de melanócitos

BLT1 (*leukotriene B<sub>4</sub> receptor 1*) – receptor 1 de leucotrieno B<sub>4</sub>

CART (*cocaine and amphetamine regulated transcript*) – transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CCL2 (*C-C chemokine ligand 2*) – ligante 2 de quimiocinas C-C

CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) - receptor tipo 2 de quimiocinas C-C

CECAL – centro de experimentação animal

CEUA – comitê de ética de uso de animais

CL – corpúsculo(s) lipídico(s)

CRH (*Corticotropin-releasing hormone*) – hormônio liberador de corticotropina

CXCL1 (*C-X-C chemokine ligand 1*) – ligante 1 de quimiocina C-X-C

DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) – sulfóxido dimetil

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

EDAC [*1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide*] – 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) - ensaio imunossorvente ligado a enzima

fMLP (*N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine*) – N-formil-metionina-leucina-fenilalanina

HDL (*high-density lipoprotein*) – lipoproteína de alta densidade

HFD (*high-fat diet*) – dieta rica em gordura

HHD (*high-sucrose high-fat diet*) – dieta rica em sacarose e gordura

IFN $\gamma$  – Interferon  $\gamma$

IMC – índice de massa corpórea

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-6 – interleucina-6

i.p. - intraperitoneal

JAK (*Janus kinase*) – cinase Janus

KC (*Keratinocyte-derived cytokine*) – citocina derivada de queratinócito

LPS - lipopolissacarídeo

LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>

MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) – proteína cinase ativada por mitógeno

MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) – proteína 1 quimiotática de monócitos

MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory protein*) – proteína inflamatória de macrófagos-1 $\alpha$

MPO (*myeloperoxidase*) - mieloperoxidase

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) – alvo de rapamicina em mamíferos

mTORC1/2 (*mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1/2*) – complexo 1/2 do alvo de rapamicina em mamíferos

NFD (*normal-fat diet*) – dieta normal em fornecimento de gordura

NND (*normal-sucrose normal-fat diet*) – dieta normal em fornecimento de sacarose e gordura

NPY – neuropeptídeo Y

OVA - ovalbumina

LepR (*leptin receptor*) – receptor de leptina

PBS – tampão fosfato tamponado

PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) - fosfatidil inositol 3 cinase

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)

SNC – sistema nervoso central

STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) – transdutor de sinal e ativador de transcrição

TA – tecido adiposo

Th1/2 – T *helper* 1/2

TNF (*Tumor necrosis factor*) - $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$

Treg – T regulatório

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>Fig 4.1.</b>	<b>Efeito de diferentes dietas no peso e na ingesta.</b>	<b>21</b>
<b>Fig 4.2.</b>	<b>Efeito da dieta rica em sacarose e lipídios.</b>	<b>22</b>
<b>Fig 4.3.</b>	<b>Medidas de peso de tecido adiposo em diferentes depósitos de animais submetidos à dieta HHD.</b>	<b>24</b>
<b>Fig 4.4.</b>	<b>Medidas de glicemia, leptina, triglicerídeos e colesterol no sangue de animais NND e HHD.</b>	<b>25</b>
<b>Fig 4.5.</b>	<b>Avaliação do peso corporal em animais NND e HHD submetidos a jejum.</b>	<b>27</b>
<b>Fig 4.6.</b>	<b>Avaliação da resistência hipotalâmica à leptina na dieta HHD.</b>	<b>28</b>
<b>Fig 4.7.</b>	<b>Avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais NND e HHD, 24h após injeção de leptina ou salina.</b>	<b>29</b>
<b>Fig 4.8.</b>	<b>Avaliação da massa de TA subcutâneo, visceral e retroperitoneal de animais NND e HHD, 24h após injeção de leptina ou salina.</b>	<b>31</b>
<b>Fig 4.9.</b>	<b>Medição da glicemia em animais NND e HHD, 6h e 24h após serem injetados com leptina ou salina.</b>	<b>32</b>
<b>Fig 4.10.</b>	<b>Avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais NND e HHD, 6h após injeção de leptina ou salina.</b>	<b>33</b>
<b>Fig 4.11.</b>	<b>Avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais controle, 6h após injeção de leptina ou salina.</b>	<b>34</b>
<b>Fig 4.12.</b>	<b>Avaliação do peso do baço e do fígado em animais NND e HHD submetidos a jejum e injetados com leptina.</b>	<b>35</b>
<b>Fig 4.13.</b>	<b>Leucócitos totais, mononucleares e eosinófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais NND e HHD injetados com salina ou leptina.</b>	<b>37</b>
<b>Fig 4.14.</b>	<b>Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina em 1h, 6h e 24h para a cavidade peritoneal de animais NND e HHD.</b>	<b>38</b>
<b>Fig 4.15.</b>	<b>Leucócitos circulantes no sangue de animais NND e HHD injetados com leptina ou salina.</b>	<b>39</b>
<b>Fig 4.16.</b>	<b>Formação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais de animais NND e HHD estimulados com leptina.</b>	<b>41</b>
<b>Fig 4.17.</b>	<b>Níveis plasmáticos e intraperitoneais de leptina em animais NND e HHD.</b>	<b>42</b>
<b>Fig 4.18.</b>	<b>Níveis plasmáticos e intraperitoneais de KC e TNF-<math>\alpha</math> em animais NND e HHD</b>	<b>43</b>
<b>Fig 4.19.</b>	<b>Leptina promove, em 6h e 24h, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em C57Bl/6 fêmeas.</b>	<b>45</b>
<b>Fig 4.20.</b>	<b>Leptina promove, em 6h e 24h, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em Balb/c machos.</b>	<b>46</b>

**Fig 4.21. Formação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais de fêmeas injetadas com leptina.** \_\_\_\_\_ **47**

## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>Tabela 1.1. Classificação internacional de faixas de peso</b>	<b>2</b>
<b>Tabela 3.1. Teor nutricional</b>	<b>15</b>
<b>Tabela 3.2. Formulação</b>	<b>15</b>

## 1. Introdução

## 1.1. Obesidade

A obesidade é uma doença definida, pela Organização Mundial da Saúde (The World Health Organization 2014), como o acúmulo excessivo de gordura corporal, de modo a apresentar um risco à saúde. O método mais comumente utilizado para determinar se a gordura corporal é um risco à saúde é por meio do índice de massa corpórea (IMC). Como observado na Fig 1.1, o IMC é o cálculo do peso corporal (em quilogramas) dividido pela altura ao quadrado (em metros), de modo que a proporção de gordura corporal em relação à altura pode classificar se um indivíduo está abaixo do peso, com peso normal, com sobrepeso ou com obesidade.

**Tabela 1.1. Classificação internacional de faixas de peso corporal em indivíduos adultos.**

<b>Classificação</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>
<b>Abaixo do peso</b>	<b>&lt;18.50</b>
Magreza severa	<16.00
Magreza moderada	16.00 - 16.99
Magreza mediana	17.00 - 18.49
<b>Faixa normal</b>	<b>18.50 - 24.99</b>
<b>Acima do peso</b>	<b>≥25.00</b>
Pré-obesidade	25.00 - 29.99
<b>Obesidade</b>	<b>≥30.00</b>
Obesidade classe I	30.00 - 34.99
Obesidade classe II	35.00 - 39.99
Obesidade classe III	≥40.00

Faixas de peso no indivíduo adulto, de acordo com o IMC (Índice de massa corpórea): abaixo do peso, peso normal, acima do peso e obesidade. São exibidos pontos de corte adicionais, que podem ser utilizados para melhor descrição clínica. Adaptado de Komaroff 2016.

A obesidade é um problema de saúde pública no mundo, crescendo desde o início do século XX. Em 2014, 39% dos indivíduos adultos com mais de 18 anos de idade apresentavam sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9), enquanto 13% apresentavam obesidade (IMC acima de 30,0) (THE WORLD HEALTH ORGANISATION, 2014). A tendência no aumento da prevalência de indivíduos obesos também ocorre na população brasileira, em que 52,5% da população adulta apresentava sobrepeso e 17,9% apresentava obesidade em 2014 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE., 2014). A obesidade é um fator de risco para a morbidade e mortalidade por diversas doenças

crônicas, tais como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Por este motivo, a epidemia de obesidade é uma importante preocupação para a saúde pública, no mundo e no Brasil, já que cada vez mais recursos financeiros têm sido utilizados no tratamento da obesidade e suas co-morbidades.

Apesar do IMC determinar se o peso pode ser um risco de saúde, é o diagnóstico de síndrome metabólica que define a probabilidade do desenvolvimento de co-morbidades. A síndrome metabólica é um conjunto de alterações inter-relacionadas que promovem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes. Alberti et al., 2009, estabeleceram como critérios de diagnóstico da síndrome metabólica a presença de 3 dentre os 5 seguintes fatores: elevação da glicemia de jejum, hipertensão arterial, elevados níveis plasmáticos de triglicerídios, reduzidos níveis plasmáticos de colesterol HDL (*high-density lipoprotein*) e adiposidade central (aumento da circunferência da cintura). Assim, um indivíduo com sobrepeso ou obesidade está mais propenso a desenvolver complicações dependendo da gravidade da síndrome metabólica.

O fator mais comum de aumento de peso que pode levar à obesidade é resultado de uma dieta hipercalórica aliada a um estilo de vida sedentário, em que há reduzido consumo energético. O aumento de peso ocorre, principalmente, devido à expansão do tecido adiposo e é acompanhado de desregulação do metabolismo, inclusive hiperglicemia e dislipidemias, o que justifica a relação entre obesidade e síndrome metabólica. Outros fatores relacionados ao estabelecimento da obesidade são a predisposição genética, a interferência na microbiota do trato gastrointestinal e a composição dos carboidratos e lipídios fornecidos na alimentação.

Não há consenso na literatura em relação a apenas um agente causador da obesidade, da síndrome metabólica e da diabetes. Sabe-se que a elevação da glicemia de jejum indica o início do desenvolvimento de resistência à insulina, diagnosticado como pré-diabetes após a confirmação da intolerância à glicose (NATHAN et al., 2007). A diabetes tipo 2 é caracterizada pela resistência à insulina que, na fase aguda, mantém hiperglicemia e hiperinsulinemia durante o período de jejum, devido à incapacidade dos tecidos-alvo da insulina, tais como músculo esquelético e tecido adiposo realizarem a captação de glicose plasmática. Tradicionalmente, a resistência à insulina é considerada resultado da hiperinsulinemia, como mecanismo de prevenção da hiperglicemia. Assim, têm-se considerado a hipótese de diversos fatores contribuírem para a hiperinsulinemia, como a estimulação basal das células beta-pancreáticas por ácidos graxos, bem como aditivos

alimentares incorporados aos produtos industrializados (YE, 2007; CORKEY, 2012). Alterações metabólicas como a disfunção mitocondrial, lipotoxicidade, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, acúmulo hepático de gordura, envelhecimento e inflamação também apresentam envolvimento na resistência à insulina, embora não se possa afirmar que, isoladamente, um desses mecanismos seja o principal (YE, 2013).

As alterações metabólicas observadas na obesidade, na síndrome metabólica e na diabetes sinalizam para a participação de diversos tecidos e órgãos de modo integrado. O tecido adiposo não é apenas local de armazenamento de gordura, mas atua também como órgão endócrino (SIITERI, 1987; KERSHAW; FLIER, 2004). No caso da obesidade, a expansão do tecido adiposo impacta o metabolismo devido à maior secreção plasmática de adipocinas. Adipocinas são proteínas secretadas pelo tecido adiposo e que atuam como citocinas, quimiocinas e hormônios. A primeira adipocina descrita na literatura foi a leptina, imediatamente associada à obesidade (ZHANG et al., 1994). A leptina é um regulador do estado nutricional do organismo, cujo papel é manter o peso corporal por meio da inibição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético, ambos efeitos regulados por sua sinalização no hipotálamo. Em indivíduos obesos, são observados níveis plasmáticos elevados de leptina; no entanto, a hiperleptinemia não intensifica o efeito hipotalâmico de inibição do apetite, o que caracteriza o quadro de resistência central à leptina (FREDERICH et al., 1995; CONSIDINE et al., 1996). A regulação do metabolismo é observada tanto pela ação no hipotálamo quanto pela ação periférica da leptina em diferentes tecidos, inclusive tecidos-alvo da insulina, como fígado e músculo esquelético (LÖLLMANN et al., 1997). Desta forma, observa-se que a leptina é o mecanismo-chave do controle da ingesta alimentar.

Outras adipocinas são importantes na obesidade. A expansão do tecido adiposo vem acompanhada de hipóxia de alguns dos adipócitos. Estes adipócitos liberam um sinal de morte celular, que promove infiltração de leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, tornando o tecido adiposo em um sítio inflamatório. Assim, na obesidade, o tecido adiposo secreta ainda adipocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e MCP-1, resultando em um estado inflamatório sistêmico e subclínico, aliado às alterações metabólicas e demais adipocinas (ELKS; FRANCIS, 2010). A leptina possui atividade reguladora do sistema imune, o que, no quadro de obesidade, pode resultar em alterações das respostas imune inata e adaptativa. Tais alterações podem ainda se relacionar com maior susceptibilidade às doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias crônicas, câncer e agentes infecciosos.

## **1.2. Leptina**

Os primeiros estudos realizados para compreender a obesidade foram realizados a partir de modelos murinos, que continuam sendo extensivamente utilizados até os dias atuais. Nas décadas de 1950 e 1960, foram identificados os primeiros camundongos com mutações genéticas que levavam à obesidade. Tais animais foram chamados ob/ob por apresentarem mutação recessiva autossômica do gene ob (*obese*) e apresentavam obesidade espontânea, hiperfagia e redução do gasto energético (INGALLS; DICKIE; SNELL, 1950). Também foram identificados animais db/db, que possuem mutação recessiva autossômica no gene db (*diabetes*) e que apresentavam as mesmas características de obesidade dos animais ob/ob, além de severa diabetes (HUMMEL; DICKIE; COLEMAN, 1966). Em um estudo clássico, experimentos de parabiose com animais ob/ob e db/db sugeriram que db/db expressam o “fator solúvel”, mas não possuem seu receptor, enquanto animais ob/ob expressam apenas o receptor, mas não o “fator solúvel” (COLEMAN; HUMMEL, 1969; COLEMAN, 1973). Coleman postulou, então, que este “fator solúvel” atuaria como hormônio, fazendo o elo entre tecido adiposo e hipotálamo para regular o apetite. Apenas na década de 1990, foi identificado o produto do gene ob, a leptina, bem como do gene db, o receptor de leptina, na ocasião denominado ObR. (ZHANG et al., 1994). Atualmente, a literatura refere-se a estes animais como *Lep<sup>ob/ob</sup>* e *Lep<sup>db/db</sup>*.

A leptina é um polipeptídeo não-glicosilado de 16 kD, composto por 167 aminoácidos, secretada por adipócitos. A estrutura da leptina é bastante similar entre espécies. Já o receptor de leptina, atualmente chamado LepR, possui 6 isoformas descritas até o momento, resultantes de splicing alternativo (LEE et al., 1996; CHUA et al., 1997). LepRa, LepRc, LepRd e LepRf são isoformas curtas, LepRb é a única isoforma longa e LepRe é uma isoforma secretada. Todas as isoformas apresentam o domínio extracelular com mais de 800 aminoácidos, um domínio transmembrana de 34 aminoácidos e um domínio intracelular variável entre as isoformas. LepRe não possui a sequência da região transmembrana (LÖLLMANN et al., 1997). As isoformas curtas e a longa compartilham a sequência dos primeiros 29 aminoácidos no domínio citoplasmático; as isoformas curtas apresentam de 30 a 40 aminoácidos, enquanto a longa apresenta cerca de 300 resíduos. LepRb contém vários dos motivos necessários para a interação com outras proteínas e a subsequente ativação de vias de sinalização, sendo, portanto, considerado o principal receptor funcional (TARTAGLIA, 1997). LepRb é altamente conservado entre espécies. Apesar de não realizarem transdução de sinal como LepRb, os receptores de forma curta estão envolvidos na promoção de alguns efeitos da leptina, por mecanismos de transdução de sinal não completamente esclarecidos. Os receptores LepRa e LepRb são altamente conservados entre espécies de mamíferos, enquanto

o receptor LepRf só foi descrito até o momento em ratos (WANG et al., 1996; PORZIONATO et al., 2011).

LepRb apresenta similaridade estrutural com a família de receptores de citocinas de classe I e sinaliza à semelhança da família de receptores de IL-6, pela associação a proteínas tirosinas-quinases JAK e STAT. A porção citoplasmática do receptor ObRb possui domínios de acoplamento de JAK (BOX1 e BOX2) e domínios necessários para a sinalização de STAT3, como BOX2 e sequência consenso YXXQ (ou motivo STAT).

Assim, a ligação de leptina a LepRb promove uma mudança conformacional na porção citoplasmática do receptor, que permite o acoplamento de JAKs. A ativação de JAK2 ocorre por transfosforilação e subsequente fosforilação de resíduos de tirosina na porção citoplasmática do receptor. Os resíduos fosforilados permitem então a associação de diferentes substratos, o que determina a capacidade da leptina ativar múltiplas vias de transdução de sinal. Assim, LepRb promove ativação de vias como JAK2/STAT3, PI3K/Akt/mTOR e SHP2/MAPK, dentre outras. No hipotálamo, após a associação de STAT3 ao receptor, este dissocia-se formando dímeros ativos, que são translocados para o núcleo, onde promovem regulação da expressão gênica (BAHRENBERG et al., 2002).

Em paralelo à via JAK2/STAT3, a leptina ativa PI3K/mTOR em diferentes tipos celulares. mTOR atua como um sensor do estado nutricional/energético intracelular e sistêmico, sinalizando ambiente rico em nutrientes capaz de suprir as demandas de síntese proteica, metabolismo e crescimento celular. A leptina sinaliza via mTOR não apenas no hipotálamo, mas em outros tecidos, inclusive leucócitos (MEZEY; RENNIE-TANKERSLEY; POTTER, 2005; COTA et al., 2006; MAYA-MONTEIRO et al., 2008; GALGANI et al., 2010). A atuação de mTOR se contrapõe à de AMPK, que é ativada quando há aumento de AMPc intracelular, indicando redução nutricional/energético. Assim, a via de AMPK também participa da sinalização da leptina, podendo ser inibida em paralelo à ativação de mTOR, como ocorre no hipotálamo, ou ativada, como ocorre em tecido muscular esquelético (BJØRBAEK; KAHN, 2004).

As isoformas curtas do receptor de leptina, especialmente LepRa, apresentam o domínio BOX1, permitindo a associação de JAK2 sem, no entanto, ativar STAT3, uma vez que não há presença dos demais domínios necessários.

Foram descritas até o momento a participação dos receptores de forma curta em atividades de transporte de leptina por transcitose em células endoteliais da membrana

hemato-encefálica (TU et al., 2010) e endocitose de leptina (TU et al., 2007), contribuindo para a captura de leptina circulante (UOTANI et al., 1999), o que indica que estes receptores se relacionam com o citoesqueleto. Já LepRe, sendo uma isoforma solúvel, atua imobilizando a leptina circulante, o que regula a disponibilidade de leptina e sua permeabilidade pela barreira hemato-encefálica (LÖLLMANN et al., 1997; GE et al., 2002; TU et al., 2008). Estes trabalhos mostram efeitos celulares da leptina por meio de isoformas curtas, apesar de não terem sido demonstradas a ativação e sinalização por estes receptores.

A leptina apresenta efeitos que podem ser dependentes ou não da sinalização no sistema nervoso central, uma vez que há expressão de receptores de leptina em células neuronais e não-neuronais, na periferia. Embora os principais efeitos da leptina resultem da sinalização por meio de LepRb, a variedade de isoformas do receptor de leptina, bem como a distribuição por diferentes tecidos demonstram seu efeito pleiotrópico (BJØRBAEK; KAHN, 2004). Embora a forma proteica de LepR não seja de fácil detecção, mRNA para as isoformas curtas é encontrado de forma ubíqua e em maior quantidade (90 a 95% do mRNA de LepR) do que mRNA para LepRb, o que indica que a disponibilidade superficial de LepRb deve ser bem regulada e sua sinalização eficaz (GHILARDI; SKODA, 1997; LÖLLMANN et al., 1997).

### **1.3. Leptina: sensor nutricional e energético**

Inicialmente, foram descritos os efeitos da leptina que dependiam da sinalização pelo sistema nervoso central. De fato, há grande concentração de receptores de leptina no hipotálamo e no plexo coroide de roedores e humanos (TARTAGLIA et al., 1995; SCHWARTZ et al., 1996; COUCE et al., 1997). A sinalização de LepRb no hipotálamo é responsável pela função biológica primordial da leptina, a inibição da ingesta alimentar. Após ser produzida pelo tecido adiposo, a leptina é liberada na circulação, alcançando diferentes tecidos. Para promover inibição do apetite, a leptina é transportada pela barreira hemato-encefálica, alcançando o sistema nervoso central. A leptina sinaliza em neurônios hipotalâmicos: sua ligação ao receptor LepRb ativa neurônios anorexigênicos, que aumentam a expressão dos chamados peptídeos anorexigênicos, como  $\alpha$ -MSH, CRH, CART, que levam à sensação de saciedade; sua ligação a LepRb em neurônios orexigênicos inibe-os, diminuindo a expressão gênica de peptídeos orexigênicos que aumentam a fome, como o neuropeptídeo Y (NPY). Em conjunto, esta mudança no balanço de peptídeos resulta na inibição do apetite (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

A sinalização hipotalâmica pela leptina regula o peso corporal, não só pela inibição da ingestão alimentar, mas também por promover o equilíbrio energético. A leptina alcança o hipotálamo como sinal do estado de armazenamento de energia corporal e, por meio da inervação simpática, é capaz de reduzir os estoques de lipídios no tecido adiposo, de triglicerídios no músculo esquelético e de glicogênio no fígado. Ou seja, por meio da sinalização central, a leptina estimula o gasto energético através do aumento do metabolismo basal (CAMPFIELD et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995; DOBBINS et al., 2003). A leptina promove homeostase energética tanto por efeitos centrais quanto pela sinalização direta em tecidos-alvo periféricos. Nas últimas décadas, diversos estudos buscam caracterizar os efeitos da leptina no metabolismo de lipídios e da glicose, por meio da atuação sobre o fígado, músculo esquelético, células b-pancreáticas, dentre outros tecidos e órgãos. No tecido adiposo de roedores, por exemplo, a leptina promove lipólise, efeito que se contrapõe à insulina (FRÜHBECK; AGUADO; MARTÍNEZ, 1997; MÜLLER et al., 1997). No músculo esquelético, a leptina aumenta a sensibilidade à insulina, pois incrementa a captação e oxidação de glicose, a síntese de glicogênio e formação de lactato; por outro lado, impede o acúmulo de triacilglicerol, ao contrário da insulina (CEDDIA et al., 1999; CEDDIA; WILLIAM; CURI, 1999; MUOIO et al., 1999; YAU et al., 2014). Tais tecidos são sensíveis à insulina e indicam que a leptina e a insulina apresentam sinalização cruzada, sendo este um dos mecanismos pelos quais a leptina regula o metabolismo. Outra evidência desta interação é que a exposição crônica de células b-pancreáticas à leptina inibe a secreção de insulina, que é a resposta fisiológica à estimulação com glicose (LUPI et al., 1999; BJØRBAEK; KAHN, 2004; MARROQUI et al., 2012).

Outro mecanismo de atuação sobre o metabolismo é a regulação do nível plasmático de leptina. Como mencionado anteriormente, a leptina é secretada em quantidade proporcional à massa de tecido adiposo. Em humanos, a leptina circula livre ou ligada, principalmente, a LepRe, que está relacionada com sua atividade biológica e biodisponibilidade. Em indivíduos hígidos, a maior parte da leptina é encontrada ligada a proteínas, enquanto em indivíduos obesos há maior quantidade de leptina total e, ainda, relativamente mais leptina livre. A meia-vida da leptina depende também do *clearance* renal, onde é degradada. A literatura demonstra que roedores e humanos apresentam redução plasmática dos níveis de leptina quando submetidos a jejum prolongado, de modo que não há grande oscilação nos níveis de leptina no jejum entre refeições (CUMIN; BAUM; LEVENS, 1996; HOUSEKNECHT et al., 1996; SINHA et al., 1996; CUMIN et al., 1997; FRÜHBECK, 2006). Os níveis de leptina são pouco variáveis ao longo do dia, mas ainda são mais estáveis

quando comparados com os níveis de grelina, por exemplo, um hormônio que apresenta picos e reduções de acordo com o estado de fome ou saciedade (KORBONITS et al., 1997; TRIANTAFYLLOU; PASCHOU; MANTZOROS, 2016).

O efeito da leptina não está limitado à regulação do apetite e do metabolismo energético. A expressão pleiotrópica de seus receptores torna possível o envolvimento da leptina em uma variedade de processos biológicos, como a função hormonal reprodutora, a regulação da massa óssea, angiogênese e, sobretudo, a participação no sistema imune, uma vez que LepR é expresso de forma ubíqua em células do sistema imune presentes tanto na circulação, quanto na medula óssea.

#### **1.4. Leptina e sistema imune**

A alteração no estado nutricional altera a resposta imune. O estado de desnutrição leva à hipoleptinemia, enquanto a obesidade resulta em hiperleptinemia. Estados nutricionais opostos, como estes, contribuem para efeitos opostos sobre as células do sistema imune, devido, em parte, ao envolvimento da leptina. Pode-se dizer então que a participação da leptina é notável especialmente nas situações de desnutrição e hipernutrição, de modo que a nutrição normal reflete em homeostase energética e homeostase do sistema imune.

Mudanças no microambiente influenciam diretamente o status energético intracelular. Nesse contexto, a leptina poderia agir como um fator que detectaria alterações no status energético, relacionando o ambiente (disponibilidade de nutrientes), metabolismo e resposta imune. Em geral, é bem aceita a ideia de que a leptina atua como citocina pró-inflamatória, ativando e estimulando algumas células. Da mesma maneira, é bem evidente que a ausência de leptina não permite a resposta imune adequada.

Sabe-se que a leptina apresenta importante papel na regulação do sistema neuroimunoendócrino, tanto pela sinalização do sistema nervoso central, quanto na atuação direta sobre células periféricas que apresentam LepR. Avaliar a responsividade de leucócitos à leptina contribui para o esclarecimento do papel regulador da leptina sobre a resposta inflamatória.

Os níveis plasmáticos aumentados de leptina na obesidade contribuem para a ativação de macrófagos e linfócitos, mas o papel da leptina na ativação e migração de neutrófilos ainda é controversa, uma vez que neutrófilos não apresentam a isoforma longa do receptor de leptina, LepRb. Previamente, nosso grupo investigou os mecanismos *in vivo*

relacionados à migração de neutrófilos induzida por leptina. Foi estabelecido que a leptina induz migração de neutrófilos de forma indireta, dependente da ativação de macrófagos e da participação de TNFR1 e CXCL1/KC (2012, Souza-Almeida, G., Dissertação de Mestrado). Nesta tese, foi investigado como o estado nutricional interfere na resposta de leucócitos à leptina. Para isso, foi estabelecido um modelo experimental de obesidade murina, no qual foi avaliada a participação de leptina exógena nos efeitos do jejum prolongado e na resposta inflamatória intraperitoneal.

## 2. Objetivos

## **2.1. Objetivo geral**

Investigar o efeito da leptina sobre a resposta inflamatória em modelo murino de obesidade.

## **2.2. Objetivos específicos**

- a) Estabelecer modelo experimental de obesidade murina com resistência hipotalâmica à leptina, induzida por dieta hipercalórica.
- b) Avaliar os efeitos da leptina exógena sobre o tecido adiposo, no jejum prolongado em modelo de obesidade.
- c) Avaliar os efeitos da leptina exógena na resposta inflamatória intraperitoneal em modelo de obesidade.
- d) Verificar reprodutibilidade dos efeitos da leptina na resposta inflamatória em camundongos C57bl/6 fêmeas e Balb/c machos.

### **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, submetidos a diferentes protocolos experimentais entre 4 e 35 semanas de idade, com peso entre 15 e 45 g. Os animais foram mantidos em temperatura de 25 e 28°C, ciclo de luz de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Diferentes protocolos experimentais foram utilizados em relação ao acesso e composição da ração. Os camundongos tiveram livre acesso à ração e água, conforme a rotina de cada biotério de criação e experimentação. Nos casos em que o consumo de ração não foi considerado na determinação dos grupos experimentais, os animais foram alimentados com ração Nuvilab CR1-Nuvital® (Curitiba, PR, Brasil) previamente autoclavada.

Camundongos das estirpes C57Bl/6, (machos e fêmeas), Balb/c (machos), bem como camundongos geneticamente modificados *knockout* TNFR1<sup>-/-</sup> em *background* C57Bl/6 (machos) foram fornecidos pelo Centro de Experimentação Animal (CECAL) da FIOCRUZ. Diferentes protocolos experimentais, inclusive com interferência na composição da ração (descritos adiante), foram realizados nos biotérios do Pavilhão Osório de Almeida e do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (IOC-FIOCRUZ). Os animais foram vermifugados com Ivomec (uso tópico) e Ptzi Plus (20 mL/animal via oral), sendo os experimentos iniciados uma semana após a vermifugação. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Oswaldo Cruz e da Fundação Oswaldo Cruz (Licenças LW 36/10, L-011/2015 e LA-002/2016).

### **3.2. Modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica**

Camundongos C57Bl/6 machos foram alimentados com ração de composição formulada descrita na tabela 3.1, bem como teor calórico na tabela 3.2, fornecida pela empresa Prag Soluções Ltda (Jaú, SP, Brasil). Os animais foram submetidos à dieta com o peso inicial aproximado de 15-25g (cerca de 5 a 8 semanas), sendo mantidos em dieta por cerca de 14 a 18 semanas. Foram realizados três protocolos com ração hipercalórica indutora de obesidade.

Inicialmente, foi realizado um modelo de dieta hiperlipídica (HFD, *high-fat diet*), que contém 5330 cal/g, sendo 58% proveniente de gordura. A dieta normolipídica (NFD, *normal-fat diet*) utilizada como controle contém 4000 cal/g, sendo 16% proveniente de gordura.

O segundo modelo adotado foi por indução de obesidade com dieta rica em sacarose e lipídios (HHD, *high-fat, high-sucrose diet*), que contém 4728 cal/g, sendo 45% de gordura e 17% de sacarose. Utilizada como controle, a dieta com fornecimento normal de sacarose e lipídios (NND, *normal-fat, normal-sucrose diet*) contém 3850 cal/g, sendo 9% de gordura e 8% de sacarose.

Foi realizado também um protocolo de transição de dietas, em que os animais foram submetidos à alimentação com ração HFD ou NND até o dia 62 da dieta; a partir do dia 63 até o fim do experimento, os animais do grupo HFD passaram a receber ração HHD, enquanto os animais do grupo NFD passaram a receber ração NND.

**Tabela 3.1. Teor nutricional das rações NFD, NND, HFD e HHD**

Teor nutricional (%)	NFD		NND		HFD		HHF	
	g	kcal	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Carboidratos totais	63	63	72	75	41	31	40	34
<i>Dos quais, sacarose</i>	10	10	8	8	12	9	20	17
Gordura	7	16	4	9	35	58	24	45
Proteína	20	20	14	15	35	11	24	20
Outros componentes	10	1	10	1	10	1	12	1
Total	100	100	100	100	121	101	100	100

**Tabela 3.2. Formulação das rações NFD, NND, HFD e HHD**

Fórmula	NFD		NND		HFD		HHF		
	g	cal	g	kcal	g	kcal	g	kcal	
Carboidrato	Amido de milho	397,5	1590	510,7	2043	132,5	530	84,9	339,6
	Amido dextrinizado	132	528	130	520	155	620	116,5	466
	Sacarose/sucrose	100	400	80	320	120	480	201,4	805,6
Gordura	Óleo de soja	70	630	40	360	0	0	29,1	261,9
	Ácido graxo de soja	0	0	0	0	40	280	0	0
	Banha	0	0	0	0	312	2808	206,8	1861
Proteína	Caseína	200	800	140	560	140	560	233,1	932,4
	L-cistina	3	12	1,8	7,2	3	12	3,5	14
Outros componentes	Celulose	50	0	50	0	50	0	58,3	0
	Bitartarato de colina	2,5	0	2,5	0	2,5	0	2,3	0
	BHT	0,014	0	0,014	0	0,028	0	0	0
	Mix mineral	35	0	35	0	35	0	11,7	0
	Mix vitamínico	10	40	10	40	10	40	11,7	46,8
	Fosfato de cálcio dibásico	0	0	0	0	0	0	15,1	0
	Carbonato de cálcio	0	0	0	0	0	0	6,4	0
Citrato de potássio	0	0	0	0	0	0	19,2	0	
Total	1000	4000	1000	3850	1000	5330	1000	4728	

### **3.3. Jejum pernoite**

Para o jejum pernoite, a ração foi removida logo ao final do ciclo claro, aproximadamente às 17:00 h, sendo a água mantida em livre acesso. Quando indicado, foi realizada a reposição de ração no ciclo claro seguinte, antes de 9:00 h.

### **3.4. Resistência hipotalâmica**

Para o experimento de resistência hipotalâmica, foi realizada a avaliação individual da ingestão de ração. Para isso, foi colocado 1 animal por caixa, acompanhado de um chumaço de algodão hidrofóbico para promover conforto térmico na ausência de outros animais. Os animais foram submetidos a jejum pernoite, com reposição da ração logo após a injeção de leptina ou salina. Ao fim do experimento, os animais foram reagrupados em suas caixas originais, com prosseguimento do protocolo de dieta.

### **3.5. Injeção de leptina**

Após jejum *overnight* (16 h) para redução dos níveis basais circulantes de leptina, foi feita injeção intraperitoneal (i.p.) com 100-200  $\mu$ L de 0,5, 1, 1,5 ou 2 mg/Kg de leptina, sendo salina estéril apirogênica i.p. em igual volume como veículo. Todos os ensaios foram realizados com leptina murina recombinante (Peprotech Inc.), diluída em água para injetáveis (apirogênica, estéril e hipotônica), para armazenamento de alíquotas em freezer - 80°C. Para o uso, as alíquotas foram diluídas no dia do experimento em salina 0,9% apirogênica estéril para ajuste do volume e dose. Após a injeção, os animais foram mantidos em jejum por 1, 6 ou 24 h e livre acesso à água. Após este período, foram realizadas a medição de glicemia e a eutanásia, para posterior recolhimento de amostras.

### **3.6. Eutanásia**

Os camundongos foram submetidos à eutanásia por hipóxia em câmara de CO<sub>2</sub>.

### **3.7. Obtenção do lavado peritoneal**

Foi feito lavado peritoneal com 3 mL de solução salina apirogênica estéril 0,9% a 15 °C. Após contagem total das células recolhidas em câmara de Neubauer, 10<sup>5</sup> células foram centrifugadas a 28,23 g por 5 min (aparelho Cytospin 3, fabricante Shandon) para adesão a lâminas de vidro e submetidas à coloração May-Grunwald-Giemsa, tetróxido de

ósmio ou Oil Red O. O sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior quantificação de TNF- $\alpha$ , leptina e CXCL1/KC.

### **3.8. Contagem diferencial**

Lâminas preparadas com células peritoneais ou esfregaço sanguíneo foram coradas com May-Grunwald-Giemsa. A contagem diferencial de mononucleares, neutrófilos e eosinófilos, no total de 100 células por animal foi realizada por microscopia óptica, no aumento de 100x.

### **3.9. Quantificação de TNF- $\alpha$ , leptina e CXCL1/KC**

Amostras de plasma e de sobrenadante de lavado peritoneal foram utilizadas para medição de leptina, TNF- $\alpha$  e CXCL1/KC. As dosagens foram realizadas utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D systems). A leitura da placa foi feita a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa *Soft Max Pro*, com as dosagens baseadas nas respectivas curvas-padrão.

### **3.10. Medição de glicemia**

Para averiguação dos efeitos da dieta e da administração de leptina sobre o índice glicêmico, foi realizada a aferição de glicemia nos animais em jejum pernoite (como descrito previamente) através da aplicação do sangue coletado da cauda do animal em fita reativa e leitura no aparelho *One Call Plus* (Medlevensohn), logo antes da eutanásia. Os dados obtidos estão expressos em mg/dL.

### **3.11. Deteção de corpúsculos lipídicos**

#### **3.11.1. Coloração por ósmio**

Corpúsculos lipídicos ficam evidentes em microscopia óptica de imersão quando corados com tetróxido de ósmio, devido à marcação de fosfolipídios que compõem sua hemi-membrana. Após a centrifugação, as células foram fixadas em formaldeído a 3,7% em PBS (pH 7,4) por 30 min. Posteriormente, as lâminas foram coradas com tetróxido de ósmio a 1,5% em ácido cacodílico (pH 7,4) por 30 min. Foi feita lavagem em água destilada e incubação com tiocarbohidrazida a 1% em água, por 5 min, para redução de tetróxido de ósmio a ósmio molecular. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e

novamente incubadas com tetróxido de ósmio 1,5%, por 3 min. Por fim, as lâminas foram lavadas em água destilada. Após secas, as lâminas foram analisadas em microscopia de campo claro, com objetiva de 100x. Foi feita a contagem de corpúsculos lipídicos por célula, em 50 células por animal. Os dados foram expressos pela média do grupo experimental.

### **3.11.2. Coloração por Oil Red O**

A sonda lipídica *Oil Red O* apresenta afinidade por lipídios neutros e, assim, permite a visualização de corpúsculos lipídicos em microscopia óptica ou de fluorescência. Após a centrifugação, as células foram fixadas em formaldeído a 3,7% em PBS (pH 7,4) por 30 min. Posteriormente, as lâminas foram submersas em solução *Oil Red O* a 60 % (v/v) durante 5 minutos, lavadas com água corrente e com isopropanol 30 % (v/v), sendo imersão em PBS por 5 minutos. Após este período as lâminas foram lavadas em água corrente e imersas em hematoxilina de Myers (Merck Millipore) durante 1 minuto para marcação de núcleos, seguida de lavagem em água corrente e secagem a temperatura ambiente.

A observação de corpúsculos lipídicos foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Olympus BX60), utilizando objetiva de imersão (100x). Foram realizadas fotomicrografias em campo claro. Alternativamente, os núcleos foram marcados com a sonda fluorescente DAPI e as lâminas foram analisadas em microscopia de fluorescência.

### **3.12. Obtenção de plasma**

Amostras de sangue foram obtidas por meio de punção cardíaca, realizada imediatamente após a eutanásia dos animais, em seringa de 1 mL, contendo 100 µL de anticoagulante citrato, equivalente a 10% do volume total. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 10 min, recolhendo-se então o plasma obtido. As amostras de plasma foram armazenadas em freezer -20°C para posterior quantificação de leptina.

### **3.13. Análise estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente no programa *GraphPad Prism*, através de análise de variância (*One Way Anova*, com pós-teste *Newman Keuls*) ou teste *t student*, com significância de, pelo menos,  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

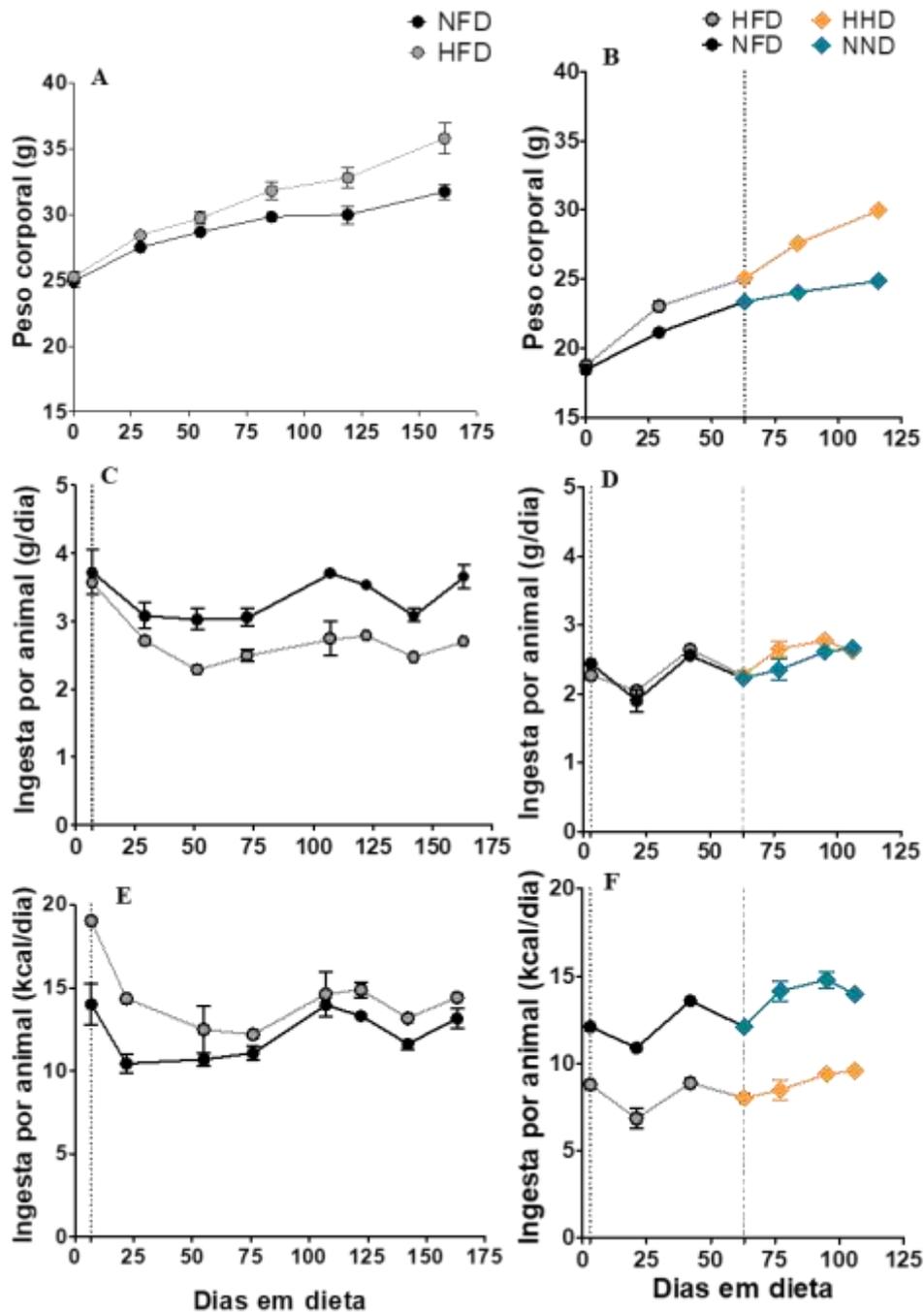
## **Modelo de resistência hipotalâmica associada à obesidade induzida por dieta rica em sacarose e lipídios (HHD, *high-fat, high-sucrose diet*)**

Existem diversos modelos para estudo da obesidade utilizando camundongos. Em comum, tais modelos relacionam a obesidade à maior quantidade de leptina circulante, de modo proporcional ao tamanho do tecido adiposo. Os modelos de camundongos com alterações genéticas são bastante úteis; no entanto, diferem significativamente da obesidade em humanos. Decidimos, então, estabelecer nossa investigação sobre os efeitos da leptina a partir de um modelo de obesidade resultante de ingesta hipercalórica.

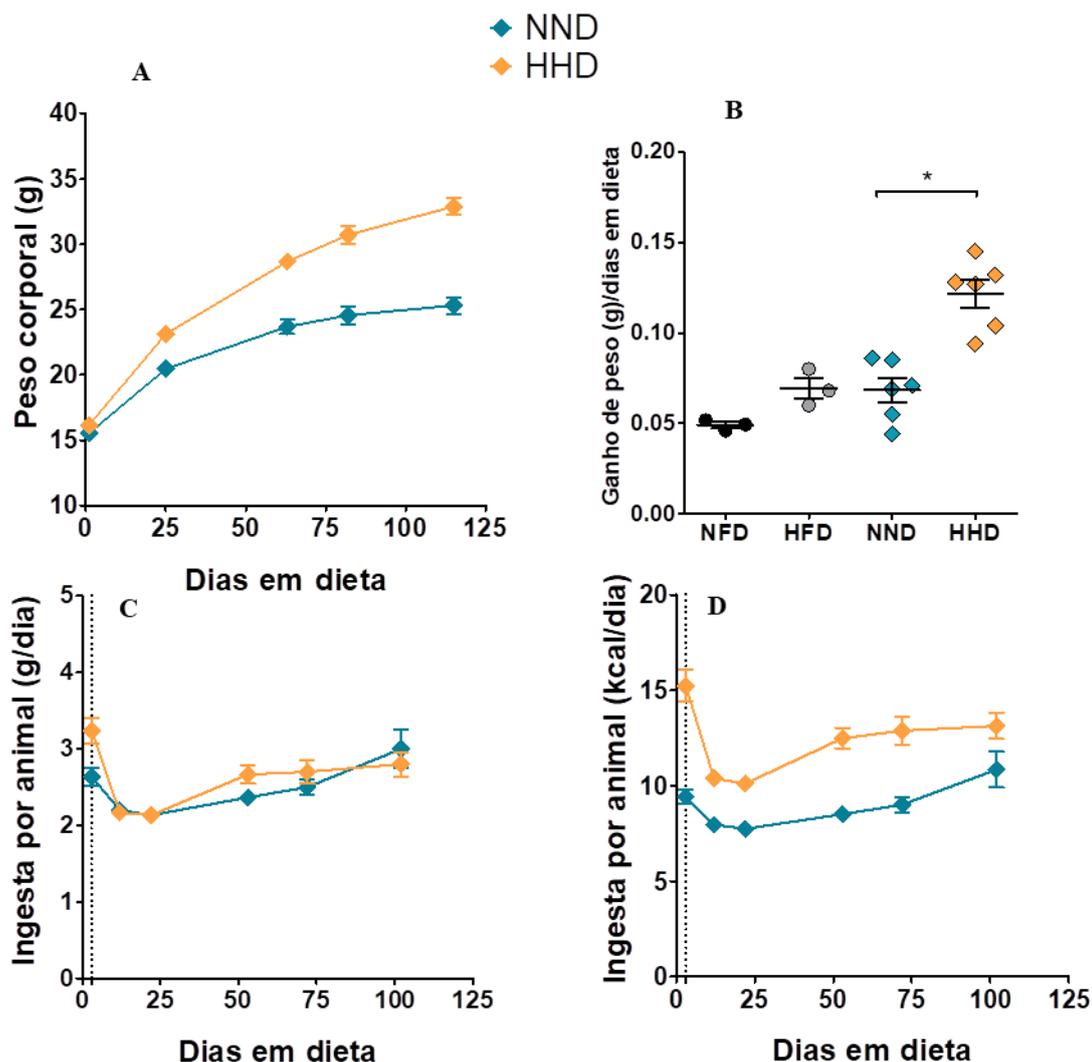
Inicialmente, avaliamos o efeito de diferentes composições de ração padrão e ração hipercalórica. Durante 14 a 18 semanas, foi feito o acompanhamento do peso corporal de camundongos C57Bl/6 machos submetidos ao modelo de indução de obesidade. Os animais foram alimentados com ração hiperlipídica (HFD, *high-fat diet*), ração normolipídica (NFD, *normal-fat diet*), ração rica em lipídios e sacarose (HHD, *high-fat, high-sucrose diet*) e ração normal em lipídios e sacarose (NND, *normal-fat, normal-sucrose diet*). Formulação, teor nutricional e teor calórico de cada ração estão descritos na sessão “Materiais e Métodos”.

Na figura 4.1, pode ser observado o peso dos animais, a ingesta (em gramas) e a ingesta calórica durante os dias de dieta. No gráfico 4.1A, é possível comparar o efeito da ração HFD *versus* NFD. Observamos que a dieta HFD não permite boa distinção em relação a NFD. Em 4.1B, foi realizado um experimento de transição, em que a ração HFD foi substituída por HHD no dia 63 de dieta, e a ração NFD foi substituída por NND. Como observado, tal procedimento resultou em aumento de peso mais acentuado até o último dia da dieta. A comparação entre as figuras 4.1A e 4.1B sugere que o aumento de peso induzido por HHD é mais eficaz que HFD, em relação aos controles NND e NFD, respectivamente. Nas figuras 4.1C e 4.1E, são observadas, respectivamente, a ingesta em gramas e a ingesta calórica dos grupos NFD e HFD. Nas figuras 4.1D e 4.1F, são observadas, respectivamente, a ingesta em gramas e calórica do protocolo de transição. Podemos observar que a ingesta em gramas é ligeiramente semelhante entre os grupos com ração hipercalórica e controle, tanto em 4.1C e 4.1D. No entanto, há um incremento na média diária da ingesta calórica após a substituição da ração HFD pela HHD, como podemos ver em 4.1F.

Na Figura 4.2, observa-se que a dieta estabelecida com ração HHD, sendo a ração NND usada como controle, promove um modelo de obesidade reprodutível no nosso laboratório. A figura 4.2A mostra a curva de peso durante a dieta. Observa-se que há distinção entre os grupos aos 50 dias de dieta, aproximadamente, e que foi possível encerrar a



**Fig 4.1. Efeito de diferentes dietas no peso e na ingesta.** Camundongos C57Bl/6 machos foram submetidos a diferentes dietas por 14 a 18 semanas. Foi realizado o monitoramento ao longo dos dias em dieta. Foram comparados os grupos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) *versus* dieta normolipídica (NFD) em relação ao peso corporal (A), ingesta diária média (C) e ingesta calórica diária média (E). Em B, foi estabelecido um protocolo de substituição de dietas; a partir do dia 63 (linha tracejada), a dieta HFD é substituída pela dieta rica em lipídios e sacarose (HHD) e a dieta NFD pela dieta normal em lipídios e sacarose (NND). Em D e F, observa-se, respectivamente, o acompanhamento da ingesta diária média e a ingesta calórica diária média conforme protocolo estabelecido em B. A linha pontilhada em C-F representa o primeiro dia de avaliação da ingesta. Em A, C e E, dados de um experimento representativo de 4 experimentos, com  $n = 16$  a 20 animais por grupo, apresentado como média e desvio-padrão. Em B, D e F, dados de um experimento com  $n = 20$  animais por grupo.



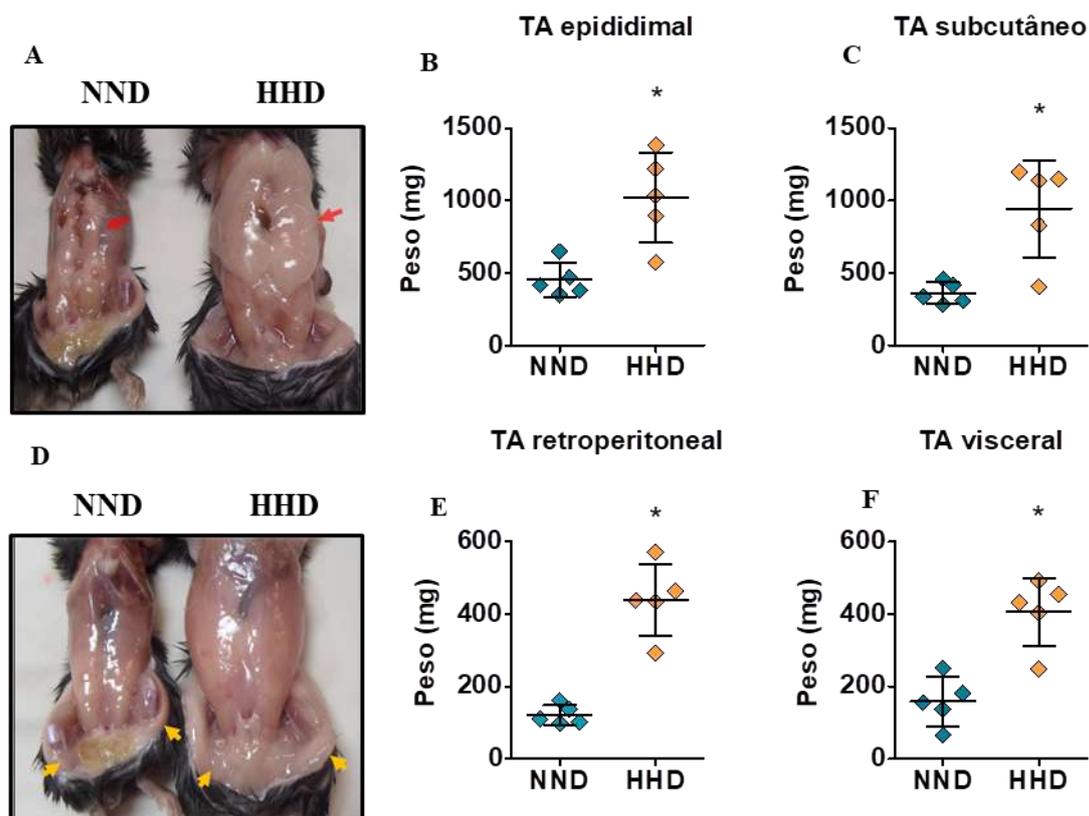
**Fig 4.2. Efeito da dieta rica em sacarose e lipídios.**

Camundongos C57Bl/6 machos foram submetidos a dieta rica em lipídios e sacarose (HHD) *versus* dieta normal em lipídios e sacarose (NND) por 14 a 16 semanas. Foi realizado o monitoramento ao longo dos dias em dieta. Em A, pode ser observado o peso ao longo da dieta. Em B, o ganho de peso ao longo da dieta foi obtido pelo peso final subtraído do peso inicial, normalizado pelo número de dias em dieta. Em C e D, observa-se a ingesta média diária e a ingesta calórica diária, respectivamente. Em A, dados de um experimento, representativo de 6 experimentos, com  $n = 13$  a 20 animais por grupo, apresentado como média e desvio-padrão. Em B, dados apresentados com média e erro padrão da média de 3 a 6 experimentos, com  $n = 13$  a 20 animais por grupo. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ , teste *t* student) entre os grupos indicados. Em C e D, dados de um experimento representativo de 6 experimentos, com  $n = 4$  caixas por grupo (3 a 5 animais por caixa).

dieta, em geral, entre 100 e 125 dias. Para determinar se o modelo HHD *versus* NND é mais reprodutível que as tentativas anteriores com ração HFD *versus* NFD, foi calculado o ganho de peso de cada animal, isto é, a diferença entre o peso inicial e final em dieta; a seguir, esta diferença de peso foi normalizada pelo número de dias em dieta. Assim, em 4.2B observamos a razão entre o ganho de peso e o número de dias em dieta. Podemos observar que os experimentos realizados com o modelo HHD *vs* NND apresentam diferença significativa, enquanto não há diferença significativa em relação ao modelo HFD *vs* NFD. Nas figuras 4.2C, pode ser observado que a ingesta diária da ração NND é maior que a ingesta diária da ração HHD; no entanto, a ingesta calórica diária é maior no grupo HHD durante todo o período da dieta.

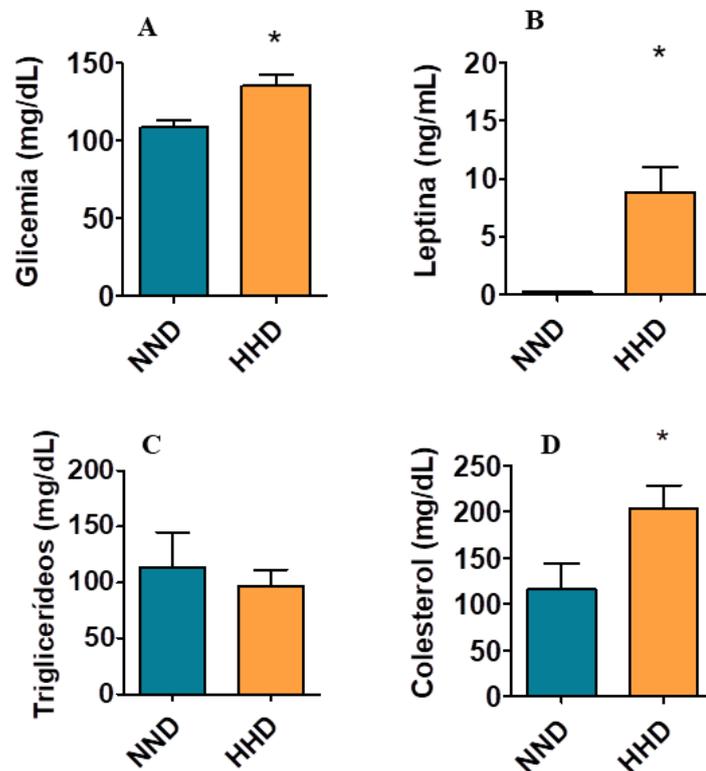
Além do aumento de peso, a dieta HHD induz outras características de obesidade, como observado na figura 4.3. Em 4.3A e 4.3D, encontram-se imagens representativas dos grupos NND e HHD ao fim do protocolo de dieta, nas quais estão indicadas a presença, respectivamente, de tecido adiposo epididimal e tecido adiposo subcutâneo mais desenvolvidos em animais HHD. Uma vez que existem cada vez mais estudos relacionados a diferentes papéis dos depósitos de tecido adiposo, avaliamos quatro depósitos de tecido adiposo: subcutâneo inguinal (dos membros posteriores), epididimal (tecido associado ao epidídimo), retroperitoneal (depósito encontrado na parte dorsal da cavidade peritoneal, entre o rim e a parede peritoneal) e visceral (tecido associado ao mesentério). Em 4.3B, C, E e F, é demonstrado o peso *ex-vivo* dos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo, retroperitoneal e visceral, respectivamente, recolhidos ao fim do protocolo da dieta. Podemos sugerir que o aumento de peso corporal nos animais HHD está relacionado, em parte, ao aumento da massa de tecido adiposo nestes depósitos.

A medição da glicemia de 6h de jejum também se apresenta aumentada em animais do grupo HHD (figura 4.4A). A leptina plasmática apresenta-se aumentada em animais do grupo HHD (figura 4.4B). Não há alteração nos níveis sanguíneos de triglicérides entre os grupos HHD e NND, enquanto há aumento nos níveis de colesterol nos animais HHD. Assim, a expansão da massa de tecido adiposo em diferentes sítios, bem como o aumento de glicose, leptina e colesterol no sangue sugerem que o protocolo estabelecido funciona como indutor de obesidade.



**Fig 4.3. Medidas de peso de tecido adiposo em diferentes depósitos de animais submetidos à dieta HHD.**

Camundongos C57Bl/6 machos foram submetidos ao modelo de indução de obesidade com ração HHD (vide metodologia) e diferentes depósitos de tecido adiposo foram recolhidos ao fim do protocolo de dieta. Em A e D, imagem representativa dos grupos HHD e NND. As setas indicam o tecidos adiposo (TA) epididimal (em A) e TA subcutâneo (em D). Em B, C, E e F, encontra-se o peso dos depósitos bilaterais do TA epididimal, TA subcutâneo e TA retroperitoneal, além do TA visceral, respectivamente. Em B, C, E e F, dados de um experimento com  $n = 5$  por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ , teste  $t$  student) entre os grupos HHD e NND.



**Fig 4.4. Medidas de glicemia, leptina, triglicerídeos e colesterol no sangue de animais NND e HHD.**

Animais HHD e NND, ao fim da dieta, tiveram amostras de sangue recolhidas para diferentes análises. Em A, encontra-se a medida de glicemia. Em B, C e D, a dosagem plasmática de leptina, triglicerídios e colesterol, respectivamente. Em A e B, dados de um experimento com  $n = 7$  a  $14$  por grupo, apresentado como média e desvio-padrão. Em C e D, dados de um experimento com  $n = 3$  por grupo, apresentado como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t* student) entre os grupos NND e HHD.

## **Leptina modula a participação do tecido adiposo durante jejum prolongado**

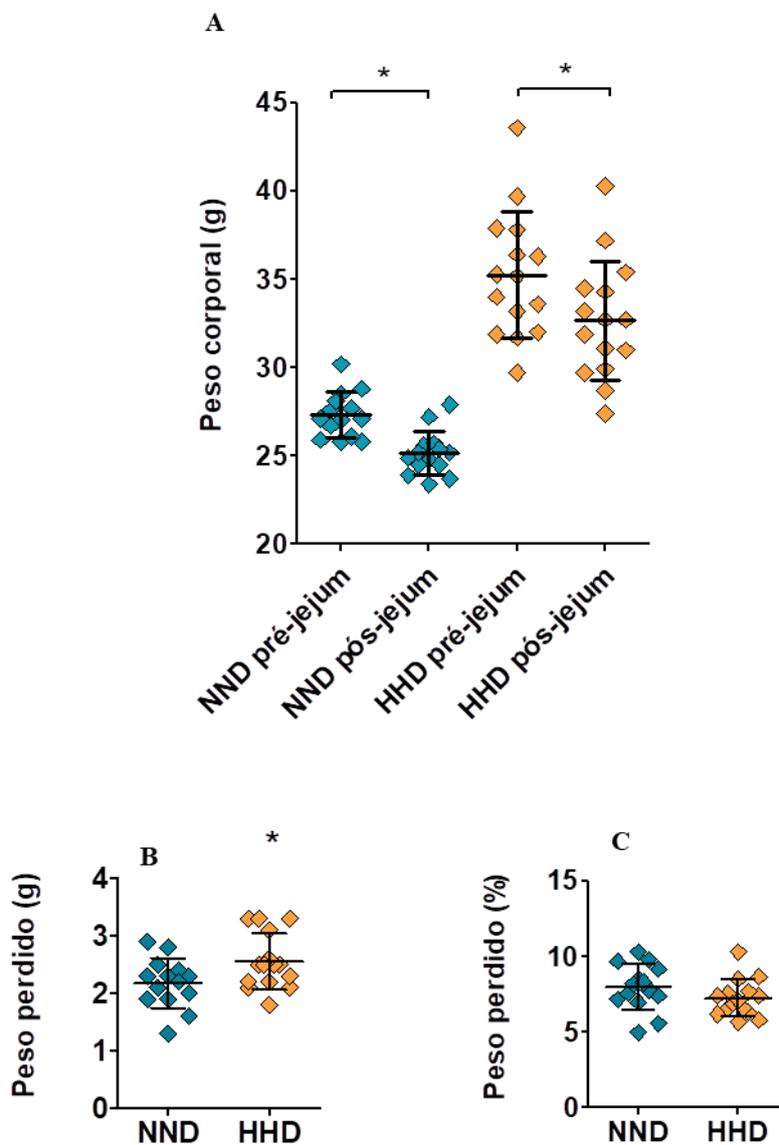
Para a avaliação do efeito da leptina sobre animais NND e HHD, os animais foram submetidos a jejum pernoite (cerca de 16h) antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p.

Na figura 4.5A, observa-se que apenas o jejum pernoite leva à redução de peso tanto no grupo NND quanto no grupo HHD. Ao quantificar o peso perdido por animal, observa-se que os animais do grupo HHD perdem maior peso em gramas que os animais do grupo NND (figura 4.5B); no entanto, o percentual de peso perdido é semelhante entre os grupos (figura 4.5C).

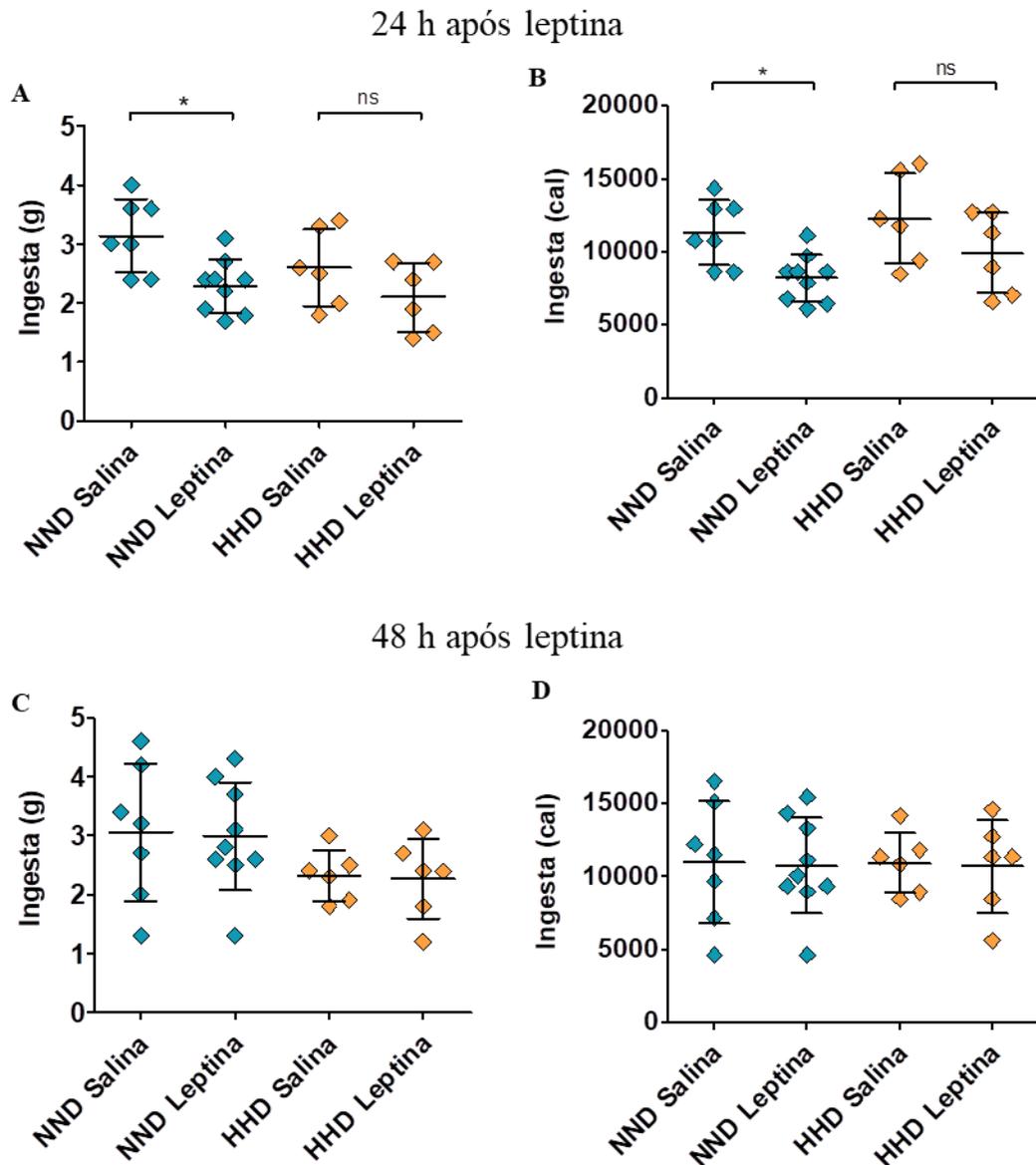
Para avaliação do efeito hipotalâmico da leptina, os animais foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. Em seguida, houve reposição da ração para avaliação do consumo calórico de ração por animal, sendo mantido 1 animal por caixa. Nas figuras 4.6A e 4.6B, observa-se que, 24 h após a injeção, os animais do grupo NND que receberam leptina apresentam menor consumo em gramas e calorias que os animais NND que receberam salina, enquanto que os animais do grupo HHD, tratados ou não com leptina, não apresentam diferença significativa na ingesta calórica. Em 4.6C e 4.6D, os grupos NND não apresentam diferença de consumo, em gramas ou calorias, 48 h após a injeção de salina ou leptina. Tais dados sugerem que a leptina injetada apresenta efeito inibitório da ingesta alimentar nas primeiras 24 h, mas não até 48h. A ingesta alimentar de animais do grupo HHD em 24h ou 48h indicam que o efeito de inibição da ingesta não ocorre nestes animais. Em conjunto, os dados da figura 4.6 manifestam a resistência hipotalâmica à leptina nos animais HHD; fenômeno semelhante é observado na obesidade humana.

Em geral, o tecido adiposo epididimal é estudado como o representante da adiposidade abdominal devido, em parte, ao seu volume apresentar maior participação do que outros depósitos na região abdominal do camundongo. Por isso, foi feita a avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais NND e HHD submetidos a jejum, injetados com leptina ou salina. O jejum foi mantido após a injeção. Os animais foram submetidos à eutanásia 24 h após a injeção; foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal para futura análise de parâmetros inflamatórios; amostras de tecido adiposo foram recolhidas e pesadas.

A figura 4.7A mostra que, como esperado, o jejum reduz o peso do TA epididimal nos grupos NND e HHD. Após 24h da injeção de leptina, o TA epididimal, bilateral, proveniente de animais NND apresenta peso significativamente reduzido em relação aos tecidos dos animais NND que receberam salina. Os animais HHD, injetados com leptina

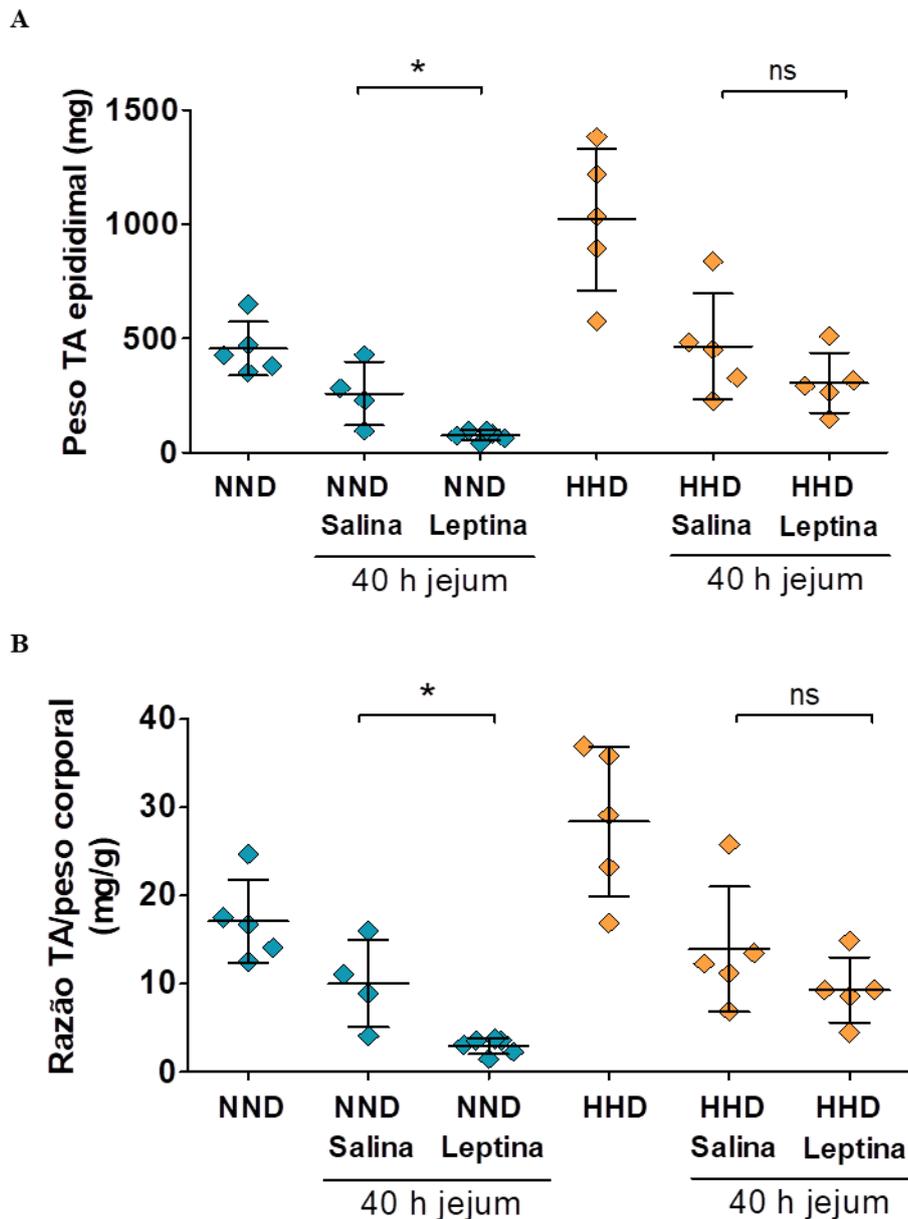


**Fig 4.5. Avaliação do peso corporal em animais NND e HHD submetidos a jejum.** Animais NND e HHD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina). Em A, encontra-se o peso corporal medido antes e após o jejum. Em B e C, a perda de peso é demonstrada em massa e percentual, respectivamente. A, B e C, dados de um experimento com  $n = 14$  por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t* student) entre os grupos indicados.



**Fig 4.6. Avaliação da resistência hipotalâmica à leptina na dieta HHD.** Animais NND e HHD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina) e reposição da ração imediatamente após a injeção. Os dados foram obtidos 24h (A e B) e 48h (C e D) após a injeção, quando foi avaliada a ingesta em gramas e calorias de ração por animal (1 animal por caixa). Em A, B, C e D, dados de um experimento com  $n = 6$  a 9 por grupo, apresentado como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ , teste t student) entre os grupos indicados.

24 h após leptina



**Fig 4.7. Avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais NND e HHD, 24h após injeção de leptina ou salina.**

Animais NND e HHD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina), sendo submetidos a eutanásia após 24h. Foi recolhido, então, o TA epididimal. Animais NND e HHD que não foram submetidos a jejum foram utilizados como controle. Pode ser observado, em A, o peso do tecido adiposo epididimal e, em B, a razão do peso do tecido adiposo (mg) pelo peso corporal (g) apresentado antes do jejum. *A e B, dados de um experimento com, pelo menos, n = 5 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ , teste t student) entre os grupos indicados. (ns) não-significativo estatisticamente.*

ou salina, não apresentam diferença significativa de peso. Nas figuras 4.7B, normalizamos o peso do TA pelo peso corporal de cada animal, obtido antes do jejum. Pode ser observado que a proporção do tecido em relação ao peso corporal reproduz as observações do peso absoluto dos tecidos obtidos em 24 h.

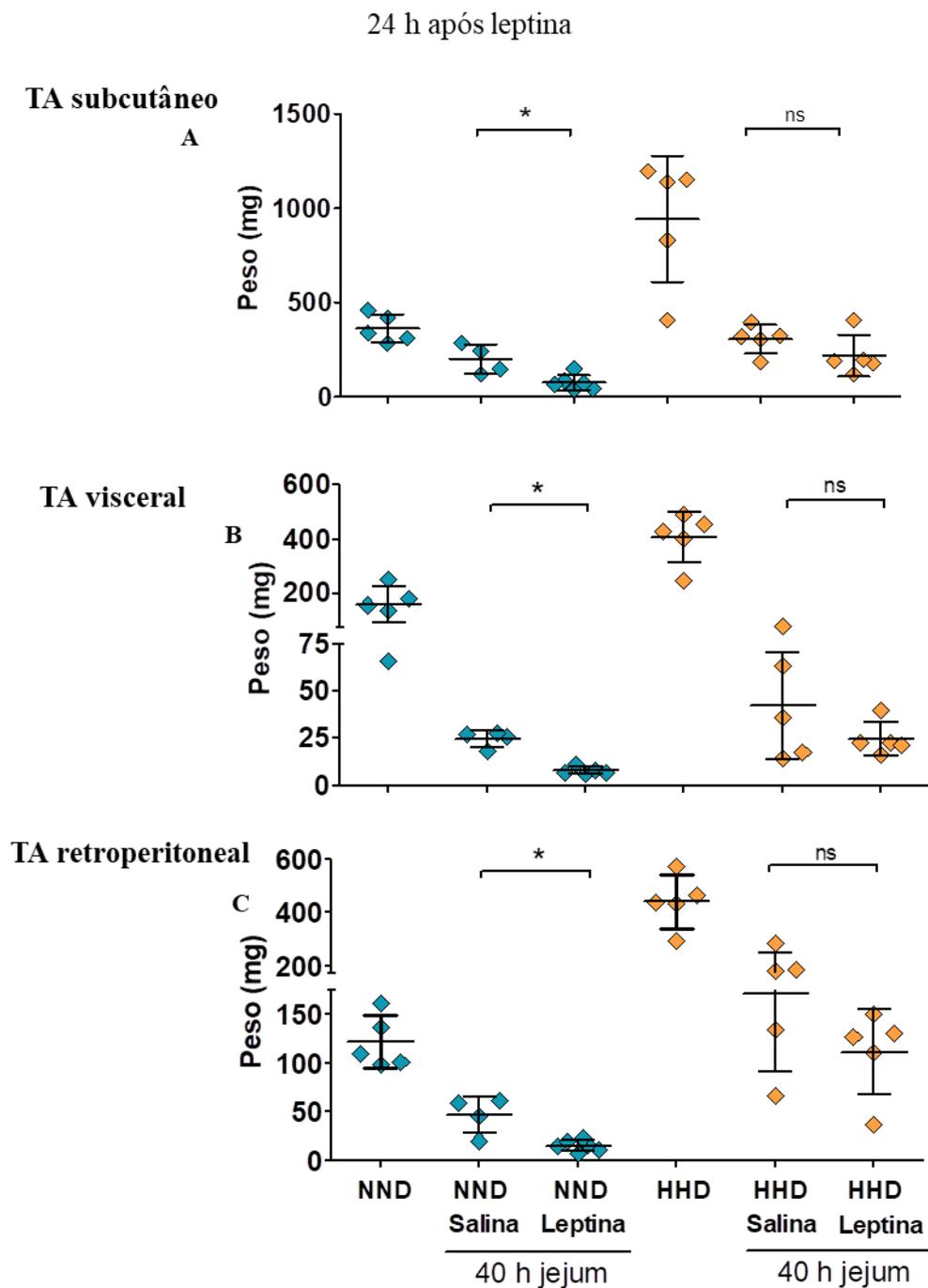
Em seguida, foi investigado se este efeito se reproduz em outros depósitos de tecido adiposo. Na figura 4.8, observa-se que a redução de peso do tecido adiposo, após 24h de injeção de leptina, não é sítio-específica nos animais NND, ocorrendo também nos depósitos subcutâneo, visceral e retroperitoneal de TA (figuras 4.78, B e C, respectivamente).

Para avaliar o status energético dos animais NND e HHD na condição de jejum e na intervenção de leptina, a glicemia foi medida em 6h e 24h após a injeção de leptina (figura 4.9). Pode ser observado que animais NND injetados com leptina apresentam redução da glicemia em 6h e 24h, enquanto animais HHD, injetados ou não com leptina, não apresentam diferença de glicemia em 6h e 24h. A ausência do efeito da leptina nos animais HHD nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9 parece estar relacionada à resistência hipotalâmica à leptina exógena.

Como a lavagem da cavidade peritoneal foi uma etapa de manipulação que precedeu a pesagem do TA epididimal, não podemos afirmar que os dados do grupo NND na figura 4.10A representam a ausência do efeito da leptina sobre o tecido adiposo. Decidimos, então, investigar se o procedimento de lavagem peritoneal é capaz de interferir, de modo relevante, na medida do peso do TA epididimal. Para isso, realizamos um experimento com animais C57bl/6 machos, com 8 semanas de idade, alimentados com a dieta padrão do biotério. Estes animais foram submetidos ao jejum pernoite e, em seguida, injetados com leptina 6h antes da eutanásia. Pode ser observado na figura 4.11 que os TA medidos após a lavagem da cavidade peritoneal apresentam maior peso que os tecidos medidos sem a lavagem da cavidade peritoneal. Isto ocorre nos grupos salina e leptina. Em seguida, foi feita a normalização do peso dos tecidos em relação ao peso corporal de cada animal, antes do jejum (figura 4.11B). A normalização sugere que a proporção do tecido em relação ao peso corporal é superestimada nos animais em que foi feita a lavagem da cavidade peritoneal.

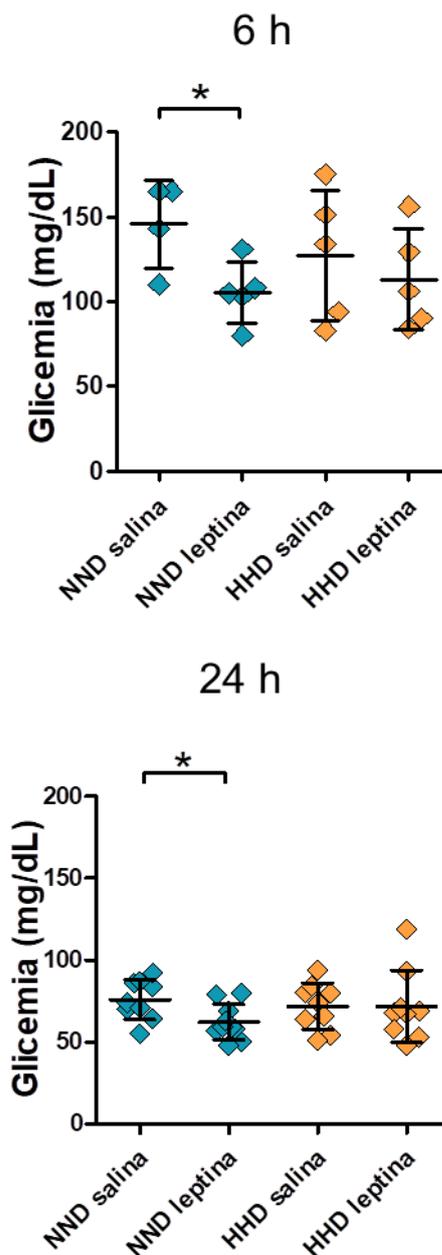
Investigamos se outros órgãos são afetados pela leptina neste protocolo de jejum. Para isso, recolhemos o baço 6h após a injeção de leptina e o fígado 24h após a injeção de leptina. Observamos na figura 4.12 que não há diferença de peso entre os grupos avaliados.

Em conjunto, estes dados sugerem que a leptina interfere no metabolismo de



**Fig 4.8. Avaliação da massa de TA subcutâneo, visceral e retroperitoneal de animais NND e HDD, 24h após injeção de leptina ou salina.**

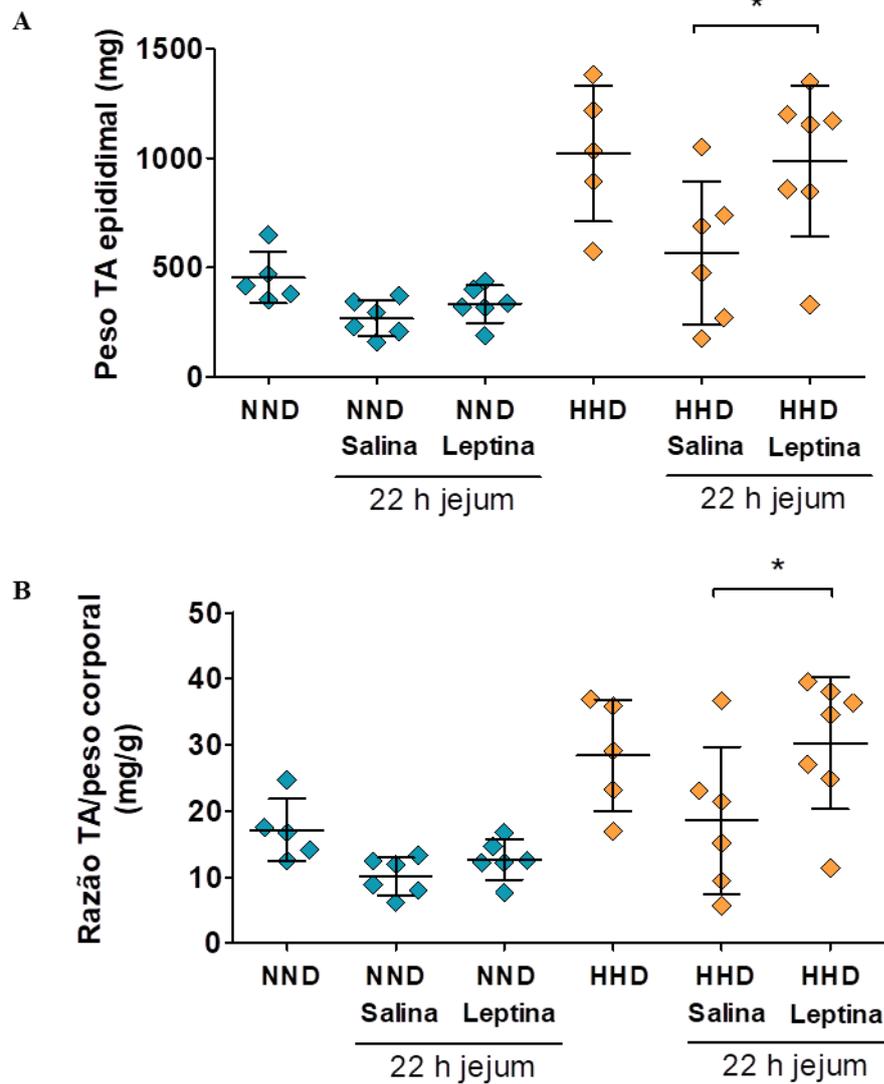
Animais NND e HDD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina), sendo submetidos a eutanásia após 24h. Foram recolhidos, então, TAs subcutâneo, visceral e retroperitoneal; o peso destes TA são observados respectivamente em A, B e C. Animais NND e HDD que não foram submetidos a jejum foram utilizados como controle. A, B e C, dados de um experimento com, pelo menos,  $n = 5$  animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste t student) entre os grupos indicados. (ns) não-significativo estatisticamente.



**Fig 4.9. Medição da glicemia em animais NND e HHD, 6h e 24h após serem injetados com leptina ou salina.**

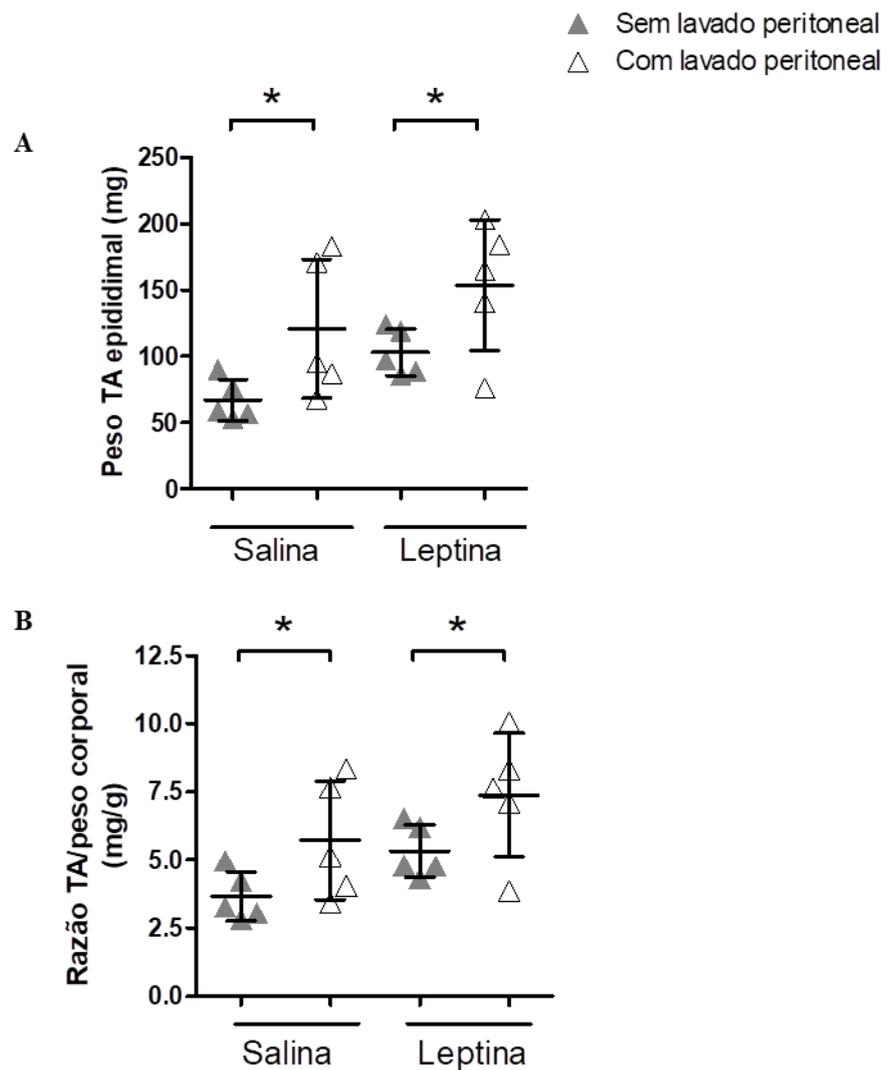
Animais NND e HHD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina). O jejum foi mantido até a medição de glicemia, 6 h ou 24 h após a injeção, mostrados em A e B, respectivamente. *A*, dados de um experimento representativo de 2 experimentos, com  $n = 4$  a 5 animais por grupo. *B*, dados de um experimento representativo de 4 experimentos com, pelo menos,  $n = 9$  animais por grupo. Dados apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t* student) entre os grupos indicados. (\*)

6 h após leptina



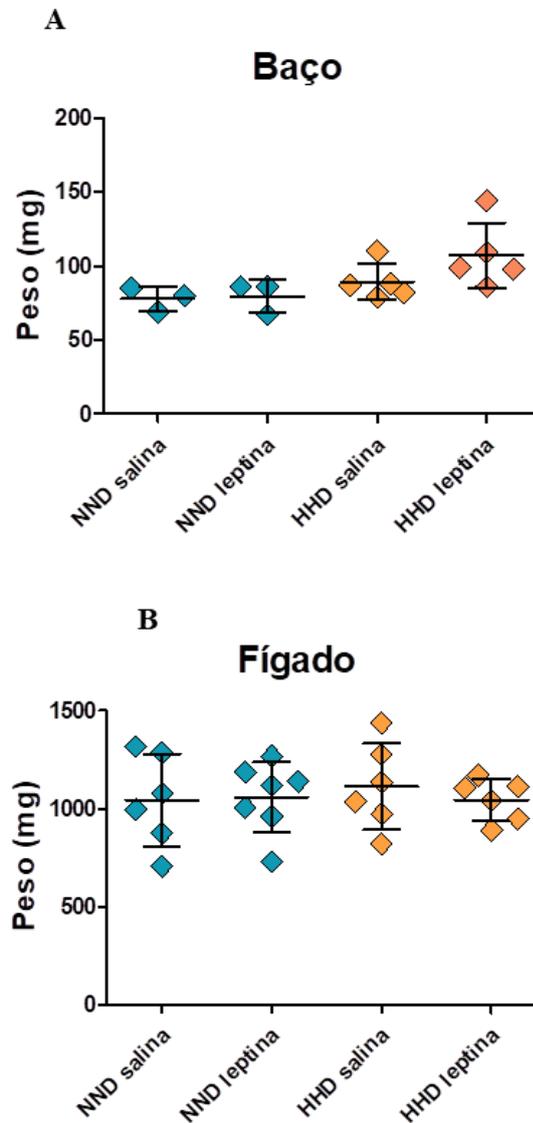
**Fig 4.10. Avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais NND e HHD, 6h após injeção de leptina ou salina.**

Animais NND e HHD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina), sendo submetidos a eutanásia após 6h. Foi recolhido, então, o TA epididimal. Animais NND e HHD que não foram submetidos a jejum foram utilizados como controle. Pode ser observado, em A, o peso do tecido adiposo epididimal e, em B, a razão do peso do tecido adiposo (mg) pelo peso corporal (g) apresentado antes do jejum. *A e B, dados de um experimento com, pelo menos, n = 5 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste t student) entre os grupos indicados. (ns) não-significativo estatisticamente.*



**Fig 4.11. Avaliação da massa do tecido adiposo epididimal em animais controle, 6h após injeção de leptina ou salina.**

Camundongos C57Bl/6 com 8 semanas de idade, alimentados com dieta padrão do biotério de experimentação, foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina). Os animais foram mantidos em jejum após a injeção e submetidos à eutanásia após 6h, quando foram separados em grupos submetidos ou não à lavagem da cavidade peritoneal (vide metodologia). A, peso do tecido adiposo epididimal. B, o peso do tecido adiposo (mg) foi normalizado pelo peso corporal (g) obtido antes do jejum. *A e B, dados de um experimento com n = 5 por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa (p < 0,05, teste t student) entre os grupos indicados.*



**Fig 4.12. Avaliação do peso do baço e do fígado em animais NND e HHD submetidos a jejum e injetados com leptina.**

Animais NND e HHD foram submetidos a jejum pernoite antes de receberem 1 mg/kg de leptina i.p. (ou salina), sendo submetidos a eutanásia após 6h ou 24h. Fígado e baço foram recolhidos e pesados. Em A, pode ser observado o peso do baço recolhido após 6h da injeção de leptina. Em B, observa-se o peso do fígado após 24h da injeção de leptina. *A e B, dados de um experimento com n = 3 a 6 por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos.*

animais em jejum. A leptina não parece apresentar efeito tardio (em 24h) no grupo HHD. Além disso, em 6h, a leptina preserva o TA epididimal no grupo HHD, mesmo havendo perda de peso corporal.

### **Neutrófilos de animais obesos são responsivos aos efeitos da leptina *in vivo***

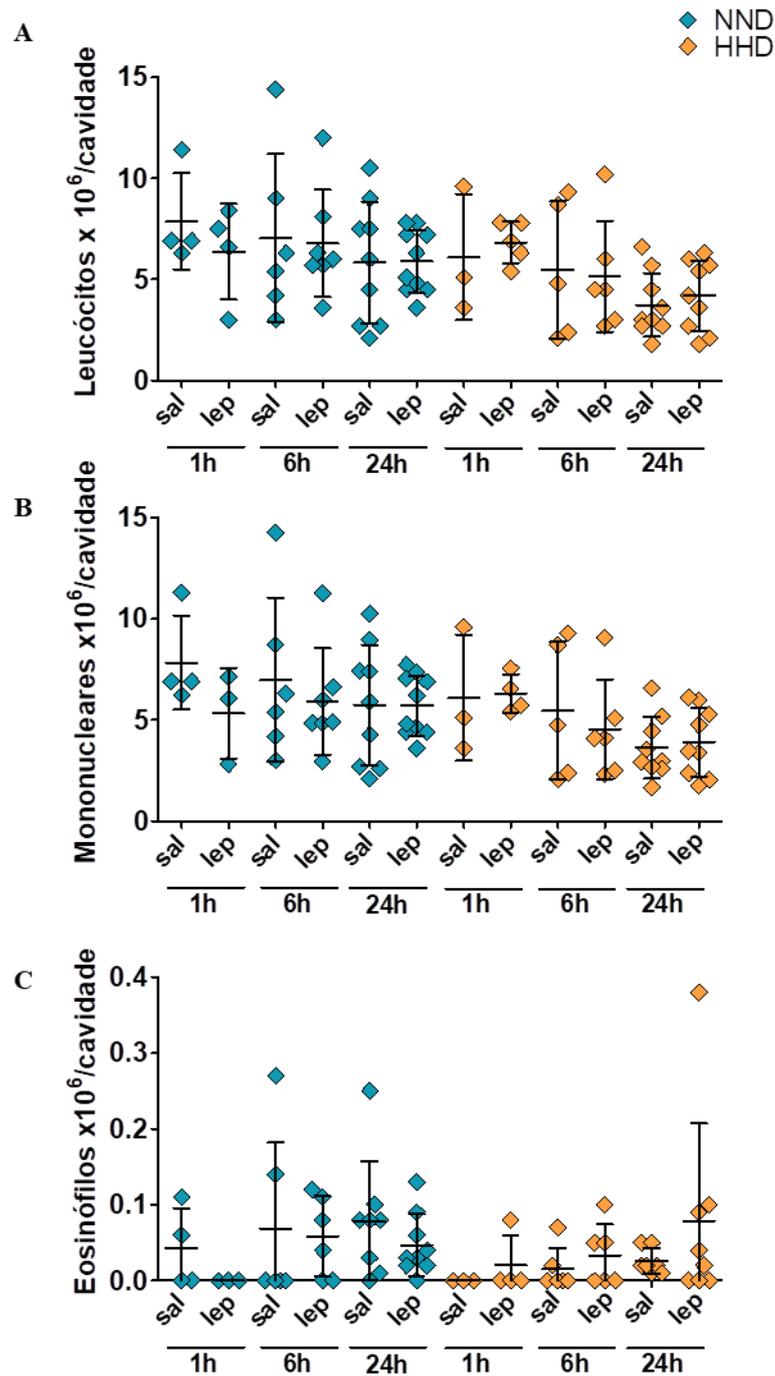
Dados estabelecidos previamente pelo nosso grupo (2012, Souza-Almeida, G., Dissertação de Mestrado) demonstram que neutrófilos são responsivos aos efeitos da leptina *in vivo*, isto é, com a participação de KC e TNF- $\alpha$ . Nesta tese, investigamos como a leptina afeta a participação do neutrófilo na resposta inflamatória na obesidade. Como observamos que a leptina interfere no metabolismo de animais com obesidade induzida por dieta, submetidos a jejum prolongado, decidimos investigar se tal efeito reflete sobre a resposta inflamatória.

Desta forma, animais alimentados com ração HHD e NND foram submetidos a jejum pernoite, injetados com leptina 1 mg/kg ou salina i.p., sendo mantido o jejum até a eutanásia, realizada 1 h, 6 h ou 24 h após a injeção. Foram avaliados células e mediadores inflamatórios presentes na cavidade peritoneal e no sangue.

Na figura 4.13, pode ser observado que a leptina não promove alteração significativa na quantidade total de células peritoneais, nem de células mononucleares ou eosinófilos, em 1h, 6h ou 24h. Na figura 4.14, observamos que 1h após a injeção de leptina, neutrófilos são recrutados para a cavidade peritoneal tanto em animais NND quanto em animais HHD. Os neutrófilos são acumulados na cavidade peritoneal em 6h e continuam presentes em 24h. Os leucócitos circulantes também foram avaliados em relação à presença de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos. Não foram observadas alterações significativas, como efeito da leptina, na quantidade destas células em 1h e 6h (figura 4.15).

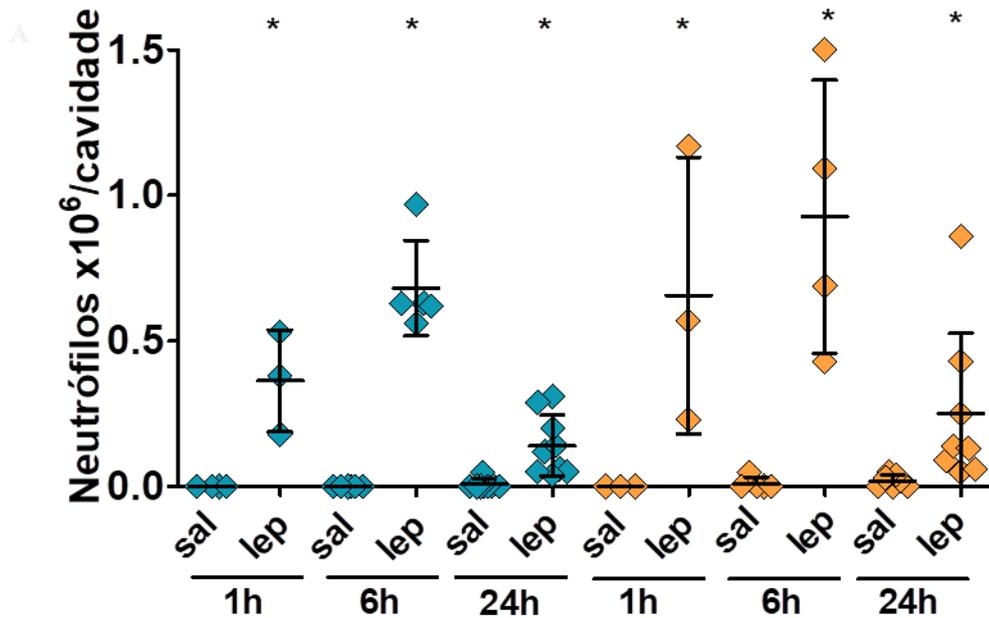
Uma vez que a injeção de leptina leva à migração de neutrófilos típica de resposta inflamatória aguda, avaliamos a presença de corpúsculos lipídicos nas células da cavidade peritoneal no modelo de obesidade. Nosso grupo já demonstrou que a leptina ativa macrófagos peritoneais de modo a induz a formação de corpúsculos lipídicos. Assim, utilizamos o protocolo de injeção de leptina em animais NND e HHD. As células peritoneais, obtidas 24h após a injeção de leptina, foram coradas com tetróxido de ósmio ou com *Oil Red O*.

Na figura 4.16A, podem ser observadas imagens capturadas em microscopia de



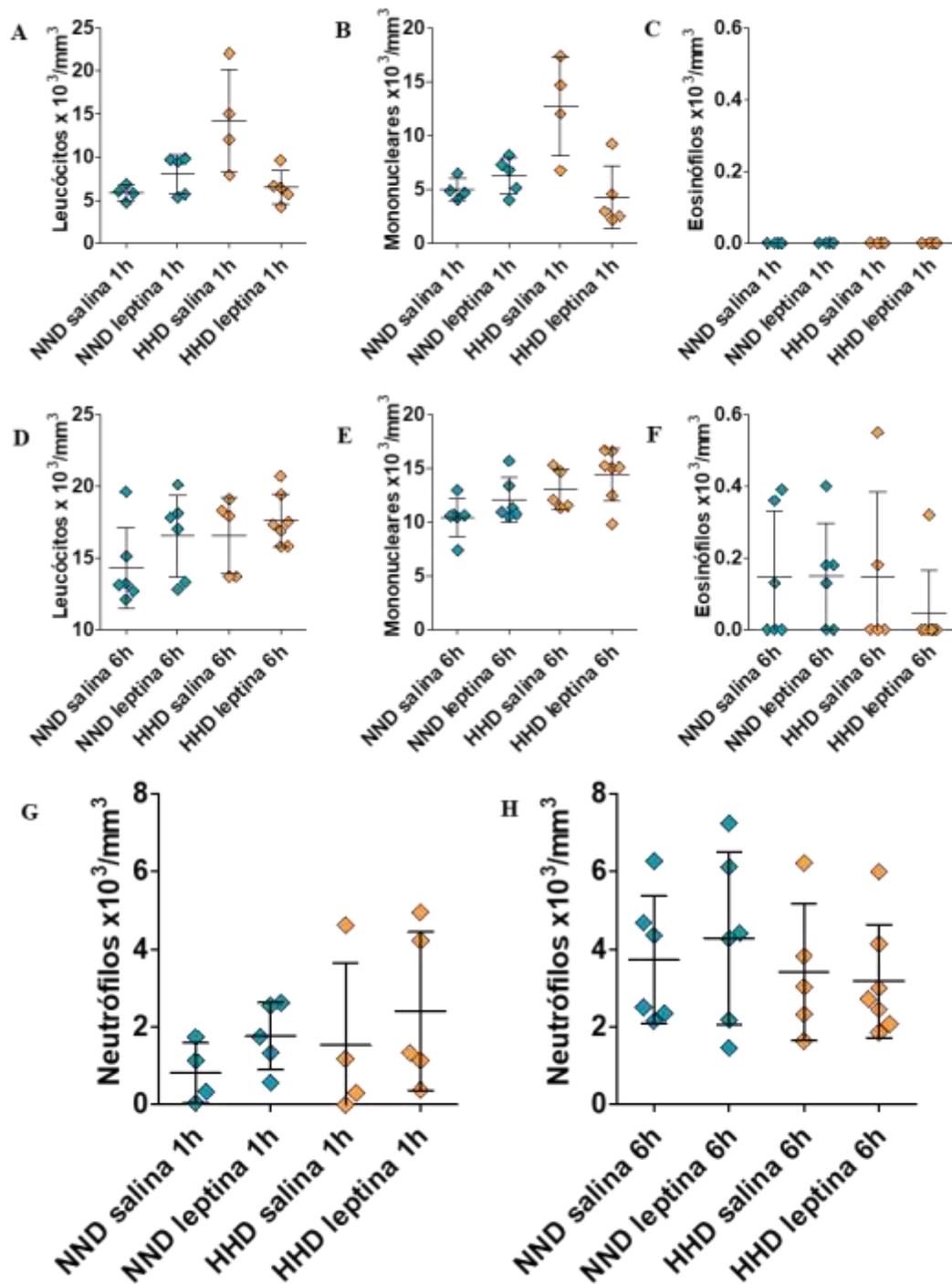
**Fig 4.13. Leucócitos totais, mononucleares e eosinófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais NND e HHD injetados com salina ou leptina.**

Animais dos grupos NND e HHD foram injetados com leptina i.p. (1 mg/Kg), ou salina, após jejum pernoite (vide metodologia). As células peritoneais foram obtidas após 1h, 6h e 24h, e a contagem diferencial foi feita após a coloração por May-Grunwald-Giemsa. Em A, B e C, pode ser observada a quantidade de leucócitos totais, mononucleares e eosinófilos encontrados na cavidade peritoneal nos tempos indicados. A, B e C, dados de três experimentos com  $n = 3$  a 9 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão, representativos de 1- 6 experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.



**Fig 4.14. Recrutamento de neutrófilos induzido por leptina em 1h, 6h e 24h para a cavidade peritoneal de animais NND e HHD.**

Animais dos grupos NND e HHD foram estimulados com leptina i.p. (1 mg/Kg), ou salina, após jejum pernoite (vide metodologia). As células peritoneais foram obtidas após 1h, 6h ou 24h, e a contagem diferencial foi feita após a coloração por May-Grunwald-Giemsa. Pode ser observada a quantidade de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal nos tempos indicados. *Dados de três experimentos com n = 3 a 9 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão, representativos de 1- 6 experimentos independentes. (\*) diferença estatisticamente significativa (p < 0,001, One-Way Anova) entre os grupos leptina e salina.*



**Fig 4.15. Leucócitos circulantes no sangue de animais NND e HHD injetados com leptina ou salina.**

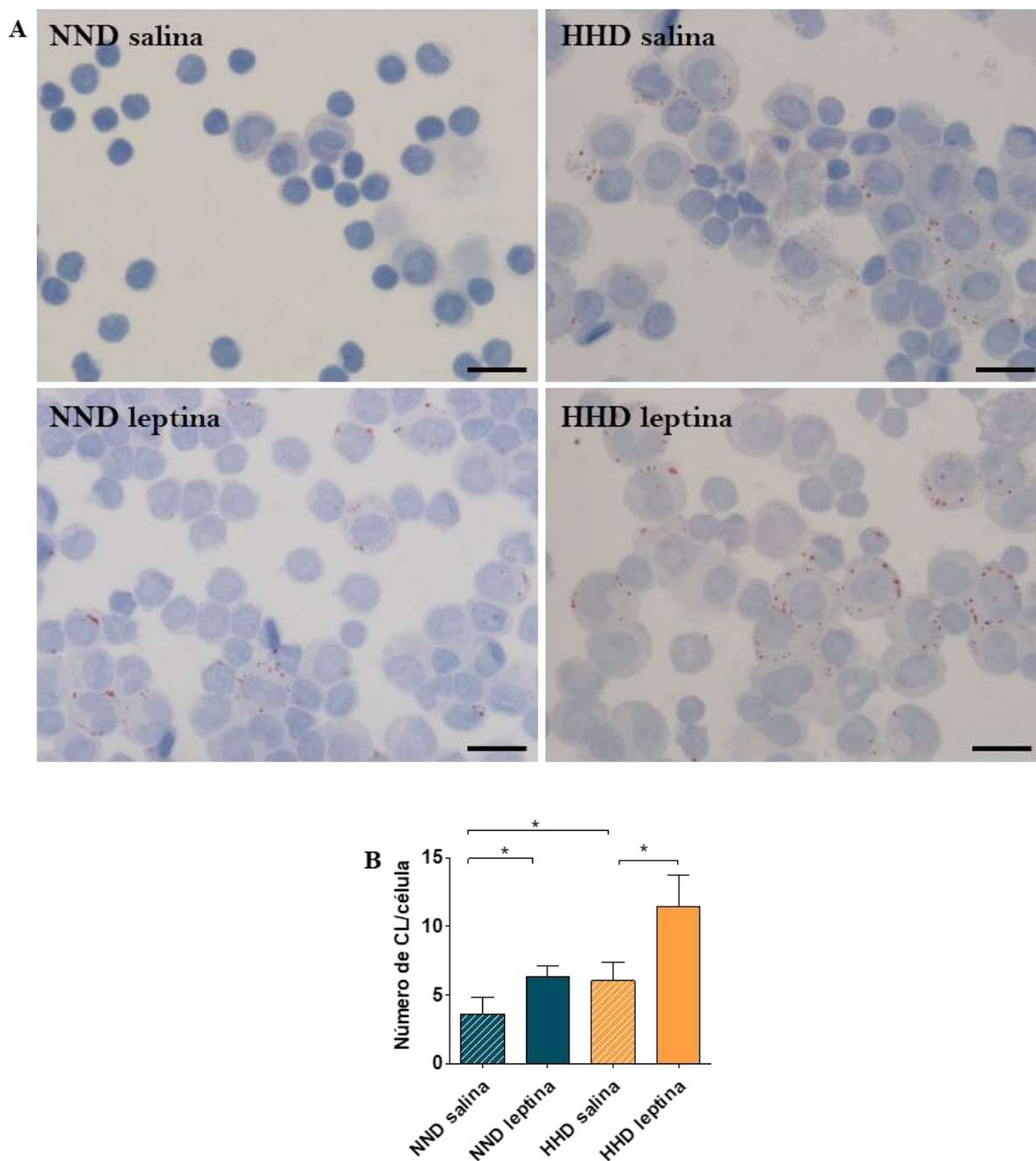
Animais dos grupos NND e HHD foram estimulados com leptina i.p. (1 mg/Kg), ou salina, após jejum pernoite (vide metodologia). Leucócitos circulantes foram obtidas após 1h e 6h, e a contagem diferencial foi feita após a coloração por May-Grunwald-Giemsa. Em A-F, pode ser observada a taxa de leucócitos totais, mononucleares e eosinófilos encontrados no sangue. Em G e H, pode ser observada, respectivamente, a quantidade de neutrófilos circulantes 1h e 6h após a injeção de leptina. A-H, dados de dois experimentos com  $n = 4$  a 5 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão, representativos de 1-3 experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

campo claro, representando as células peritoneais encontradas nos animais NND e HHD. São observados corpúsculos lipídicos marcados com *Oil Red O*, com coloração de hematoxilina. Pode ser observado que o grupo HHD apresenta maior marcação de corpúsculos lipídicos que o grupo NND. A injeção de leptina leva ao aumento da marcação de corpúsculos do grupo NND, comparados com a injeção de salina. O grupo HHD injetado com leptina também apresenta maior marcação que o grupo NND salina. Na figura 4.16B foi realizada a avaliação por ósmio, sendo observado que animais do grupo HHD apresentam quantidade aumentada no número de corpúsculos lipídicos sem injeção de leptina, quando comparados com o grupo NND. Além disso, a injeção de leptina induz aumento do número de corpúsculos lipídicos no grupo NND injetado com leptina, assim como no grupo HHD injetado com leptina.

Estes dados sugerem que a dieta HHD favorece, na cavidade peritoneal, um estado inflamatório basal mais elevado que o encontrado na dieta NND, considerando a quantidade e tamanho de corpúsculos lipídicos.

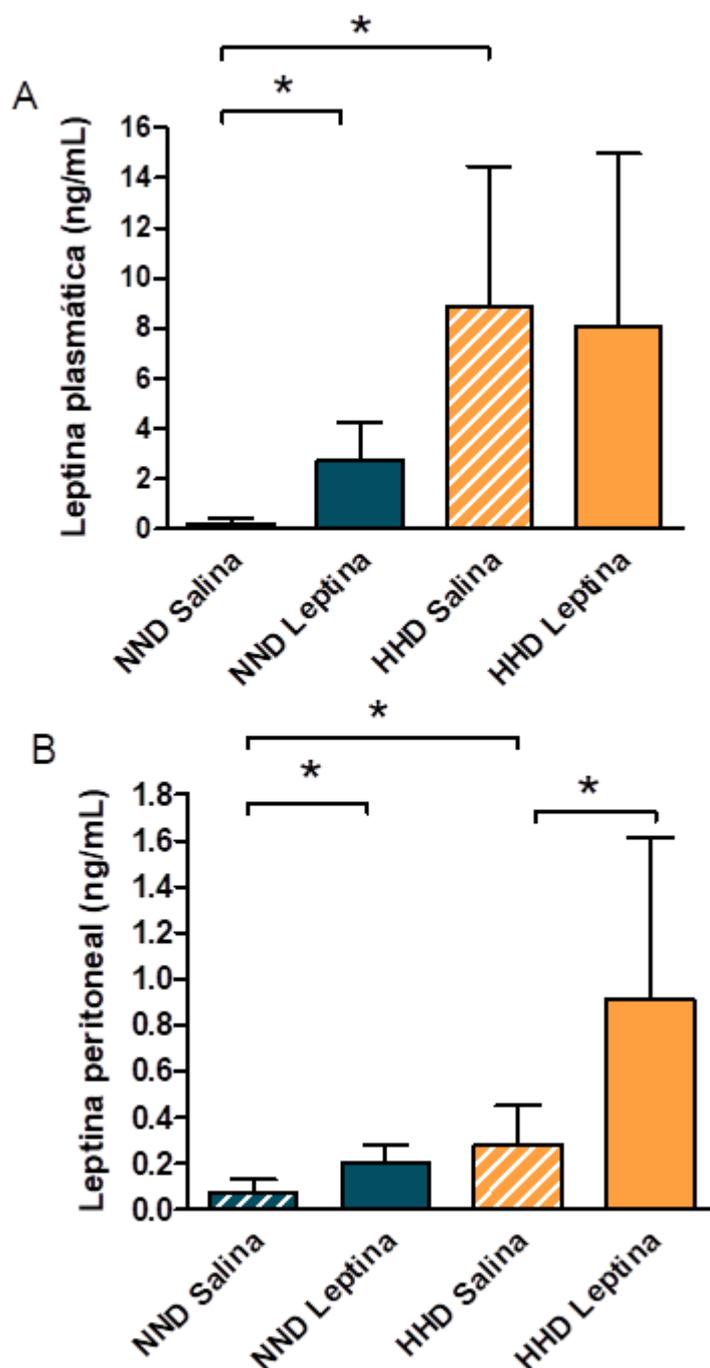
Em seguida, realizamos a avaliação dos níveis de leptina encontrados no sobrenadante de lavado peritoneal e no plasma sanguíneo, 24 h após a injeção de leptina i.p. Podemos observar na figura 4.17A que, em animais HHD injetados com leptina, não há alteração dos níveis plasmáticos, que se mantém elevados em relação os animais NND injetados com leptina. A figura 4.17B mostra que animais NND injetados com leptina e de animais HHD que não receberam injeção de leptina apresentam maior quantidade de leptina no sobrenadante de lavado peritoneal que a de animais NND salina. Curiosamente, foram apresentados níveis mais altos de leptina no sobrenadante de lavado peritoneal de animais HHD injetados com leptina, do que em animais NND injetados com leptina. Isto significa que macrófagos peritoneais de animais HHD estão mais expostos aos efeitos da leptina do que o grupo HHD salina e o grupo NND leptina, uma vez que a presença de leptina na cavidade peritoneal permanece após 24h de injeção nos animais HHD.

Sabendo-se que indivíduos obesos apresentam um quadro de inflamação subclínica, foi avaliada a contribuição de TNF- $\alpha$  e KC ao efeito da leptina no modelo de obesidade. Nas figuras 4.18A e B, pode ser observado que animais injetados com leptina apresentam elevação dos níveis de KC na cavidade peritoneal e no plasma 1h, mas não 6h, após a injeção de leptina, tanto nos animais NND quanto HHD. Nas figuras 4.18C, pode ser observado que, em 24h, animais HHD já apresentam elevação nos níveis de TNF- $\alpha$  peritoneal quando comparados com animais NND. A injeção de leptina promove o aumento de TNF- $\alpha$  peritoneal em animais NND, mas não altera os níveis de TNF- $\alpha$  em animais HHD.

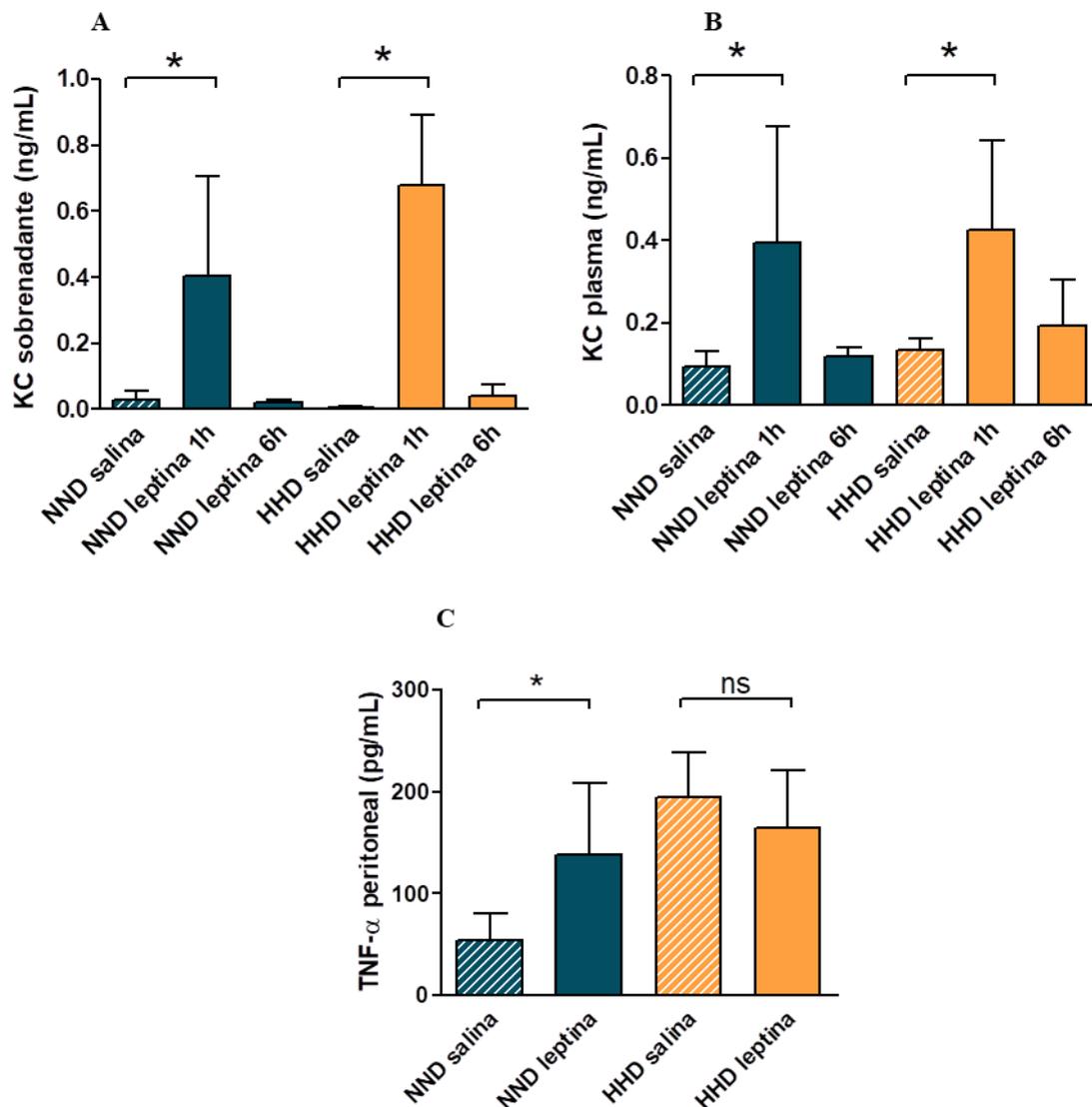


**Fig 4.16. Formação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais de animais NND e HHD estimulados com leptina.**

Animais dos grupos NND e HHD foram estimulados com leptina i.p. (1 mg/Kg), ou salina, após jejum pernoite (vide metodologia). As células peritoneais foram obtidas após 24 h e submetidas à coloração de para marcação de corpúsculos lipídicos. Em A, fotomicrografias de lâminas foram coradas com Oil Red O e hematoxilina. Em B, as lâminas foram coradas com tetróxido de ósmio e os corpúsculos foram contados no microscópio óptico (50 células por animal). A, imagens representativas de um experimento com  $n = 5$  por grupo, pelo menos. B, dados de um experimento com  $n = 5$  a 8 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ , teste One-Way Anova).



**Fig 4.17. Níveis plasmáticos e intraperitoneais de leptina em animais NND e HHD.** Animais dos grupos NND e HHD foram injetados com leptina i.p. (1 mg/Kg), ou salina, após jejum pernoite (vide metodologia). Por ELISA, foi realizada a dosagem de leptina no plasma, obtido após punção cardíaca, e no sobrenadante de lavado peritoneal. Em A e B, quantidade de leptina plasmática e peritoneal, respectivamente, 24h após a injeção de leptina i.p. *A e B*, dados de um experimento com  $n = 6$  a  $8$  animais por grupo, representativos de 3 experimentos, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste *t* student).



**Fig 4.18. Níveis plasmáticos e intraperitoneais de KC e TNF- $\alpha$  em animais NND e HHD.**

Animais dos grupos NND e HHD foram injetados com leptina i.p. (1 mg/Kg), ou salina, após jejum pernoite (vide metodologia). Por ELISA, foi realizadas dosagens no plasma, obtido após punção cardíaca, e no sobrenadante de lavado peritoneal. Em A e B, quantidade de KC peritoneal e plasmático, respectivamente, 1h e 6h após a injeção de leptina. Em C, quantidade de TNF- $\alpha$  peritoneal 24h após a injeção de leptina i.p. A, B e C, dados de um experimento com  $n = 3$  a 5 animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , pelo menos, teste *t* student).

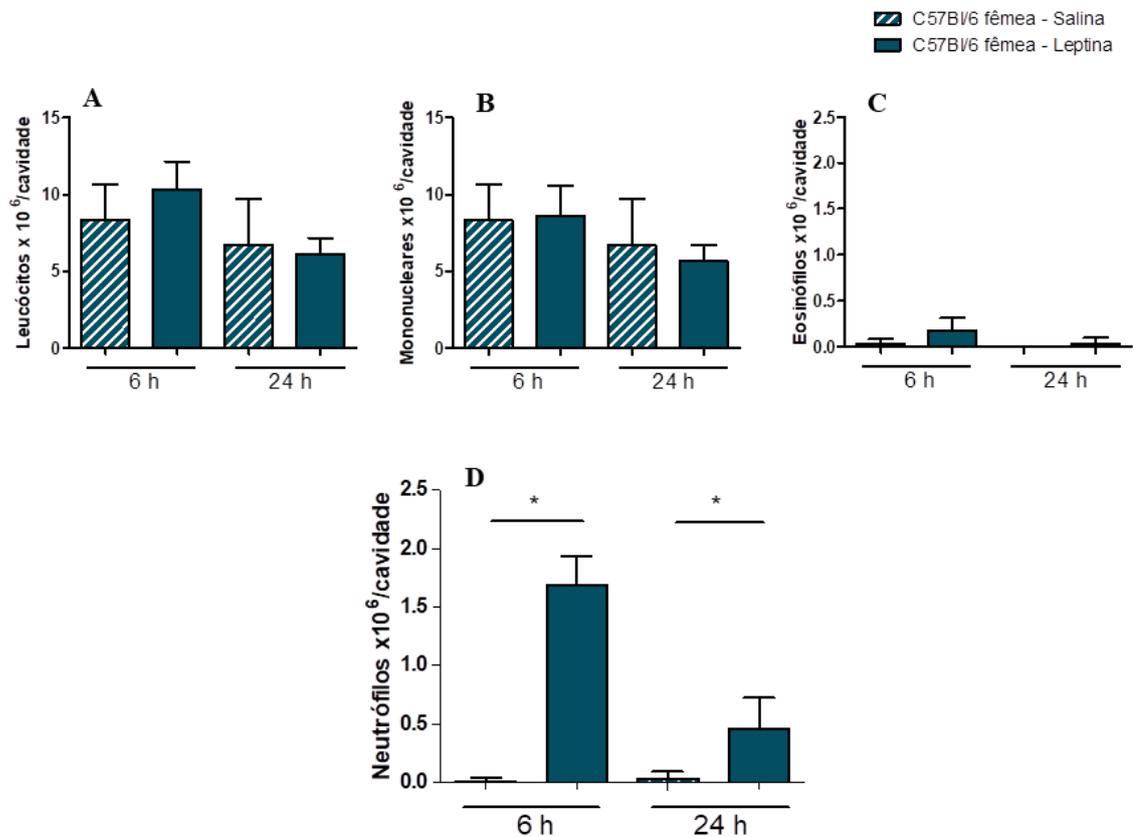
Nota-se, então, que animais alimentados com dieta HHD apresentam *background* inflamatório, caracterizado por altos níveis de TNF- $\alpha$  e predisposição de macrófagos peritoneais aos efeitos da leptina. No entanto, esta inflamação subclínica, associada à elevação crônica dos níveis de leptina, não é suficiente para promover influxo de neutrófilos para o peritônio, de modo que o estímulo agudo de leptina é capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos em animais HHD, de modo semelhante ao recrutamento observado em animais NND.

### **O efeito da leptina é reprodutível em fêmeas de C57Bl/6 e machos de BALBc**

Para avaliar se as observações deste trabalho se restringem apenas ao modelo de obesidade estabelecido em camundongos C57Bl/6 machos, investigamos os efeitos da leptina na resposta inflamatória são reprodutíveis em animais C57Bl/6 fêmeas e Balb/c machos. Existem diferentes modelos de doença e inflamação estabelecidos nestes animais, o que cria uma lacuna de conhecimento, uma vez que há poucos trabalhos que abordam o efeito da leptina em relação a estas doenças, em relação aos animais C57Bl/6 machos.

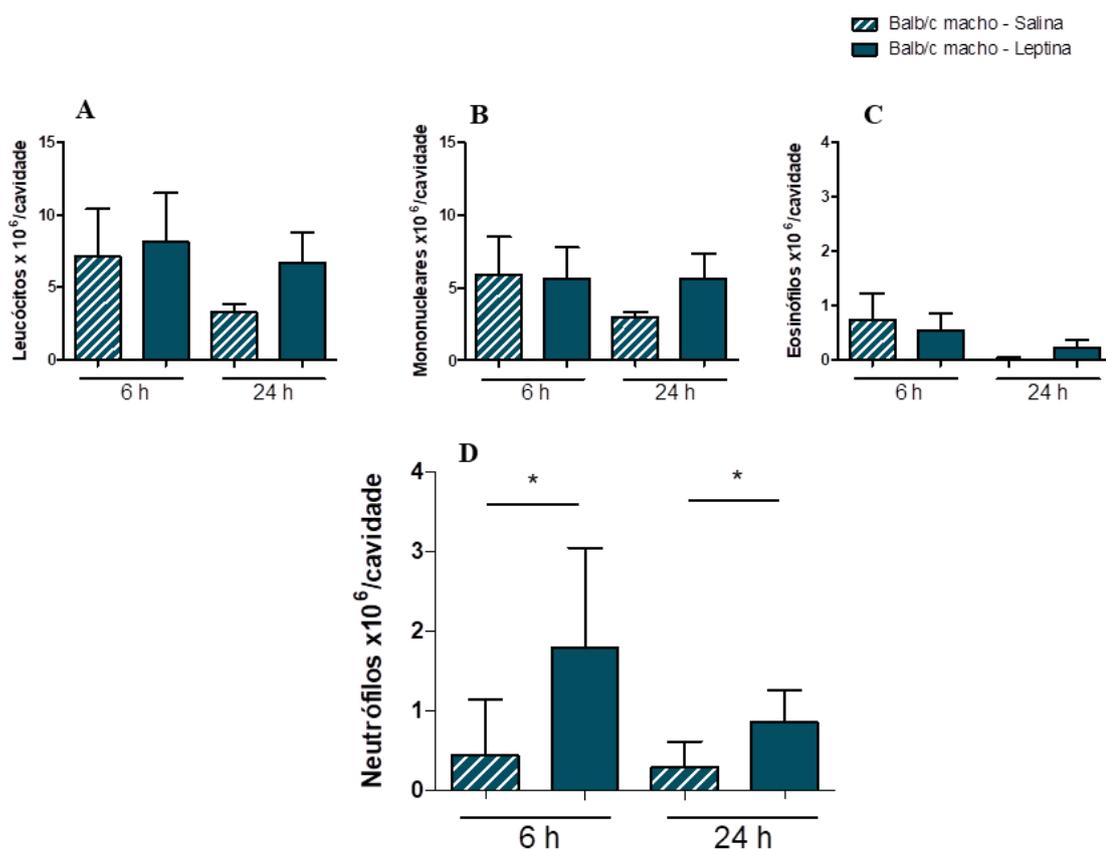
Animais C57bl/6 fêmeas e Balb/c machos foram submetidos a jejum pernoite, recebendo injeção de leptina 1mg/kg i.p. e permanecendo em jejum por 6h ou 24h, quando foram realizadas as análises. Na figura 4.19, podemos observar que C57Bl/6 fêmeas apresentam recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal 6h e 24h após a injeção de leptina, sem alteração na quantidade de mononucleares ou eosinófilos peritoneais. Na figura 4.20, podemos observar que Balb/c machos também apresentam recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal 6h e 24h após a injeção de leptina, sem alterar a quantidade de células mononucleares ou eosinófilos. Tais dados sugerem, ainda, que a cinética do recrutamento de neutrófilos nestes animais é semelhante à dos animais C57bl/6 machos, havendo acúmulo em 6h em relação a 24h.

Investigamos também a participação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais de animais C57bl/6 fêmeas, 24h após a injeção de leptina. Como observado na figura 4.19, os animais injetados com leptina apresentam maior presença de corpúsculos lipídicos que animais injetados com salina. Além disso, pode-se observar que a marcação de Oil Red O para corpúsculos e DAPI para o núcleo celular permite identificar células polimorfonucleares, possivelmente eosinófilos e neutrófilos; tais células não apresentam corpúsculos lipídicos como efeito da leptina.



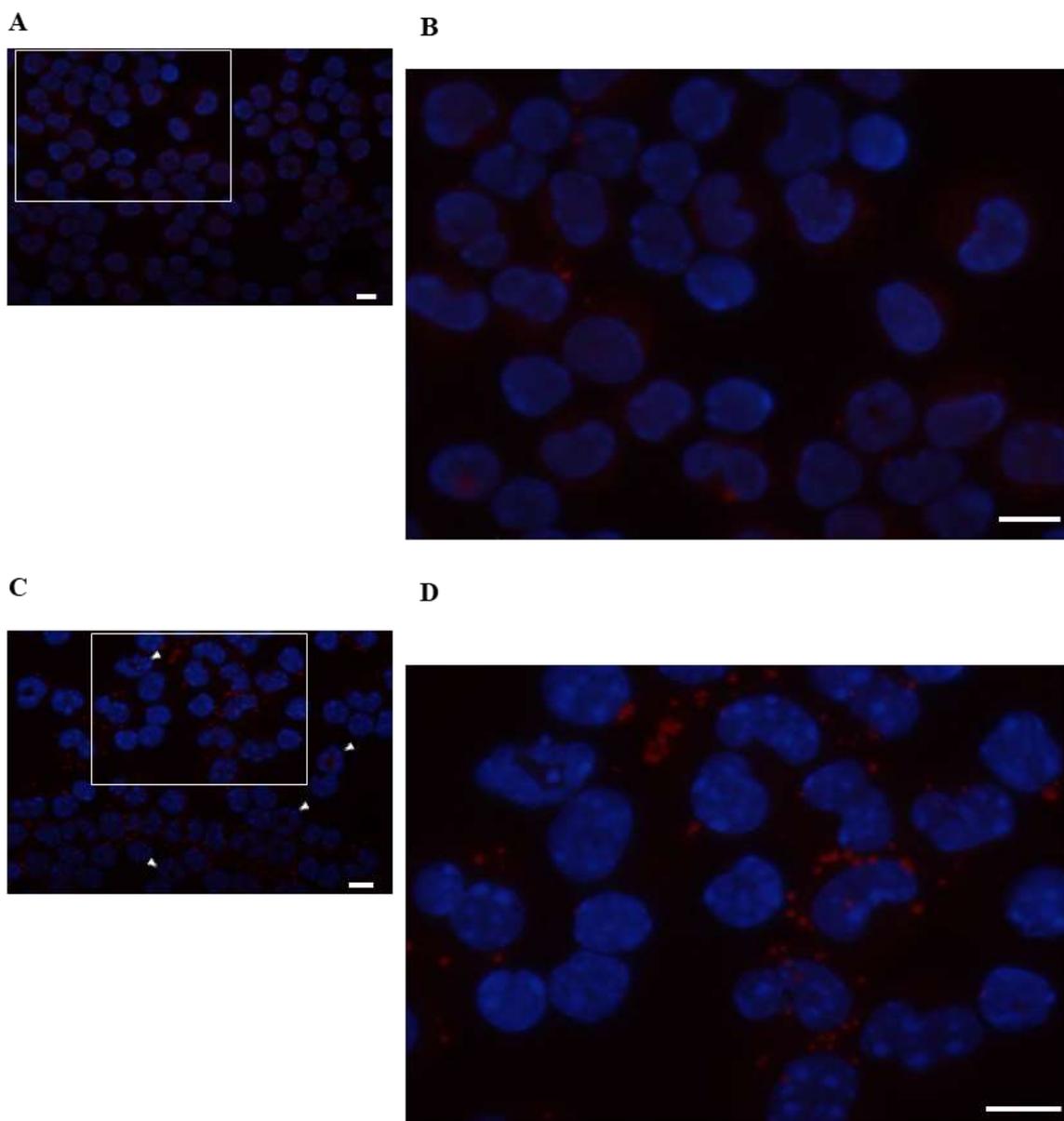
**Fig 4.19. Leptina promove, em 6h e 24h, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em C57Bl/6 fêmeas.**

Camundongos C57Bl/6 fêmeas foram injetadas com leptina i.p. (1 mg/Kg) após jejum pernoite. As células peritoneais foram obtidas após 6h e 24h, e a contagem diferencial foi feita após a coloração por May-Grunwald-Giemsa. Em A, B e C, é observada a quantidade total de leucócitos, mononucleares e eosinófilos encontrados na cavidade peritoneal. Em D, neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal nos tempos indicados. *A-D, dados de um experimento com n = 5 animais por grupo, representativos de 3 experimentos, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa (p<0,01, teste t student).*



**Fig 4.20. Leptina promove, em 6h e 24h, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em Balb/c machos.**

Camundongos Balb/c machos foram injetados com leptina i.p. (1 mg/Kg) após jejum pernoite. As células peritoneais foram obtidas após 6h e 24h, e a contagem diferencial foi feita após a coloração por May-Grunwald-Giemsa. Em A, B e C, é observada a quantidade total de leucócitos, mononucleares e eosinófilos encontrados na cavidade peritoneal. Em D, neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal nos tempos indicados. A-D, dados de um experimento com  $n = 5$  animais por grupo, apresentados como média e desvio-padrão. (\*) diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste t student).



**Fig 4.21. Formação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais de fêmeas injetadas com leptina.**

Camundongos C57Bl/6 fêmeas foram injetadas com leptina i.p. (1 mg/Kg) após jejum pernoite. As células peritoneais foram obtidas após 24 h de estímulo e marcadas com as sondas fluorescentes Oil Red O para visualização do corpúsculos lipídicos (vermelho) e DAPI para visualização dos núcleos (azul) por microscopia de fluorescência. Em A grupo Salina, B (detalhe da imagem A). Em C, grupo leptina, D (detalhe da imagem C). Em C, cabeça de seta cheia a presença de células polimorfonucleares. Barras 10  $\mu$ m.

## 5. Discussão

A obesidade decorre de uma adaptação do organismo ao ambiente de grande oferta de alimentos, o que leva a um grande consumo de calorias em associação a pouca demanda de atividade física (YE, 2013). Neste trabalho optamos por aperfeiçoar o modelo de obesidade, e estabelecemos um modelo que é reprodutível, considerando-se as seguintes condições: animais são submetidos à dieta a partir de 6 a 7 semanas de idade, com peso inicial entre 15 e 21g, alimentados por cerca de 100 a 125 dias com ração rica em sacarose e lipídios (HHD), sendo dieta controle a ração com fornecimento normal de sacarose e lipídios (NND). A literatura apresenta variados exemplos de intervenção nutricional e, diante de dado padrão de demanda energética, diferentes fontes de nutrientes podem resultar em alterações metabólicas distintas (GAJDA et al., 2007). Dieta rica em carboidratos simples induz obesidade associada a diabetes moderada, enquanto dieta hiperlipídica induz acúmulo lipídico no tecido adiposo e resistência hipotalâmica à leptina (VAN HEEK et al., 1997).

Foi estabelecido um modelo que, além de mimetizar a obesidade humana em relação ao ganho de peso resultante de ingesta hipercalórica, permitiu adequadamente a investigação dos efeitos da leptina endógena e exógena. Como demonstram nossos dados, animais alimentados com ração NND apresentam ganho de peso ao longo da dieta, enquanto que animais alimentados com a dieta HHD apresentam ganho de peso adicional. Demonstramos que o ganho de peso reflete o aumento da massa de tecido adiposo epididimal, possivelmente acompanhado da expansão de outros depósitos de tecido adiposo, como ocorre com o tecido adiposo subcutâneo, visceral e retroperitoneal.

O aumento de peso também foi acompanhado de hiperleptinemia, hiperglicemia e resistência hipotalâmica à leptina. A literatura mostra que a dose de leptina administrada neste estudo (1 mg/kg i.p.) é capaz de inibir o apetite de animais não-obesos, mas incapaz de inibir o apetite de animais obesos (LIN et al., 2000). A resistência hipotalâmica à leptina foi descrita por Van Heek et al., 1997, em que animais obesos por dieta não são responsivos à leptina administrada intraperitonealmente, isto é, não apresentam inibição de apetite, mas são parcialmente responsivos à leptina administrada via intracerebroventricular.

Atualmente, recomenda-se a medição de glicemia de 4h de jejum. Nossos resultados mostraram que o jejum por 18h foi mais adequado para avaliar a comparação entre os grupos NND e HHD. Além disso, o maior tempo de jejum nos permitiu avaliar diferentes efeitos decorrentes da administração de leptina. Já foi demonstrado o efeito hipoglicemiante

da leptina. Nós observamos que este efeito só é visível na dieta NND. A ausência do efeito hipoglicemiante no HHD pode sugerir resistência à leptina.

Considerando que a elevação crônica dos níveis plasmáticos de leptina foi suficiente para alterar a resposta hipotalâmica à leptina exógena, decidimos investigar se o efeito da leptina endógena em diferentes células e tecidos periféricos está alterado neste modelo de obesidade. A ocorrência de aumento de glicemia no nosso modelo sugere algum grau de pré-diabetes ou diabetes insulino-resistente concordando com os dados de Romero-Zerbo (ROMERO-ZERBO et al., 2017). O autor observou um quadro de hiperinsulinemia, resistência tecidual à insulina e camundongos obesos pré-diabéticos com inflamação sistêmica de baixo grau através da utilização de um modelo de dieta hiperlipídica semelhante ao utilizado nesse trabalho. Assim, a possível ocorrência de hiperinsulinemia e resistência tecidual à insulina confirma uma sinalização cruzada entre insulina e leptina como observado (ROMERO-ZERBO et al., 2017).

Existem algumas maneiras de avaliar a massa de tecido adiposo de camundongos. As mais comuns na literatura são a determinação do percentual de gordura global por meio da ressonância magnética de corpo inteiro e a pesagem *ex-vivo* do tecido adiposo epididimal como meio de aferir a adiposidade visceral em relação à massa corporal.

Sabe-se que o tecido adiposo é uma fontes energéticas ativadas em períodos de escassez nutricional, sendo o acúmulo de lipídios no tecido adiposo um importante mecanismo de sobrevivência. Assim, a regulação das vias de catabolismo e anabolismo permite que indivíduos com maior reserva energética apresentem prolongamento da sobrevivida em situações de jejum prolongado. Então, como esperado, observamos no jejum prolongado a redução da massa de tecido adiposo associada à redução do peso corporal.

Neste estudo, demonstramos que a redução de peso corporal está acompanhada da redução de peso do tecido adiposo epididimal, tanto em animais do grupo NND, quanto do grupo HHD. Isto indica que o metabolismo está em catabolismo, priorizando a disponibilização de energia e nutrientes para funções vitais. Além disso, 24h após a administração de leptina, o tecido adiposo de animais NND apresenta tamanho reduzido em comparação com animais NND que não receberam leptina.

Quando os animais NND recebem a injeção de leptina, observa-se que, em 6h, estes apresentam glicemia mais baixa quando comparados com animais NND que não receberam leptina. Quando os animais HHD recebem a injeção de leptina, observa-se que, em

6h, não há alteração na glicemia e há peso de tecido adiposo mais alto, comparados com animais HHD que não receberam leptina. Assim, este trabalho descreve que, no jejum, a leptina preserva o tecido adiposo epididimal por 6h em animais do grupo HHD.

Nossos dados levantam a possibilidade da leptina interferir no envolvimento do tecido adiposo enquanto fonte energética durante o jejum. Sabe-se que a indução de lipólise reduz o tamanho da gota lipídica do adipócito e, por consequência, reduz o tamanho do tecido adiposo. A lipólise está induzida no jejum prolongado e poderia ter sido interrompida pela administração de leptina. Outra possibilidade é que outra fonte de energia seja preferencialmente induzida pela leptina, reduzindo a demanda sobre o tecido adiposo. Pode-se ainda considerar que a administração de leptina no jejum prolongado promova a desaceleração do metabolismo global, reduzindo a demanda energética. No entanto, não foi detectada alteração no peso corporal como resposta à administração de leptina, avaliação que é insuficiente para validar ou descartar esta última hipótese. Tais efeitos poderiam resultar da regulação metabólica e da sinalização da leptina por meio do sistema nervoso central, somados ou não a efeitos diretos nos tecidos periféricos.

A leptina funciona como um sensor do status nutricional-energético do organismo, capaz de, a princípio, “comunicar” tal status a todos os tecidos, sejam eles especializados em funções metabólicas, imunidade, reprodução ou outros. Virtualmente, todos os tecidos são responsivos à leptina devido à presença ubíqua de seus receptores LepR, como citado previamente na introdução. Curiosamente, os neutrófilos, que são células de destaque neste estudo, não apresentam a isoforma longa, LepRb, descrita como a principal isoforma capaz de desencadear a sinalização intracelular, mas apresentam apenas a isoforma LepRa. Diferentes estudos abordando os efeitos diretos da leptina sobre neutrófilos não esclarecem como ocorre a eventual sinalização por LepRa, isoforma curta, ubiquamente distribuída. Já a contribuição dos estudos sobre efeitos indiretos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, parecem indicar que o estado nutricional ou outras condições metabólicas pré-estabelecidas podem influenciar a resposta adaptativa (ou pré-condicionar a resposta) de neutrófilos à leptina.

Nosso grupo já demonstrou que a leptina ativa a via de mTOR em macrófagos, induzindo a formação de corpúsculos lipídicos (MAYA-MONTEIRO et al., 2008). Esta é apenas uma das evidências da estreita conexão entre a leptina e a via de mTOR, como sensor do status nutricional-energético intracelular em leucócitos. Diferentes modelos inflamatórios, infecciosos ou não, demonstram que corpúsculos lipídicos em macrófagos e outros leucócitos estão relacionados à resposta inflamatória. No camundongo previamente exposto à dieta

hiperlipídica, observamos que já há aumento de corpúsculos lipídicos nas células peritoneais. De forma interessante, a leptina injetada leva à indução ainda maior da formação de corpúsculos lipídicos.

Os dados obtidos no nosso estudo anterior (Almeida, GS, 2012, Dissertação de Mestrado) indicam que o neutrófilo é responsivo aos efeitos da leptina *in vivo*. O mecanismo de ação não parece ser a ação direta da leptina como fator quimiotático de neutrófilos. Nosso trabalho anterior sustenta a hipótese de que a presença da leptina no sítio da inflamação aguda indica, primariamente, que (1) há disponibilidade energética no organismo, suficiente para permitir a montagem de uma resposta inflamatória, e (2) induz a ativação de células especializadas na montagem da resposta inflamatória. A interpretação dos dados do estudo citado mostra-se coerente com outros dados da literatura em diversos modelos sugerindo que a presença de leptina no sítio inflamatório é importante para o estabelecimento de uma resposta inflamatória.

A partir desta perspectiva, fundamentada no estudo anterior do nosso grupo e em outros dados da literatura, pode-se considerar que a obesidade induzida por dieta é uma condição metabólico-inflamatória preexistente, levando ao interesse em avaliar o impacto de tal condição na resposta inflamatória induzida por leptina. No nosso modelo, mostramos que há resistência hipotalâmica à leptina, como pode ser observado na figura 4.6. De forma interessante, a exposição de neutrófilos à quantidade aumentada de leptina circulante, como ocorre nos animais obesos, não altera a cinética da migração celular em relação aos animais não obesos (figuras 4.14). Este fenômeno pode indicar que os neutrófilos circulantes, neste modelo, não estão pré-condicionados a uma resposta exacerbada ou inibida (por retroalimentação negativa) à leptina ou à “peritonite estéril” induzida por leptina. Os achados dos efeitos da leptina em células presentes na cavidade peritoneal, tais como macrófagos e neutrófilos, sugerem a hipótese de que não há, de fato, resistência periférica em leucócitos na obesidade induzida por dieta.

O aumento da migração de neutrófilos para o peritônio, sem diminuição significativa no sangue, sugere que (1) a concentração de neutrófilos recrutados não impactou a concentração de neutrófilos no sangue e (2) houve recrutamento de neutrófilos a partir da medula para a circulação. Podemos estimar que o volume total de sangue em um camundongo é de 2 mL (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY). Utilizando esta estimativa, calculamos, a partir da figura 4.15, que camundongos apresentam cerca de  $6 \times 10^6$  neutrófilos circulantes. Como a quantidade encontrada na cavidade peritoneal foi de  $1 \times 10^6$  e não observamos

redução consistente na quantidade de neutrófilos circulantes, podemos sugerir que ocorre, como esperado, o recrutamento rápido de neutrófilos da medula para a circulação.

A obesidade não alterou a migração de neutrófilos à leptina exógena, uma vez que a quantidade de neutrófilos recrutados em animais obesos após a a injeção i.p. de leptina é semelhante à quantidade de neutrófilos dos animais não-obesos injetados, em todos os tempos avaliados. Este trabalho sugere que TNF- $\alpha$  e CXCL1/KC participam do efeito quimiotático de leptina sobre neutrófilos *in vivo*, na obesidade. O sobrenadante de lavado peritoneal de animais obesos apresenta níveis elevados de TNF- $\alpha$ , que não são incrementados pela injeção de leptina nestes animais. Foi observado que a presença de KC no peritônio de camundongos injetados com leptina é mais alta do que os estímulo de migração utilizados por Vieira e cols. (VIEIRA et al., 2009). Devemos considerar que os níveis de KC podem estar subestimados em até 10x considerando que o volume de lavagem do peritônio utilizado foi de 3 ml e o volume do líquido encontrado na cavidade não ultrapassa 100  $\mu$ l. Ou seja, apesar de não haver diferença na quimiotaxia induzida por leptina em animais obesos e não-obesos, os mecanismos regulatórios podem estar alterados na condição de obesidade.

A observação de que animais obesos apresentam maior quantidade de leptina no sobrenadante de lavado peritoneal pode ser explicada por alguns mecanismos. Como a barreira hematoencefálica tem papel fundamental na permeabilidade à leptina, contribuindo para a resistência hipotalâmica, alguns estudos têm investigado os efeitos da leptina sobre o endotélio. Assim, a maior quantidade de leptina no peritônio pode ser resultado da eventual dificuldade de absorção de leptina exógena para a circulação sanguínea, o que estaria associado à alteração da permeabilidade vascular periférica à leptina (CAO et al., 2001). Além disso, a dosagem pode ter detectado, parcialmente, traços da leptina exógena nos animais injetados.

A literatura apresenta variados estudos do efeito da leptina em modelos experimentais que utilizam camundongos da linhagem C57Bl/6. Entretanto, a maioria dos estudos é realizada em camundongos machos. Considera-se que a oscilação hormonal em fêmeas de camundongos muitas vezes interfere em estudos sobre o metabolismo e, por isso, muitas vezes estes animais não são considerados adequados. De fato, existem diferenças entre homens e mulheres em relação à leptina, como mostrado em um estudo com voluntários não-obesos, em que mulheres apresentam 40% mais leptina plasmática do que homens, uma vez que o percentual de gordura é maior em mulheres do que em homens (SAAD et al., 1997).

Neste trabalho, sugerimos que o modelo de injeção intraperitoneal de leptina para análise da resposta inflamatória parece ser reprodutível em fêmeas; isto é, assim como em machos, as fêmeas também apresentam macrófagos peritoneais com aumento de corpúsculos lipídicos e migração de neutrófilos para o peritônio, como efeito da leptina. Além disso, o estudo do envolvimento da leptina nas respostas inflamatórias em animais Balb/c pode contribuir para a compreensão de doenças cujos modelos já são estabelecidos nesta linhagem.

Assim, os dados deste trabalho demonstram que a leptina atua na resposta inflamatória aguda, de modo que, indiretamente, desencadeia o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, mesmo na presença de obesidade com resistência central à leptina.

## 6. Conclusões

- A dieta HHD é mais apropriada para induzir aumento de peso corporal, aumento de tecido adiposo, com dislipidemia, aumento de glicemia e leptinemia.
- O modelo de resistência hipotalâmica associada à obesidade induzida por dieta foi estabelecido com a dieta HHD (*high-fat high-sucrose diet*).
- Leptina incrementa a redução do tecido adiposo de animais controle no jejum.
- Animais obesos apresentam resistência à redução do tecido adiposo 24h após a injeção de leptina.
- O tecido adiposo de animais obesos é preservado nas primeiras 6h após administração de leptina.
- Existe um efeito da leptina específico no tecido adiposo do camundongo obeso, independente da resistência central à leptina.
- Leptina induz o recrutamento de neutrófilos e aumento de TNF $\alpha$  e KC em animais obesos.
- Leptina incrementa a formação de corpúsculos lipídicos nas células peritoneais de animais obesos.
- O efeito inflamatório da leptina é reprodutível em camundongos fêmeas de C57Bl/6 e machos de BALB/c.

Conclusão geral:

Os efeitos periféricos da leptina ocorrem mesmo na presença de resistência hipotalâmica no camundongo obeso. A leptina promove efeitos em tecido adiposo e leucócitos na obesidade.

## 7. Referências Bibliográficas

ALBERTI, K. G. M. M.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I.; DONATO, K. a; FRUCHART, J.-C.; JAMES, W. P. T.; LORIA, C. M.; SMITH, S. C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640–5, 20 out. 2009.

BAHRENBERG, G.; BEHRMANN, I.; BARTHEL, A.; HEKERMAN, P.; HEINRICH, P. C.; JOOST, H.-G.; BECKER, W. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 16, n. 4, p. 859–72, abr. 2002.

BJØRBAEK, C.; KAHN, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. **Recent progress in hormone research**, v. 59, p. 305–31, jan. 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel Brasil 2014). p. 37, 2014.

CAMPFIELD, L.; SMITH, F.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R.; BURN, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 546–549, 28 jul. 1995.

CAO, R.; BRAKENHIELM, E.; WAHLESTEDT, C.; THYBERG, J.; CAO, Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 6390–5, 22 maio 2001.

CEDDIA, R. B.; LOPES, G.; SOUZA, H. M.; BORBA-MURAD, G. R.; WILLIAM, W. N.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Acute effects of leptin on glucose metabolism of in situ rat perfused livers and isolated hepatocytes. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 23, n. 11, p. 1207–12, nov. 1999.

CEDDIA, R. B.; WILLIAM, W. N.; CURI, R. Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 23, n. 1, p. 75–82, jan. 1999.

CHUA, S. C.; KOUTRAS, I. K.; HAN, L.; LIU, S. M.; KAY, J.; YOUNG, S. J.; CHUNG, W. K.; LEIBEL, R. L. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. **Genomics**, v. 45, n. 2, p. 264–70, 15 out. 1997.

COLEMAN, D. L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, v. 9, n. 4, p. 294–8, ago. 1973.

COLEMAN, D. L.; HUMMEL, K. P. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. **The American journal of physiology**, v. 217, n. 5, p. 1298–304, nov. 1969.

CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNAS, a; STEPHENS, T.

W.; NYCE, M. R.; OHANNESIAN, J. P.; MARCO, C. C.; MCKEE, L. J.; BAUER, T. L. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England journal of medicine**, v. 334, n. 5, p. 292–5, 1 fev. 1996.

CORKEY, B. E. Banting lecture 2011: Hyperinsulinemia: Cause or consequence? **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 4–13, 2012.

COTA, D.; PROULX, K.; SMITH, K. A. B.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5775, p. 927–30, 12 maio 2006.

COUCE, M. E.; BURGUERA, B.; PARISI, J. E.; JENSEN, M. D.; LLOYD, R. V. Localization of leptin receptor in the human brain. **Neuroendocrinology**, v. 66, n. 3, p. 145–50, set. 1997.

CUMIN, F.; BAUM, H. P.; DE GASPARO, M.; LEVENS, N. Removal of endogenous leptin from the circulation by the kidney. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 21, n. 6, p. 495–504, jun. 1997.

CUMIN, F.; BAUM, H. P.; LEVENS, N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 20, n. 12, p. 1120–6, dez. 1996.

DOBBINS, R. L.; SZCZEPANIAK, L. S.; ZHANG, W.; MCGARRY, J. D. Chemical sympathectomy alters regulation of body weight during prolonged ICV leptin infusion. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E778–E787, 1 abr. 2003.

ELKS, C. M.; FRANCIS, J. Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 2, p. 99–104, abr. 2010.

FREDERICH, R. C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LÖLLMANN, B.; LOWELL, B. B.; FLIER, J. S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature medicine**, v. 1, n. 12, p. 1311–4, dez. 1995.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–70, 22 out. 1998.

FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **The Biochemical journal**, v. 393, n. Pt 1, p. 7–20, 1 jan. 2006.

FRÜHBECK, G.; AGUADO, M.; MARTÍNEZ, J. A. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 240, n. 3, p. 590–594, 1997.

GAJDA, A. M.; PELLIZZON, M. A.; D, P.; RICCI, M. R.; ULMAN, E. A. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models. **Strain**, n. March, 2007.

GALGANI, M.; PROCACCINI, C.; DE ROSA, V.; CARBONE, F.; CHIEFFI, P.; LA CAVA, A.; MATARESE, G. Leptin modulates the survival of autoreactive CD4+ T cells through the nutrient/energy-sensing mammalian target of rapamycin signaling pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 12, p. 7474–9, 15 dez. 2010.

GE, H.; HUANG, L.; POURBAHRAMI, T.; LI, C. Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45898–903, 29 nov. 2002.

GHILARDI, N.; SKODA, R. C. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 11, n. 4, p. 393–399, 1997.

HOUSEKNECHT, K. L.; MANTZOROS, C. S.; KULIAWAT, R.; HADRO, E.; FLIER, J. S.; KAHN, B. B. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1638–43, nov. 1996.

HUMMEL, K. P.; DICKIE, M. M.; COLEMAN, D. L. Diabetes, a new mutation in the mouse. **Science (New York, N.Y.)**, v. 153, n. 3740, p. 1127–8, 2 set. 1966.

INGALLS, A. M.; DICKIE, M. M.; SNELL, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. **The Journal of heredity**, v. 41, n. 12, p. 317–8, dez. 1950.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–56, jun. 2004.

KORBONITS, M.; TRAINER, P. J.; LITTLE, J. A.; EDWARDS, R.; KOPELMAN, P. G.; BESSER, G. M.; SVEC, F.; GROSSMAN, A. B. Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. **Clinical Endocrinology**, v. 46, n. 6, p. 751–757, jun. 1997.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J. M.; CARROLL, K. M.; DARVISHZADEH, J. G.; LEE, J. I.; FRIEDMAN, J. M. **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.** *Nature*, 1996. .

LIN, S.; THOMAS, T. C.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 24, n. 5, p. 639–46, maio 2000.

LÖLLMANN, B.; GRÜNINGER, S.; STRICKER-KRONGRAD, A.; CHIESI, M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 238, n. 2, p. 648–52, 18 set. 1997.

LUPI, R.; MARCHETTI, P.; MAFFEI, M.; DEL GUERRA, S.; BENZI, L.; MARSELLI, L.; BERTACCA, A.; NAVALESI, R. Effects of acute or prolonged exposure to human leptin on isolated human islet function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, n. 3, p. 637–641, 1999.

MARROQUI, L.; GONZALEZ, A.; NECO, P.; CABALLERO-GARRIDO, E.; VIEIRA, E.; RIPOLL, C.; NADAL, A.; QUESADA, I. Role of leptin in the pancreatic b-cell: effects and signaling pathways. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 49, n. 1, p. R9–R17, 29 maio 2012.

MAYA-MONTEIRO, C. M.; ALMEIDA, P. E.; D'AVILA, H.; MARTINS, A. S.; REZENDE, A. P.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; BOZZA, P. T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-

- dependent mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 4, p. 2203–10, 25 jan. 2008.
- MEZEY, E.; RENNIE-TANKERSLEY, L.; POTTER, J. J. Effect of leptin on liver alcohol dehydrogenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 337, n. 4, p. 1324–9, 2 dez. 2005.
- MÜLLER, G.; ERTL, J.; GERL, M.; PREIBISCH, G. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 16, p. 10585–10593, 1997.
- MUOIO, D. M.; DOHM, G. L.; TAPSCOTT, E. B.; COLEMAN, R. A. Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. E913–E921, 1999.
- NATHAN, D. M.; DAVIDSON, M. B.; DEFRONZO, R. A.; HEINE, R. J.; HENRY, R. R.; PRATLEY, R.; ZINMAN, B.; KAHN, R. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: Implications for care. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 753–759, 2007.
- PELLEYMOUNTER, M.; CULLEN, M.; BAKER, M.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 540–543, 28 jul. 1995.
- PORZIONATO, A.; RUCINSKI, M.; MACCHI, V.; STECCO, C.; CASTAGLIUOLO, I.; MALENDOWICZ, L. K.; CARO, R. De. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the rat and human carotid body. **Brain Research**, v. 1385, p. 56–67, 2011.
- ROMERO-ZERBO, S. Y.; RUZ-MALDONADO, I.; ESPINOSA-JIMENEZ, V.; RAFACHO, A.; GOMEZ-CONDE, A. I.; SANCHEZ-SALIDO, L.; COBO-VUILLEUMIER, N.; GAUTHIER, B. R.; TINAHONES, F. J.; PERSAUD, S. J.; BERMUDEZ-SILVA, F. J. The cannabinoid ligand LH-21 reduces anxiety and improves glucose handling in diet-induced obese pre-diabetic mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3946, 2017.
- SAAD, M. F.; DAMANI, S.; GINGERICH, R. L.; RIAD-GABRIEL, M. G.; KHAN, A.; BOYADJIAN, R.; JINAGOUDA, S. D.; EL-TAWIL, K.; RUDE, R. K.; KAMDAR, V. Sexual Dimorphism in Plasma Leptin Concentration\*. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 579–584, 1997.
- SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; CAMPFIELD, L. A.; BURN, P.; BASKIN, D. G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 5, p. 1101–1106, 1996.
- SIITERI, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. **The American journal of clinical nutrition**, v. 45, n. 1 Suppl, p. 277–82, jan. 1987.
- SINHA, M. K.; STURIS, J.; OHANNESIAN, J.; MAGOSIN, S.; STEPHENS, T.; HEIMAN, M. L.; POLONSKY, K. S.; CARO, J. F. Ultradian Oscillations of Leptin Secretion in Humans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, n. 3, p. 733–738, 21 nov. 1996.
- TARTAGLIA, L. a. The leptin receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6093–6, 7 mar. 1997.
- TARTAGLIA, L. a; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.;

RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. a; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E. a; MONROE, C. a; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263–71, 29 dez. 1995.

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. **Animal Care and Use Comittee. Species Specific Information: Mouse.** Disponível em: <<http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

THE WORLD HEALTH ORGANISATION. Media centre Obesity and overweight. p. 1–5, 2014.

TRIANAFYLLOU, G. A.; PASCHOU, S. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 633–45, set. 2016.

TU, H.; HSUCHOU, H.; KASTIN, A. J.; WU, X.; PAN, W. Unique leptin trafficking by a tailless receptor. **The FASEB journal**, v. 24, n. 7, p. 2281–91, jul. 2010.

TU, H.; KASTIN, A. J.; HSUCHOU, H.; PAN, W. Soluble receptor inhibits leptin transport. **Journal of cellular physiology**, v. 214, n. 2, p. 301–5, fev. 2008.

TU, H.; PAN, W.; FEUCHT, L.; KASTIN, A. J. Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa-ObRd. **Journal of cellular physiology**, v. 212, n. 1, p. 215–22, jul. 2007.

UOTANI, S.; BJØRBAEK, C.; TORNØE, J.; FLIER, J. S. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 279–86, fev. 1999.

VAN HECK, M.; COMPTON, D. S.; FRANCE, C. F.; TEDESCO, R. P.; FAWZI, a B.; GRAZIANO, M. P.; SYBERTZ, E. J.; STRADER, C. D.; DAVIS, H. R. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 3, p. 385–90, 1 fev. 1997.

VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; GRESPAN, R.; NAPIMOGA, M. H.; DAL-SECCO, D.; FREITAS, A.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SOUZA-JUNIOR, D. A.; JAMUR, M. C.; FERNANDES, K. S.; OLIVER, C.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 779–89, out. 2009.

WANG, M. Y.; ZHOU, Y. T.; NEWGARD, C. B.; UNGER, R. H. A novel leptin receptor isoform in rat. **FEBS letters**, v. 392, n. 2, p. 87–90, 26 ago. 1996.

YAU, S. W.; HENRY, B. A.; RUSSO, V. C.; MCCONELL, G. K.; CLARKE, I. J.; WERTHER, G. A.; SABIN, M. A. Leptin enhances insulin sensitivity by direct and sympathetic nervous system regulation of muscle IGFBP-2 expression: Evidence from nonrodent models. **Endocrinology**, v. 155, n. 6, p. 2133–2143, 2014.

YE, J. Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle. **Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets**, v. 7, n. 1, p. 65–74, mar. 2007.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of Medicine**, v. 7, n. 1, p. 14–24, 9 mar. 2013.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–32, 1 dez. 1994.

## 8. Anexos

## **ANEXO 1 - LISTA DE ARTIGOS**

**“Leptin mediates *in vivo* neutrophil migration: involvement of TNF-alpha and CXCL1/KC”**

Manuscrito em preparação.

**“Leptin modulates adipose tissue participation during starvation in a mouse model of obesity”**

Manuscrito em preparação.

**“Neutrophils are responsive to leptin effects *in vivo* in a mouse model of diet-induced obesity”**

Manuscrito em preparação.