

BRUNO DOS SANTOS

Efeito da ingestão de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, saturados e trans na quantidade de citocinas no fígado, tecidos adiposos branco e músculo esquelético de camundongos adultos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

SÃO PAULO
2013

BRUNO DOS SANTOS

Efeito da ingestão de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, saturados e trans na quantidade de citocinas no fígado, tecidos adiposos branco e músculo esquelético de camundongos adultos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

SÃO PAULO
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

BRUNO DOS SANTOS

Efeito da ingestão de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, saturados e trans na quantidade de citocinas no fígado, tecidos adiposos branco e músculo esquelético de camundongos adultos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Maria da Penha Oller do Nascimento

Co-orientador: Débora Estadella

**SÃO PAULO
2013**

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, N°2010/20079-2) e bolsa da CAPES.

Santos, Bruno dos.

. Bruno dos Santos – São Paulo, 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM).

Departamento de Fisiologia – Disciplina de Fisiologia da Nutrição.

Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Título em inglês: Effects of a diet enriched with polyunsaturated, saturated or trans fatty acids on cytokine content in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle of adult mice.

Dedico este trabalho à minha querida família, que sempre me apoiou nos momentos difíceis e se esforçou bravamente para eu chegar até aqui...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus!! Tenho certeza que graças a Ele tenho saúde, uma ótima família e pessoas maravilhosas que me apoiaram em todos os momentos.

Agradeço à minha mãezinha, Lia, por me ensinar a importância da busca pelo conhecimento, incentivar meus sonhos e tomá-los para si também. Puxar minha orelha e afagar-me em seu colo nas horas necessárias. Acima de tudo, tenho uma gratidão eterna pelo esforço realizado para eu chegar aqui.

Agradeço a meu pai, Tony, por me dar forças quando necessário, apoiar e incentivar essa trajetória. Obrigado principalmente por me ensinar valores e tornar-me um homem de verdade.

Agradeço de forma especial à minha orientadora, Cláudia Maria da Penha Oller do Nascimento, por me conceder a oportunidade de desenvolver este trabalho junto a ela. Agregou, não apenas coisas referentes ao trabalho, mas também valores que levarei para o resto da minha vida. Carinhosamente, acolheu um “estudante sonhador”, incentivando e acreditando em meu potencial, sendo mais que uma orientadora, uma grande amiga.

Agradeço à minhas co-orientadoras, Débora e Lila, por me orientar tanto na teoria quanto na prática. Acalmar minhas angústias quando tudo dava errado e parecia não ter mais solução.

De uma forma muito especial, sou grato à Ana Cláudia, Mayara, Marcos, Nelson e Valter. Pelas incontáveis risadas, puxões de orelha, amizade e acima de tudo cumplicidade. Sempre pude contar com eles para me colocarem para cima ou para baixo (risos). Mas o mais importante, é que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Esse grupo contribuiu de forma expressiva não apenas no desenvolvimento das minhas atividades dentro do Mestrado, mas no meu amadurecimento pessoal.

Agradeço à FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro ao projeto e a mim, respectivamente.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

"A ciência serve para nos dar uma idéia de
quão extensa é a nossa ignorância."
(Félicité Robert de Lamennais)

RESUMO

DOS SANTOS, B. **Efeito da ingestão de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, saturados e trans na quantidade de citocinas no fígado, tecidos adiposos branco e músculo esquelético de camundongos adultos.** 2013. 68 p. Dissertação (Grau de Mestre em Ciências da Saúde) Departamento de Fisiologia – Disciplina de Fisiologia da Nutrição. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

Objetivo: A proposta deste estudo foi avaliar como dietas enriquecidas com diferentes tipos de lipídeos podem influenciar na composição de gordura corporal, perfil lipídico, concentrações séricas de glicose, insulina e adiponectina e citocinas teciduais - TNF- α , IL-10 e IL-6.

Métodos: Camundongos machos suíços foram separados em quatro grupos: Controle (dieta normolipídica); Óleo de soja (dieta hiperlipídica contendo 30% de óleo de soja); Banha (dieta hiperlipídica contendo 28% de banha e 2% de óleo de soja); e Gordura vegetal hidrogenada (dieta hiperlipídica contendo 28% de gordura vegetal hidrogenada e 2% de óleo de soja) e receberam água e alimento *ad libitum*. O tratamento iniciou quando os animais completaram 30 dias de vida e teve a duração de oito semanas. Após este período os animais foram eutanasiados. O sangue e os tecidos foram retirados para a realização das análises séricas por método colorimétrico ou Imuno Ensaio, e das citocinas teciduais por Imuno Ensaio.

Resultados: Em nosso modelo experimental observamos que embora o conteúdo de gordura da carcaça nos grupos S e L foi mais elevado, o grupo L apresentou a maior soma dos depósitos adiposos, comparado ao grupo C. As dosagens séricas de ácidos graxos livres foram menores somente no grupo L, sendo que insulina, adiponectina, colesterol total, triacilgliceróis e glicose foram similares entre os grupos estudados quando comparado ao grupo controle. A quantidade de IL-10 foi menor no grupo L nos tecidos adiposos mesentérico e retroperitoneal, por sua vez, o tratamento com gordura vegetal hidrogenada (H) reduziu esta citocina apenas no tecido adiposo retroperitoneal. Adicionalmente, constatou-se aumento na dosagem de IL-6 apenas no músculo gastrocnêmio do grupo L. A análise de correlação entre TNF- α e IL-10 foi positiva no fígado dos grupos C, L e H, e no músculo de todos os grupos analisados.

Conclusão:

Os resultados deste estudo indicam uma relação entre quantidade e qualidade de lipídeos ingeridos com adiposidade corporal, concentração sérica de ácidos graxos livres e resposta inflamatória, em tecidos específicos. Adicionalmente, ressalta-se o efeito pró-inflamatório mais acentuado obtido com o uso de banha na dieta, o que apesar de alterar o conteúdo de citocinas teciduais, não modificou a homeostase do perfil lipídico e glicêmico dos animais, nesta fase da vida.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica, Óleo de soja, Banha, Gordura hidrogenada vegetal, Tecido adiposo branco; Citocinas, Obesidade.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate how different diets enriched with 30% lipids can influence the composition of body fat, lipid profiles, serum glucose, insulin and adiponectin, and the cytokines TNF- α , IL-10 and IL-6 in different tissues.

Methods: Fifteen-day-old Swiss male mice were acquired and given two weeks of acclimation with a standard chow diet. For the following eight weeks, the mice were distributed into four groups: control (C, normolipidic diet); soybean oil (S, hyperlipidic diet containing 30% soybean oil); lard (L, hyperlipidic diet containing 28% lard and 2% soybean oil); and hydrogenated vegetable fat (H, hyperlipidic diet containing 28% hydrogenated vegetable fat and 2% soybean oil). All groups received water and food *ad libitum* throughout the period. After this period, the animals were euthanized. Blood and adipose tissues (retroperitoneal, epididymal and mesenteric), gastrocnemius muscle and liver were removed for cytokine analyses by ELISA. The serum lipid profile and free fatty acid, glucose, insulin and adiponectin content were determined.

Results: observamos que embora o conteúdo de gordura da carcaça nos grupos S e L foi mais elevado, o grupo L apresentou a maior soma dos depósitos adiposos, comparado ao grupo C. In our experimental model, we observed that although the fat content of the carcass S and L groups was higher, the L group showed the highest amount of fat deposits, compared with C group. The serum levels of free fatty acids were lower in the L group, and insulin, adiponectin, total cholesterol, triacylglycerol and glucose levels were similar among the groups. The concentration of IL-10 was lower in group L in mesenteric and retroperitoneal adipose tissues. In turn, treatment with H reduced IL-10 only in retroperitoneal adipose tissue. Additionally, there was an increase in IL-6 only in the gastrocnemius muscle of the L group, and a positive correlation between TNF- α and IL-10 was observed in the livers of groups C, L and H and in the muscles of all groups studied.

Conclusion: The results of this study indicate relationships between the quantity and quality of lipids ingested with adiposity, the concentration of free fatty acids and cytokine production in white adipose tissue, gastrocnemius muscle and liver. In addition, despite the proinflammatory effect of the lard diet, the animals were able, at least in part, to maintain a serum lipid profile and glycemia that were positively correlated with TNF- α and IL-10.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Modelo casual da obesidade.....	16
FIGURA 2: Recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo.....	18
FIGURA 3: Balanço entre adipocinas na obesidade.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	= Ácidos Graxos Livres
AKT	= Proteína quinase B
AMPK	= Adenina monofosfato quinase
C/EBP α	= <i>CCAAT-Enhancer-Binding Proteins</i>
FFA	= Ácidos graxos livres
GLUT-4	= Transportador de Glicose 4
HIF-1	= Fator de transcrição induzível pela hipóxia
IL-1 β	= Interleucina 1 Beta
IL-6	= Interleucina 6
IL-10	= Interleucina 10
IMC	= Índice de Massa Corpórea
IR	= Receptor de Insulina
IRS	= Substrato do Receptor de Insulina
IKK	= Quinase I κ B
JNK	= quinase c-jun-N-terminal
JAK-2	= Janus Quinase 2
LPL	= Lipase Lipoprotéica
LPS	= Lipopolisacarídes
MCP-1	= Proteína quimiotática para monócitos
NF- κ B	= Fator Nuclear κ B
OMS	= Organização mundial de saúde
PAI-1	= Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1
PAMPs	= Padrões moleculares associados a patógenos
PERK	= <i>Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PPAR- γ	= <i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
PUFA	= Ácidos graxos poli-insaturados
PRRs	= <i>Pattern-recognition receptors</i>
RNA _m	= Acido Ribonucléico mensageiro
STAT	= <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAB	= Tecido Adiposo Branco
TAG	= Triacilglicerol
TLR 4	= Receptor <i>Toll like 4</i>
TNF- α	= Fator de Necrose Tumoral α

VEGF = Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL = Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO LITERÁRIA	16
2.1 Obesidade e inflamação	16
2.2 Adipocinas	19
2.3 Dieta Hiperlipídica	22
2.4 Obesidade e sistema imunológico	23
3 OBJETIVO	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivo Específico	26
4 METODOLOGIA	27
5 RESULTADOS	35
6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a obesidade é considerada como uma doença de origem multifatorial, regida por uma pré disposição genética, hábitos alimentares hipercalóricos e estilo de vida sedentário (Heredia *et al.*, 2012). A dieta ocidental contém aproximadamente de 30% a 40% de calorias em forma de gordura (Lottenberg, 2009). Tanto a quantidade como a qualidade dos lipídeos dietéticos exerce papel importante na composição do tecido adiposo, etiologia da obesidade e o surgimento de patologias relacionadas à obesidade, como diabetes e estados crônicos de inflamação. A obesidade é uma doença inflamatória de baixa intensidade, que tem como principal característica o aumento do tecido adiposo branco (TAB) com implicações expressivas sobre a saúde do indivíduo, decorrente de alterações relacionadas a um complexo sistema de regulação energética (Lenz & Diamond Jr., 2008).

O tecido adiposo branco é uma fonte significativa de hormônios e citocinas (conhecidas como adipocinas), tais como: Adiponectina, Leptina, fator de necrose tumoral α (TNF- α), Resistina, Interleucina 6 e 10 (IL-6 e IL-10), proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), angiotensinogênio, dentre outras, as quais estão envolvidas no desenvolvimento de doenças associadas à obesidade. (Hermsdorff; Monteiro, 2004).

A razão entre IL-10/TNF- α tem sido considerada um indicador importante do estado inflamatório, sendo que baixos valores estão associados com aumento no risco de morbidade e mortalidade (Kaur *et al.*, 2006; Leonidou *et al.*, 2007).

Inúmeros pesquisadores têm suas linhas de pesquisa direcionadas para o estabelecimento de uma ligação entre adipocinas relacionadas à inflamação e o desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade. Essa investigação engloba o *cross-talk* entre o TAB e outros tecidos, incluindo hepatócitos, músculo esquelético e córtex adrenal (Trayhurn *et al.*, 2008a).

Segundo Trayhurn e Wood (2004) a expansão adiposa durante a obesidade e o aumento volumétrico do adipócito acarreta hipóxia local, iniciando uma resposta inflamatória que induz a infiltração de macrófagos e o aumento na expressão gênica e

protéica de vários fatores relacionados à inflamação, tais como: TNF- α , IL-6, leptina, PAI-1 e IL-1 β e diminuição na adiponectina (Hosogai *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007).

O TNF- α e a IL-6 estão associados ao desenvolvimento da resistência à insulina e processos aterogênicos (Yanai *et al.*, 2008). Por outro lado, a IL-10, uma citocina secretada principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos, e a adiponectina, secretada por adipócitos, possuem propriedades anti-inflamatórias e de sensibilização à insulina por antagonizar IL-6 e TNF- α . A baixa produção de IL-10 e de adiponectina tem sido encontrada em associação com síndrome metabólica e diabetes melitus tipo 2 (Exel *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2004, Tsatsanis *et al.*, 2005).

O tratamento agudo (2 dias) ou crônico (16 semanas) com dieta hiperlipídica reduz a síntese de adiponectina pelos adipócitos, indicando que o perfil lipídico sérico e dos componentes lipídicos da dieta podem estar mais relacionados à diminuição da adiponectina do que a obesidade em si (Naderali *et al.*, 2003). Camundongos alimentados dieta enriquecida com Omega 3 (EPA/DHA), que são ácidos graxos poli-insaturados, demonstraram uma elevação plasmáticas nas concentrações de adiponectina, sem alteração na expressão gênica dessa citocinas dos adipócitos, quando comparados a camundongos alimentados com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA n-6) (Flachs *et al.*, 2006).

Vários estudos têm descrito em roedores que dietas hiperlipídicas e, em especial o tipo de gordura da dieta, podem desencadear obesidade e resistência à insulina (Hariri e Thibault, 2010; Hu *et al.*, 2001; Sacks e Katan, 2002).. Naderali e colaboradores (2003) e Bueno e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento agudo (dois dias) ou crônico (8 ou 16 semanas) com dieta hiperlipídica diminuiu a expressão gênica da adiponectina pelo tecido adiposo epididimal. Estes autores sugeriram que o perfil lipídico plasmático e dos constituintes lipídicos da dieta podem contribuir mais para a diminuição de adiponectina do que a obesidade *per se*.

Em homens adultos, também, foi descrito uma correlação positiva entre o aumento da gordura corporal, tanto com a maior quantidade de lipídeos na dieta, como também com a qualidade dos lipídeos consumidos, sendo que dietas ricas em ácidos graxos saturados e monoinsaturados desencadearam maior adiposidade corporal, comparadas às dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (Doucet *et al.*, 1998).

Deste modo, este trabalho buscou verificar como diferentes dietas enriquecidas com 30% de lipídeos podem influenciar na composição de gordura corporal, perfil lipídico, concentrações séricas de glicose, insulina e adiponectina e citocinas teciduais - TNF- α , IL-10 e IL-6.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Obesidade e Inflamação

Atualmente a obesidade é tida como uma doença multifatorial, regida por uma pré-disposição genética, hábitos alimentares hipercalóricos e estilo de vida sedentário (Figura 1). Esta doença tem como principal característica o aumento no conteúdo de gordura corporal armazenada, principalmente, no tecido adiposo branco (Balaban e Silva, 2004).

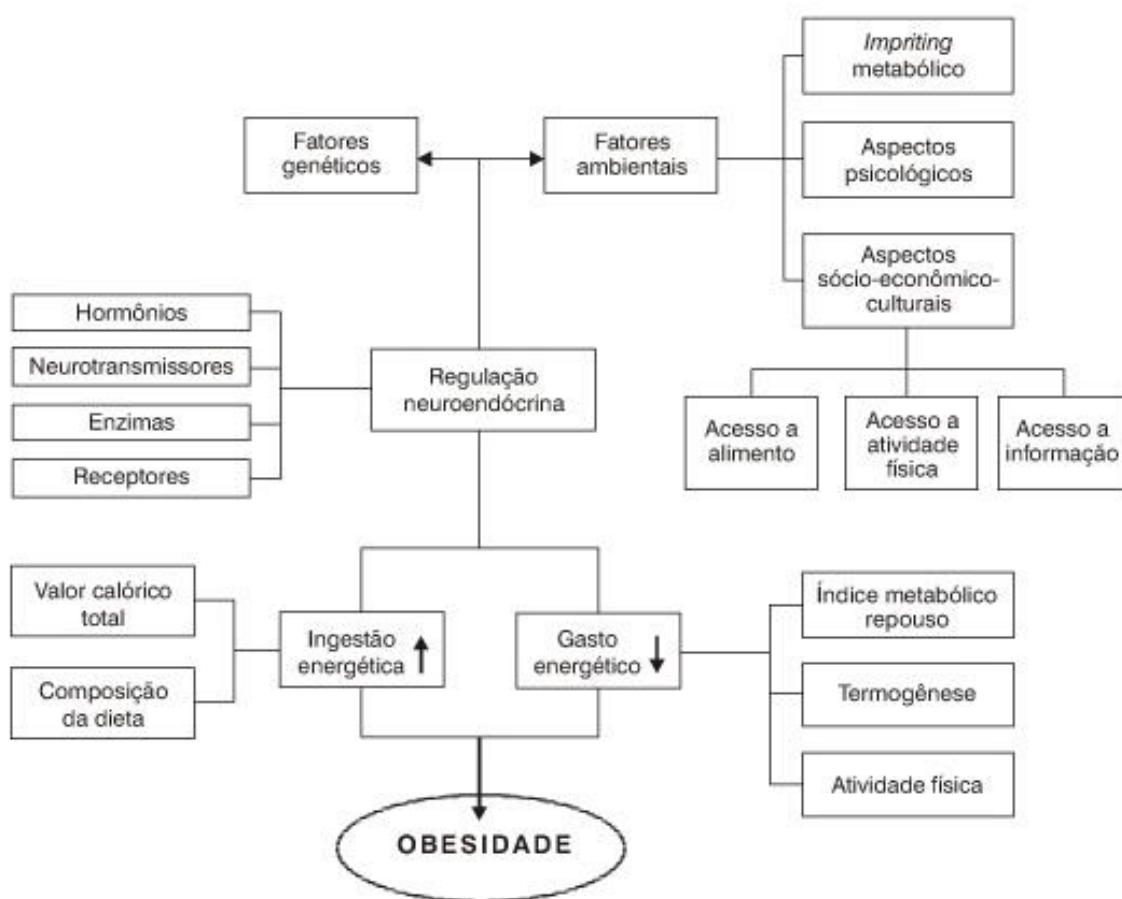


Figura 1: Modelo casual da obesidade (Balaban e Silva, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 cerca de 1,4 bilhões de indivíduos maiores de 20 anos de idade estavam com sobrepeso, mais de 500 milhões eram obesos e 40 milhões de crianças menores de 5 anos apresentaram

sobrepeso em 2010. Em 2015, é estimado que aproximadamente 2,3 bilhões de indivíduos adultos estejam com sobrepeso e 700 milhões sejam obesos (OMS, 2013). O indivíduo obeso tem predisposição a desenvolver uma série de outras doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não-alcoólica, dislipidemia, asma, doenças ortopédicas e determinados tipos de câncer (Estadella *et al.*, 2013) Assim, a obesidade e suas doenças relacionadas impõem elevados custos médicos e socioeconômicos ao sistema de saúde, além de provocar morbidade e mortalidade precoce aos indivíduos, principalmente através de doenças que afligem o sistema cardiovascular (OMS, 2002).

O tecido adiposo branco já bem conhecido como um grande órgão endócrino de sinalização. Ele secreta múltiplos hormônios e fatores, chamadas de adipocinas, tais como leptina (Zhang *et al.*, 1994), adiponectina (Scherer *et al.*, 1995), IL-6 (Mohamed-Ali *et al.*, 1997), IL-10 (de Waal Malefyt *et al.*, 1991), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Sartipy e Loskutoff, 2003) e TNF- α (Hotamisligil, *et al.*, 1993), dentre outros, que estão envolvidos em um extenso *cross-talk* entre o tecido adiposo branco, sistema nervoso central e outros tecidos periféricos. Muitas adipocinas estão ligadas à inflamação e imunidade, e estas incluem citocinas, quimiocinas e proteínas da fase aguda da inflamação (Fantuzzi, 2005).

Na obesidade, o tecido adiposo apresenta um importante aumento da resposta inflamatória devido à ampliação da produção de adipocinas relacionadas à inflamação. O que se aceita no meio científico é que a hipóxia é a causa subjacente da resposta inflamatória no tecido adiposo em obesos. Segundo Trayhurn e Wood (2004) a expansão adiposa durante a obesidade e o aumento volumétrico do adipócito faz com que a célula se distancie da vasculatura, acarretando a hipóxia local. Consequentemente inicia-se uma resposta inflamatória para promover o aumento do fluxo sanguíneo e estimular a angiogênese, produzindo o fator de transcrição induzível pela hipóxia (HIF-1) (Lolmède *et al.*, 2003). A expansão do tecido adiposo é acompanhada proporcionalmente pela infiltração de macrófagos e outras células, devido à liberação de moléculas que recrutam fagócitos e outros tipos celulares para o remodelamento tecidual (figura 2). Moléculas estas, oriundas de células necrosadas que morreram pela baixa tensão de O₂. Sendo assim, existe uma correlação positiva entre o grau de adiposidade e a quantidade de macrófagos infiltrados. Essa infiltração

ocorre preponderantemente no tecido adiposo visceral e está associada à indicadores de morbidade ligados à obesidade (Escribese *et al.*, 2012).

Diversos genes relacionados à resposta inflamatória foram avaliados no TAB de camundongos obesos e encontraram mudanças indicativas de uma resposta à hipóxia. Observou-se o aumento nas concentrações de mRNA de vários fatores relacionados à inflamação, tais como: TNF- α , IL-6, leptina, PAI-1 e IL-1 β (Hosogai *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em cultura de adipócitos e tecido adiposo de roedores (Miyazawa-Hoshimoto *et al.*, 2005) Em contraste houve diminuição na expressão de mRNA de adiponectina (Hosogai *et al.*, 2007).

O tecido adiposo de roedores e humanos obesos tem como característica um infiltrado de macrófagos, que atuam como uma fonte adicional de mediadores inflamatórios (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Cinti e colaboradores (2005) observaram em camundongos e humanos obesos, que os macrófagos se agrupavam ao redor de adipócitos, numa relação de 15/1 respectivamente. Essa agregação ocorria exclusivamente em torno de adipócitos necrosados. Verificou-se também, a formação de células gigantes multinucleadas nas imediações de gotículas lipídicas dos adipócitos que sofreram necrose, indicando que os macrófagos tenham função na limpeza de resíduos lipídicos.

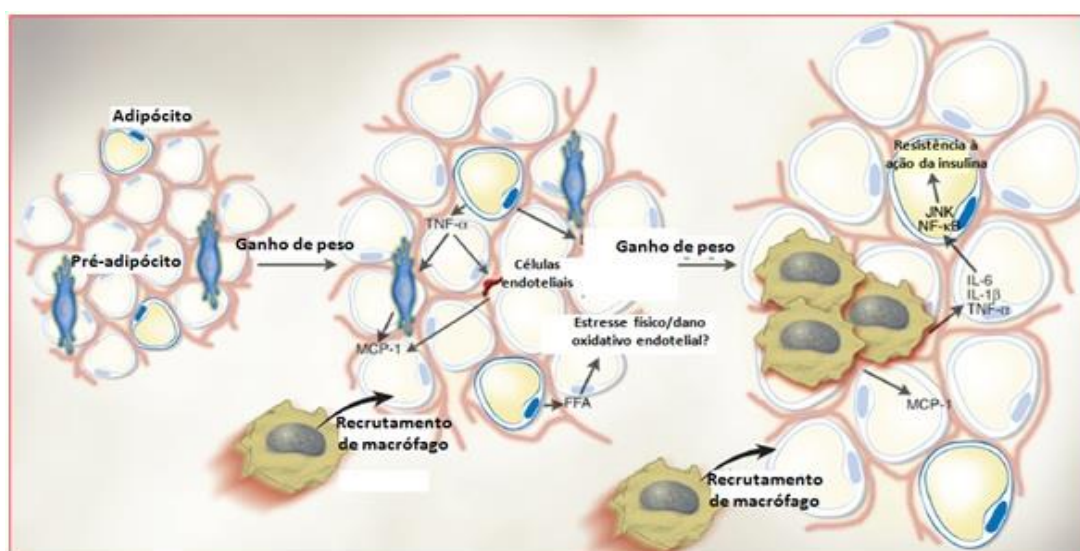


Figura 2: Recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo. Adaptado de Hotamisligil (2003)

2.2 Adipocinas

Na década de 90, estudos revelaram que indivíduos obesos, diabéticos tipos 2 e àqueles resistentes à insulina, apresentam um estado de inflamação crônica de baixo grau (Wellen e Hotamisligil, 2005). Em 1993, demonstraram que o TNF- α tinha sua síntese elevada no tecido adiposo de roedores obesos, com potencial para provocar a resistência insulínica (Hotamisligil, *et al.*, 1993; Feinstein *et al.*, 1993). Após essa descoberta, foi constatado que essa citocina também tem sua expressão aumentada no tecido adiposo e músculo de humanos (Kern *et al.*, 1995; Hotamisligil *et al.*, 1995).

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos em sua forma ativa. No tecido adiposo, há a produção TNF- α por adipócitos, mas a maior parte secretada dessa citocina é gerada pelas células do estroma vascular (Fain *et al.*, 2004), no fígado, essa citocina é produzida principalmente por células de Kupfer e células estreladas hepáticas e parcialmente por hepatócitos inflamados (Choi e Diehl, 2005; Arrar *et al.*, 2008). Existem receptores de TNF distribuídos em adipócitos, miócitos e hepatócitos (Wullaert *et al.*, 2006; Ryffel e Mihatsch, 1993; Han *et al.*, 2003). As concentrações de TNF- α estão elevadas na obesidade, acarretando resistência insulínica por meio do aumento de ácidos graxos livres no plasma, diminuindo a atividade da enzima Lipase Lipoproteica (LPL) no endotélio vascular, estimulando a lipólise e a fosforilação do Substrato do Receptor de Insulina (IRS) em serina/treonina (Ryden *et al.*, 2004). A ativação do IRS-1 em resíduos serina/treonina enfraquece a via de sinalização de IRS-1 por bloquear a fosforilação em resíduos tirosina e indicam que a JNK-1 é um mediador da resistência insulínica por fosforilar IRS-1 em serina (Yu, *et al.*, 2002). Também foi observado que em adipócitos humanos o TNF- α é capaz de causar a redução do mRNA e proteína transportadora de glicose (GLUT 4), deste modo, dificultando o transporte de glicose estimulado pela insulina (Hauer, *et al.*, 1995). Camundongos obesos que possuem TNF- α não funcional ou com ausência dos receptores desta citocina, apresentam melhora da sensibilidade à insulina, quando comparados ao grupo controle (Hotamisligil *et al.*, 1993).

O TNF- α por si só, é capaz de regular a expressão de outras adipocinas. Por exemplo, eleva a concentração sérica de leptina, tanto em roedores como humanos (Zumbach, *et al.*, 1997). Em adipócitos humanos aumenta a síntese de IL-6, PAI-1

(Wang *et al.*, 2005) e a expressão gênica de haptoglobina em adipócitos 3T3-L1 (Oller do Nascimento, *et al.*, 2004). É possível que o TNF- α seja um dos fatores reguladores da massa adiposa total, sendo que tem atividade lipolítica, estimula a apoptose em células adiposas maduras e possui efeito antiadipogênico, por meio da inibição do CCAAT-Enhancer-Binding Proteins (C/EBP α) e supressão da expressão de Receptor gama ativado pelo Proliferador de Peroxissoma (PPAR γ) (Hotamisligil, 2003).

A IL-6 é uma importante interleucina produzida por diversas células do organismo, onde se podem citar células do sistema imunitário, adipócitos e fibra muscular, dentre outros (Smith; Minson, 2012). Fonseca-Alaniz e colaboradores (2007) e Mihara e colaboradores (2012) relataram em suas respectivas revisões que hepatócitos, miócitos e adipócitos possuem receptores para esta interleucina. A IL-6 exerce efeito sobre o crescimento celular, resposta à fase aguda da inflamação, injúria tecidual, defesa do hospedeiro, além dos efeitos sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos (Mohamed-Ali *et al.*, 1998). As concentrações séricas dessa interleucina encontram-se aumentadas em indivíduos obesos e diabéticos, e tem correlação negativa com os níveis de adiponectina (Vozarova, *et al.*, 2001; Maury e Brichard, 2010), sendo que a IL-6 proveniente dos adipócitos corresponde a aproximadamente 30% nos indivíduos obesos e cerca de 90% da IL-6 sintetizada no tecido adiposo é oriundo das células do estroma vascular (Costa; Duarte, 2006; Bray *et al.*, 2009). Receptores de IL-6 foram identificados em cerca de 60% dos adipócitos subcutâneos, sugerindo que mecanismos autócrinos e parácrinos podem modular o metabolismo dessas células. A IL-6 proveniente dos adipócitos também tem ação endócrina, atingindo o hipotálamo e contribuindo para a regulação do balanço energético. Experimentos revelaram que promove a lipogênese hepática, gliconeogênese, oxidação da glicose, além de reduzir a atividade enzimática da LPL no tecido adiposo (Trayhurn e Wood, 2004; Berg e Scherer, 2005).

A síntese de IL-6 no tecido adiposo é estimulada, primordialmente, por catecolaminas, glicocorticoides e TNF α . (Fried; Bunkin; Greenberg, 1998). As concentrações séricas de IL-6 são proporcionais à massa de gordura corporal e resistência insulínica (Smith; Minson, 2012). A elevação nas concentrações de TNF- α e IL-6 no sangue, conforme observado na obesidade, pode desencadear um estado inflamatório no fígado quando estas citocinas entram na circulação portal, dessa forma

estimulas as células de Kupffer, que conseqüentemente sintetizará mais moléculas pro-inflamatórias, favorecendo o desenvolvimento da resistência insulínica. Adicionalmente, descobriu-se que há uma elevada produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β e ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) (Cai *et al.*, 2005).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, que controla processos inflamatórios por suprimir a produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , e bloquear a sinalização do IKK, Janus Quinase/ Transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT), bloqueando também a atividade de ligação do NF-KB ao DNA e diminui o estresse de retículo endoplasmático, conhecidamente ativados durante na obesidade (Schottelius *et al.*, 1999; Shkoda *et al.*, 2007). A IL-10 é produzida principalmente por monócitos, macrófagos, linfócitos, mastócitos e também por adipócitos maduros (Said *et al.*, 2009; Juge-Aubry *et al.*, 2005). Ropelle e colaboradores (2010) investigaram se a IL-10 era capaz de reduzir a ingestão energética em roedores, descobrindo que, a injeção intrahipotalâmica de IL-10 recombinante reduziu a ingestão alimentar de maneira dose-dependente em animais obesos. Ela foi capaz de diminuir a expressão de IKK β , *Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), a fosforilação da IRS-1 e aumentou a proteína serina/treonina quinase B (AKT) e a fosforilação de STAT-3 induzida pela leptina. Conseqüentemente, melhorando o quadro de resistência à insulina, observado na obesidade, sendo que a secreção de IL-10 pelo tecido adiposo é elevada tanto em humanos como em camundongos obesos (Juge-Aubry *et al.*, 2005).

Devido à ação anti-inflamatória da IL-10 por suprimir a expressão de citocinas pro-inflamatórias, a relação IL-10/TNF- α é utilizado como um indicador do estado inflamatório do indivíduo, considerando que os baixos valores estão relacionados a prognósticos ruins (Figura 3) (Kaur *et al.*, 2006; Leonidou *et al.*, 2007).

A adiponectina é uma proteína expressa principalmente por adipócitos, sendo a adipocina mais sintetizada pelo tecido adiposo branco. Sua produção é inversamente proporcional à quantidade de tecido adiposo, apresentando-se diminuídas em indivíduos obesos e/ou resistentes à insulina (Ouchi *et al.*, 1999).

A adiponectina possui propriedades anti-aterogênicas e anti-inflamatória, devido sua capacidade de inibir a adesão monocitária ao endotélio vascular, suprimir a

expressão de TNF- α nestas células e abolir a produção de moléculas de adesão nos macrófagos (Fantuzzi, 2005).

Além das suas propriedades anti-inflamatórias, a adiponectina tem ação sobre o balanço energético, através da estimulação da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo e músculo esquelético, redução da gliconeogênese hepática ativando a adenina monofosfato quinase (AMPK) (Yamauchi, 2002). Estudos demonstraram que as baixas concentrações séricas de adiponectina estão correlacionadas com hiperinsulinemia e resistência à insulina, ao passo que, a administração dessa adipocina exógena leva a melhora de ambos os quadros ((Naderali *et al.*, 2003; Costa e Duarte, 2006).

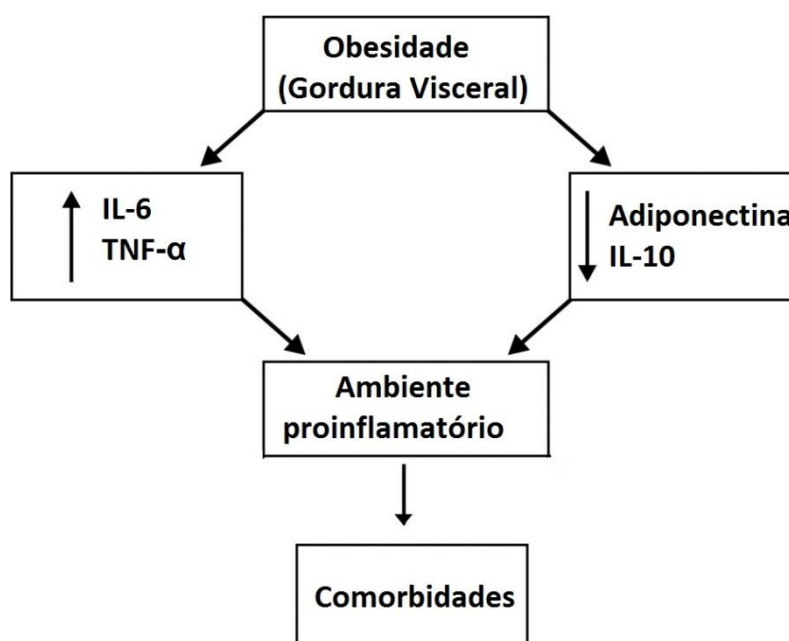


Figura 3 : Balanço entre adipocinas na obesidade

2.3 Dieta hiperlipídica

A ingestão de lipídeos através da dieta tem demonstrado ser responsável pelo aumento da adiposidade. Estudos com humanos mostraram que uma dieta que contenha alta concentração lipídica ($\geq 30\%$ de energia a partir da gordura) pode induzir

obesidade (Hill *et al.*, 2000; French e Robinson, 2003; Bray e Popkin, 1998). Esta similaridade é encontrada também em estudos com animais, tanto ratos como camundongos possuem uma relação positiva com a quantidade de gordura na dieta, ganho de peso e massa adiposa. Sendo que a uma dieta rica em carboidratos com baixas concentrações de gordura não é tão eficiente em levar ao quadro de obesidade do que dietas ricas em lipídeos (Buettner *et al.*, 2007; Warwick e Schiffman, 1992; Ghibaudi *et al.*, 2002).

Estudos realizados por nosso grupo tem demonstrado uma ligação entre dietas hiperlipídicas e os diferentes tipos de lipídeos presentes na dieta com alterações na expressão gênica, síntese e secreção de adipocinas relacionadas à obesidade e suas co-morbidades (Estadella *et al.*, 2004; Bueno *et al.*, 2008; Pisani *et al.*, 2008a e b; Bueno *et al.*, 2010).

A maior parte dos trabalhos associa, dentre outros tipos de lipídeos, os ácidos graxos saturados e trans a resistência à insulina e desenvolvimento de problemas cardiovasculares; e os ácidos graxos mono e poliinsaturados à redução da incidência destas doenças (Hu *et al.*, 2001; Sacks e Katan, 2002). Ao passo que, ácidos graxos trans diminuem a sensibilidade à insulina em roedores de forma mais intensa que os ácidos graxos saturados (Ibraim *et al.*, 2005).

Esses estudos revelam uma ligação entre as concentrações plasmáticas de lipídeos, doenças inflamatórias e imunidade. Sugerindo assim, que a expressão gênica e resposta celular mediada por toll like receptors (TLRs), podem ser influenciadas por diferentes tipos de lipídeos provenientes da dieta. Em especial, ácidos graxos saturados através da modulação diferencial da via do TLR-4 (Fortis, *et al.*, 2012).

2.4 Obesidade e sistema imunológico

O sistema imunológico em mamíferos é dividido em imunidade inata e adquirida. O sistema imunitário inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de agentes patológicos e é mediado por células fagocitárias, como macrófagos e células dendríticas. Cabe ao sistema imunitário adquirido eliminar de patógenos na fase tardia da infecção e gerar memória imunológica, tendo como

característica seu alto grau de especificidade. Já a inata, ao contrario do que se acreditava inicialmente, não é completamente inespecífica, mas tem a capacidade de diferenciar entre o que pertence ao organismo e outra diversidade de agentes patológicos (Aderem e Ulevitch, 2000, Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov e Janeway, 1997). A identificação de microorganismos pelo sistema imunitário adaptativo ocorre por meio de um número limitado de receptores, os *pattern-recognition receptors* (PRRs), que identificam componentes específicos dos patógenos. Estes receptores são capazes de diferenciar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), fundamentais para a sobrevivência do microorganismo, o que torna difícil a alteração pelo mesmo. Diferentes tipos de PRRs interagem com PAMPs específicos, possuem diferentes padrões de expressão, ativam vias de sinalização específicas, e provocam respostas distintas contra os patógenos (Dzopalic *et al.*, 2012; Kvarnhammar e Cardell, 2012).

Os TLRs são proteínas transmembranares responsáveis pela identificação de padrões específicos de constituintes microbianos que são mantidos entre os microorganismos, entretanto não estão presentes nos mamíferos. Até o momento foram identificados 12 tipos desse receptor nos mamíferos. Coletivamente, os TLRs tem a capacidade de reconhecer carboidratos, lipídeos, peptídeos e ácidos nucleicos expressos por grupos distintos de microorganismos. Dentre estes, o TLR-4 identifica LPS, fragmento da membrana celular de bactérias gram-negativas, proteínas de choque térmico, ácidos graxos saturados e fibrinogênio, dentre outros ligantes (Akira e Takeda, 2004; Takeda *et al.*, 2003). Ele é expresso na superfície de várias células, dentre elas adipócitos, macrófago, hepatócitos e miócitos (Vodovotz, *et al.*, 2001; Watari *et al.*, 2000; Fonseca-alaniz *et al.*, 2007). Após ser ativado o TLR-4 desencadeia uma cascata inflamatória, estimulando vias relacionadas à resistência à insulina, como c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) e Quinase β do inibidor do NF- κ B (IKK β), produção de TNF- α e outros fatores pró inflamatórios (Könner *et al.*, 2011).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ingestão de dieta rica em ácidos graxos saturados, poliinsaturados e trans sobre o desenvolvimento de obesidade e a quantidade de citocinas, TNF-alfa, IL-6 e IL-10 no fígado, tecidos adiposos branco e músculo esquelético de camundongos adultos.

3.2 Específicos:

Em camundongos alimentados com dieta controle e dieta rica em ácidos graxos saturado, trans e poliinsaturados, avaliamos:

- massa corporal;
- conteúdo de gordura da carcaça.
- No Fígado, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo branco retroperitoneal, epididimal e mesentérico:

Concentrações de TNF- α , IL-6, IL-10 por ELISA;

No soro foi determinado:

- as concentrações de insulina, ácidos graxos livres e adiponectina por ELISA;
- as concentrações de triacilglicerol, colesterol total e glicose por método colorimétrico.

4 METODOLOGIA

Condições experimentais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP (1644/10). Utilizamos camundongos suíços machos procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da UNIFESP.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição da UNIFESP em gaiolas coletivas (6 animais por gaiola) sob condições controladas de luz (escuro das 18 às 6 horas), temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e livre acesso ao alimento e à água.

Grupos experimentais

Os animais, com 30 dias de vida, foram divididos em 4 grupos em função da dieta que receberam até a idade de 3 meses:

- Grupo Controle (C): AIN 93G (até 60 dias) e AIN 93M (de 60-90 dias);
- Grupo Óleo de soja (S) – receberam dieta hiperlipídica contendo 30% de óleo de soja;
- Grupo Saturada (L) - dietas hiperlipídica contendo 28% de banha e 2% de óleo de soja;
- Grupo gordura vegetal hidrogenada (H) - dietas hiperlipídica contendo 28% de gordura vegetal hidrogenada e 2% de óleo de soja;

As dietas foram preparadas tendo como base a AIN 93G (até 60 dias) e AIN93 M (de 60-90 dias).

Dietas

Preparação

As dietas foram elaboradas no laboratório e sua composição seguiu as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN-93) (Reeves, 1997), sendo preparada de acordo com a demanda de consumo e o período de tratamento do grupo experimental. A ração AIN-93 compôs a base para a elaboração das dietas hiperlipídicas, sendo modificada conforme tabelas 1 e 2. Após o preparo, a mistura foi homogeneizada e acrescentou-se água (quando necessário) até a obtenção de consistência necessária para formação de *pellets*, sendo armazenadas a - 20° C e ofertada aos animais em temperatura ambiente.

Tabela 1- Composição das dietas (g/Kg) – AIN-93 M

Ingredientes	Controle	PUFA	SATURADO	TRANS
Amido	629(720)	399(460)	399(460)	399(460)
Óleo de soja	70(40)	20	20	20
Lipídeo de acordo com a dieta	---	280	280	280
Caseína	200(140)	200(140)	200(140)	200(140)
L-cistina	3(1.8)	3(1.8)	3(1.8)	3(1.8)
Celulose	50	50	50	50
Mistura de minerais	35	35	35	35
Mistura de vitaminas	10	10	10	10
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
BHT(antioxidante)	0.014(0.008)	0.014(0.008)	0.014(0.008)	0.014(0.008)

* O primeiro número se refere à dieta de crescimento (AIN-93G) e o número entre parênteses à dieta de manutenção (AIN-93M) quando a composição difere da dieta de crescimento.

Tabela 2- Mistura de Minerais – AIN-93

Ingredientes	g/100g
Carbonato de Cálcio anidro	35,7
Fosfato de Potássio monobásico	25
Citrato de Potássio monohidratado	2,8
Cloreto de Sódio	7,4
Sulfato de Potássio	4,66
Óxido de Magnésio	2,4
Citrato Férrico	0,606
Carbonato de Zinco	0,165
Carbonato de Manganês	0,063
Carbonato Cúprico	0,03
Iodato de Potássio	0,001
Selenato de Sódio	0,001025
Paramobilidato de Amônio 4H ₂ O	0,000795
Metassilicato de Sódio 9H ₂ O	0,145
Sulfato de Cromo e Potássio 12H ₂ O	0,0275
Cloreto de Lítio	0,00174
Ácido Bórico	0,00815
Fluoreto de Sódio	0.0635
Carbonato de Níquel	0,00318
Vanádio Amônio	0,00066
Sacarose, farelo fino	20,9806

Tabela 3- Mistura de vitaminas para AIN-93

Ingredientes	g/100g
Niacina	0,30
Pantotenato de Cálcio	0,16
Piridoxina HCL	0,07
Tiamina HCL	0,06
Riboflavina	0,06
Ácido Fólico	0,02
Biotina	0,002
Vitamina E Acetato (500 IU/g)	1,5
Vitamina B12 (0,1%)	0,25
Vitamina A Palmitato (500,00 IU/g)	0,018
Vitamina D3 (400.000 IU/g)	0,025
Vitamina K1/Dextrose (10mg/g)	0,75
Sacarose	96,72

As dietas hiperlipídicas tiveram parte do amido substituído por lipídeos de acordo com a dieta, além de reduzir para 20g/Kg de ração a quantidade de óleo de soja, garantindo assim a quantidade mínima de ácidos graxos essenciais. Os demais ingredientes da dieta não apresentaram alterações quantitativas quando comparados ao grupo controle.

Extração de gordura da carcaça

As carcaças dos animais foram esviceradas, pesadas e estocadas a -20°C até a realização do experimento. O teor total de lipídeos foi extraído conforme descrito por Stansbie e colaboradores (1976) e quantificado por meio do método gravimétrico (Oller do Nascimento & Willianson, 1986).

As carcaças foram autoclavadas Por 90 minutos a 120°C e acrescentou-se o dobro do peso em água para homogeneização. 2 gramas por triplicatas foram pesadas em balança analítica e digeridas em tubos de vidro fechados com 3 ml de 30% KOH a 70°C por 15 min e posteriormente acrescentou-se 3 ml de etanol absoluto por mais duas horas. 2 ml 12N H₂SO₄ foi adicionado após resfriamento e os tubos foram homogenizados. A seguir, a mistura foi lavada 3 vezes por 10 minutos com éter de petróleo e centrifugada à 1.000 rpm. O sobrenadante, contendo lipídeos totais diluídos no éter de petróleo, foi transferido para tubos de vidro pesados previamente em balança analítica. Os tubos foram colocados em capela de exaustão à temperatura ambiente e, após evaporação total, os fracos foram pesados novamente para obtenção do peso do conteúdo de gordura da carcaça. Os resultados foram expressos em g de lipídeo/100g de carcaça.

Massa dos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal, mesentérico, fígado e músculo gastrocnêmico.

Aos 3 meses de idade, os animais foram eutanasiados por decapitação e os tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal, mesentérico e músculo gastrocnêmico foram removidos bilateralmente, juntamente com o fígado, sendo rapidamente dissecados, pesados e armazenados a -80°C. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa corporal.

Dosagens séricas

Aos 3 meses de idade e jejum de 12 horas, os animais foram decapitados e o sangue foi coletado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4° C. O soro foi separado e aliquotado, permanecendo estocado a - 80° C até a realização das dosagens.

Glicemia

A concentração de glicose no soro foi determinada por método enzimático, utilizando kit comercial com limite de detecção de 0,41 mg/dL (Glicose Pap Liquiform, Labtest Diagnóstica). Foram pipetados 2 μ L de amostra do soro de cada animal e 200 μ L de reagente que contem glicose oxidase e peroxidase. A glicose oxidase age sobre a glicose presente no soro produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. A peroxidase atuando no peróxido de hidrogênio proporciona a formação de composto de cor avermelhada. As placas de microensaio foram incubadas a 37°C durante 15 minutos, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Epoch - Biotek) a 505 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram dosados através de método colorimétrico, utilizando kit comercial (Triglicérides Liquiform, Labtest Diagnóstica). Esse método utiliza a lipase lipoproteica para hidrolisar os triacilgliceróis, sendo que o glicerol liberado é fosforilado pela ação da enzima glicerol quinase. O glicerol fosfato obtido da reação é oxidado pela enzima glicerol-3-fosfato oxidase acarretando a liberação de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. A água oxigenada sofre ação da peroxidase (reação oxidativa), reagindo posteriormente com os compostos 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, criando a quinoneimina (vermelha) cuja intensidade da cor vermelha originada é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra. Realizamos microensaio com amostras de 2 μ L de soro e 200 μ L de reagente. Após incubação de 10 minutos a 37°C, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Epoch - Biotek) utilizando-se um comprimento de onda de 505nm (nanômetros). Os valores da trigliceridemia foram demonstrados em miligramas por decilitro (mg/dL).

Colesterol Total

Determinamos o colesterol total através de método colorimétrico, utilizando kit comercial (Colesterol Liquiform, Labtest Diagnóstica). Esse método é fundamentado na formação de colesterol e ácidos graxos a partir da enzima colesterol esterase. O colesterol proveniente sofre ação da enzima colesterol oxidase, sendo oxidado e forma Colest-4-en-ona e água oxigenada. Através da peroxidase, ocorre uma reação oxidativa, o peróxido reage com os compostos 4-aminoantipirina e fenol, formando a antipirilquinonimina (vermelha) e água cuja intensidade da cor vermelha criada é diretamente proporcional à concentração de colesterol. Realizamos microensaio com amostras de 2 μ L de soro e 200 μ L do reagente em questão. Após incubação durante 10 minutos a 37°C, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Epoch - Biotek) utilizando um comprimento de onda de 505nm (nanômetros).

Imuno Ensaio

Preparo das amostras

Foram retirados cerca de 0,3g de amostra dos tecidos coletados após a eutanásia dos animais, adicionou-se 1 mL de tampão para a homogenização e extração protéica (EDTA 10 mM, Trisma base 100 mM pH 7,5, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM, Aprotinina 2 μ g/mL).

Em seguida, foram acrescentadas de 100 μ L de Triton X-100 10% às amostras, sendo imersas durante 30 minutos em gelo picado. Passado esse tempo, centrifugou-se as amostras (14000 rpm por 40 minutos a 4 °C) e o sobrenadante foi retirado (400 μ L). Por conseguinte, a concentração proteica da amostra foi dosada pelo Método de Bradford (Biorad), de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras foram quantificadas de acordo com as recomendações do kit, sendo dosados IL-6, IL-10 e TNF- α nos tecidos adiposos mesentérico, retroperitoneal e epididimal, fígado e músculo. Insulina, adiponectina e ácidos graxos foram mensurados no soro dos animais. Os resultados foram expressos em pg/ μ g de proteína.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Comparações entre os grupos (Controle, PUFA, Saturado e TRANS), foram utilizadas análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para o cálculo de correlação foi utilizado a Correlação Linear Simples. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS:

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de um trabalho científico:

Effects of a diet enriched with polyunsaturated, saturated or trans fatty acids on cytokine content in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle of adult mice.

Bruno dos Santos¹, Debora Estadella¹, Ana Cláudia Losinskas Hachul¹, Marcos Hiromu Okuda¹, Mayara Franzoi Moreno¹, Lila Missae Oyama¹, Eliane Beraldi Ribeiro¹, Claudia Maria da Penha Oller do Nascimento¹.

¹ Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM)

Corresponding author:

Claudia Maria Oller do Nascimento

Postal Code: 04020-050

Phone: (5511) 5572-0177 / Fax: (5511) 55720177

E-mail: claudia.oller@unifesp.br

Source of funding

FAPESP (Nº2010/20079-2) and CAPES.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate how different diets enriched with 30% lipids can influence the composition of body fat, lipid profiles, serum glucose, insulin and adiponectin, and the cytokines TNF- α , IL-10 and IL-6 in different tissues.

Methods: Fifteen-day-old Swiss male mice were acquired and given two weeks of acclimation with a standard chow diet. For the following eight weeks, the mice were distributed into four groups: control (C, normolipidic diet); soybean oil (S, hyperlipidic diet containing 30% soybean oil); lard (L, hyperlipidic diet containing 28% lard and 2% soybean oil); and hydrogenated vegetable fat (H, hyperlipidic diet containing 28% hydrogenated vegetable fat and 2% soybean oil). All groups received water and food *ad libitum* throughout the period. After this period, the animals were euthanized. Blood and adipose tissues (retroperitoneal, epididymal and mesenteric), gastrocnemius muscle and liver were removed for cytokine analyses by ELISA. The serum lipid profile and free fatty acid, glucose, insulin and adiponectin content were determined.

Results: In our experimental model, we observed an increase in carcass fat in groups S and L, and the total amount of fatty deposits was only higher in group L compared with group C. The serum levels of free fatty acids were lower in the L group, and insulin, adiponectin, total cholesterol, triacylglycerol and glucose levels were similar among the groups. The concentration of IL-10 was lower in group L in mesenteric and retroperitoneal adipose tissues. In turn, treatment with H reduced IL-10 only in retroperitoneal adipose tissue. Additionally, there was an increase in IL-6 only in the gastrocnemius muscle of the L group, and a positive correlation between TNF- α and IL-10 was observed in the livers of groups C, L and H and in the muscles of all groups studied.

Conclusion: The results of this study indicate relationships between the quantity and quality of lipids ingested with adiposity, the concentration of free fatty acids and cytokine production in white adipose tissue, gastrocnemius muscle and liver. In addition, despite the proinflammatory effect of the lard diet, the animals were able, at least in part, to maintain a serum lipid profile and glycemia that were positively correlated with TNF- α and IL-10.

Introduction

Epidemiological studies reveal that approximately 2.3 billion adults will be overweight and 700 million will be obese in 2015 (WHO, 2013). Obesity is a chronic subclinical inflammatory disease of multifactorial etiology, involving the ingestion of a high-calorie diet, a sedentary lifestyle and genetic predisposition (Heredia *et al.*, 2012). The establishment of the disease can lead to the development of correlated morbidities such as diabetes mellitus type 2, cardiovascular disease, and metabolic syndrome, among others, as a consequence of the imbalance of a complex system of energy balance (Estadella *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2012).

The enlargement of adipocytes and the expansion of adipose tissue lead to local hypoxia and macrophage infiltration, causing an inflammatory response. In turn, the response changes the patterns of protein and gene expression of various bioactive molecules, called adipokines, produced by adipose tissue (Trayhurn e Wood, 2004).

Adipokines are a group of proteins synthesized by white adipose tissue that act on the immune, cardiovascular, metabolic and endocrine systems. Examples include TNF- α , leptin, adiponectin, resistin, IL-6, and IL-10 (Hermsdorff; Monteiro, 2004; Balistreri *et al.*, 2010). In obese individuals, the expression of proinflammatory adipokines by adipose tissues is normally increased (Ibrahim, 2009).

TNF- α and IL-6 are involved in the development of insulin resistance and atherogenic processes (Yanai *et al.*, 2008). However, IL-10, a cytokine secreted primarily by monocytes/macrophages and lymphocytes, as well as adiponectin, secreted by adipocytes, possess anti-inflammatory and insulin-sensitizing properties by antagonizing IL-6 and TNF- α . Low concentrations of IL-10 and adiponectin have been associated with metabolic syndrome and diabetes mellitus type 2 (Exel *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2004, Tsatsanis *et al.*, 2005). The IL-10/TNF- α ratio has been considered an important indicator of inflammatory status, and low values are associated with an increased risk of morbidity and mortality (Kaur *et al.*, 2006; Leonidou *et al.*, 2007).

The lipid composition of the diet has a strong relationship with the development and persistence of obesity (Lenz Jr. & Diamond, 2008). Acute (2 days) or chronic (16 weeks) treatment with a high-fat diet reduces the synthesis of adiponectin, suggesting that the serum lipid profile and lipid components of the diet are more related to the decrease of adiponectin than to obesity itself (Naderali *et al.*, 2003). In adult males, a positive correlation between body fat and the quantity or quality of lipids consumed has been described, and diets high in saturated and monounsaturated fatty acids induced greater adiposity compared with diets rich in polyunsaturated fatty acids (Doucet *et al.*, 1998).

Studies by our group have shown a link between a high-fat diet and different types of lipids in the diet with changes in gene expression, the synthesis and secretion of adipokines and obesity-related co-morbidities (Estadella *et al.*, 2004; Bueno *et al.*, 2008; Pisani *et al.*, 2008a and b; Bueno *et al.*, 2010).

Thus, the aim of this study was to investigate the effects of high-fat diets enriched with lard, soybean oil or hydrogenated vegetable oil (30% lipids, w/w) on body fat content, lipid profiles, serum glucose, insulin and adiponectin concentrations and the tissue cytokines TNF- α , IL-10 and IL-6.

Materials and methods

Animals and diet protocol

The Experimental Research Committee of the São Paulo Federal University approved all procedures for the care of the animals used in this study (protocol CEP n°1644/10). Thirty-day-old male Swiss mice were used in this study and were kept under controlled conditions (12 h light: 12 h dark cycle at 22°C ± 1°C). During the experimental period, the animals were housed six per cage, receiving water and a specific diet *ad libitum*. The animals were assigned to four groups according to their specific diet and treated for eight weeks as follows: 1) C (control group; the animals were treated for eight weeks with a standard AIN diet (American Institute of Nutrition)); 2) S (soybean oil group); 3) L (lard group); and 4) H (hydrogenated vegetable oil group). The animals' weights were evaluated weekly.

All diets were prepared according to the recommendations of the AIN (Reeves, 1997) and were normoproteic. All groups received a growth diet (AIN-93G) containing 20% protein and at least 7% essential fatty acids between the 30th and 60th day of life and a maintenance diet (AIN-93M) containing 14% protein and 2% soybean oil to provide the essential fatty acids between the 60th and 90th days of life. The compositions of the control, soybean, lard and hydrogenated vegetable oil diets are described in Table 1.

Table 1 – Composition of the control (C), soybean (S), lard (L) and hydrogenated vegetable oil (H) diets prepared according to AIN-93

Ingredient	Diet (g/1000g)			
	C	S	L	H
Cornstarch	629(720)	399(460)	399(460)	399(460)
Soybean Oil	70(40)	20	20	20
Especific lipid	---	280	280	280
Casein	200(140)	200(140)	200(140)	200(140)
L-Cystine	3(1.8)	3(1.8)	3(1.8)	3(1.8)
Cellulose	50	50	50	50
Mineral mixture *	35	35	35	35
Vitamin mixture **	10	10	10	10
Bitartrate Choline	2,5	2,5	2,5	2,5
Butylhydroquinone	014(0.008)	0.014(0.008)	0.014(0.008)	0.014(0.008)

The first number refers to the growth diet (AIN-93G) and the number in parentheses refers to the maintenance diet (AIN-93M) when its composition differed from that of the growth diet.

* *Mineral mix* provided (mg/kg) calcium 5000, phosphorus 1561, potassium 3600, sodium 1019, chloride 1571, sulfur 300, magnesium 507, iron 35, copper 6.0, manganese 10.0, zinc 30.0, chromium 1.0, iodine 0.2, selenium 0.15, fluoride 1.00, boron 0.50, molybdenum 0.15, silicon 5.0, nickel 0.5, lithium 0.1, vanadium 0.1

** *Vitamin mix* (mg/kg diet) provided thiamin HCL 6.0, riboflavin 6.0, pyridoxine HCL 7.0, niacin 30.0, calcium pantothenate 16.0, folic acid 2.0, biotin 0.2, vitamin B12 25.0, vitamin A palmitate 4000 IU, vitamin E acetate 75, vitamin D3 1000 IU, vitamin KI 0.75.

Experimental Procedure

The animals were euthanized by decapitation on the 90th day of life in the fasting state (8 h) in the early morning to avoid chronobiological variations. Trunk blood was collected and immediately centrifuged at 4°C, and serum aliquots were taken and frozen at -80°C to measure the concentrations of glucose, triacylglycerols, and total cholesterol using commercial kits from Labtest Diagnostic SA (Minas Gerais, Brazil) and the concentrations of free fatty acids, insulin and adiponectin using ELISA (Linco Research, Inc., USA). The retroperitoneal (RET), epididymal (EPI) and mesenteric (MES) adipose tissues, gastrocnemius muscle (GAST) and liver were dissected and weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the extraction of protein. The carcasses were weighed and stored for further lipid content determination.

Carcass lipid content determination

The carcasses were eviscerated, weighed and stored at -20°C. The lipid content was measured as described by Stansbie *et al.* and standardized using the method described by Oller do Nascimento and Williamson. Briefly, an eviscerated carcass was autoclaved at 120°C for 90 min and then homogenized with double its mass of water. Triplicate aliquots of this homogenate were weighed and digested in 3 ml of 30% KOH and 3 ml of ethanol for at least 2 h at 70°C in capped tubes. After cooling, 2 ml of 12 N H₂SO₄ was added, and the sample was washed three times with petroleum ether for lipid extraction. The results are expressed as grams of lipid/100 g of carcass.

Protein determination and ELISA assay

Adipose tissue depots, gastrocnemius muscles and livers (0.25 – 0.3 g) were homogenized in ice-cold solubilization and total protein extraction buffer (100 mM Tris, pH 7.5, 10 mM ethylene acetic acid, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.1 mg/ml aprotinin). After homogenization, Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. Samples rested on ice for 30 min and were clarified by centrifugation. Homogenates were centrifuged at 14000 × g for 40 min at 4°C, the supernatants were saved, and the protein concentrations were determined using a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California) with bovine serum albumin as a reference. Quantitative assessment of IL-6, IL-10 and TNF- α was carried out using ELISA. The results are expressed as pg/ μ g of protein.

Data analysis

The results are expressed as the means \pm SEM. For multiple comparisons of means, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with subsequent use of the Tukey post-hoc test. Simple linear regression analysis was used to evaluate the correlation between cytokines (IL-10 and TNF- α). Statistical significance was set at P <0.05.

Results

Body weight, carcass lipid content, and biochemical and hormonal serum analysis

Body mass, white adipose tissue depots (EPI, RET and MES), liver and GAST weights were similar among all groups. However, the S and L diets promoted a significant increase in carcass relative lipid content compared with group C. In addition, this parameter in group H was lower than in group S (Table 2).

Exposure to the L diet after weaning caused an approximately 28% increase in the sum of the adipose tissue depots compared with the control group.

The levels of serum glucose, triacylglycerols, total cholesterol, insulin and adiponectin did not differ among the studied groups. Nevertheless, the L diet caused a decrease in the serum concentrations of free fatty acids (Table 3).

Tissue cytokine content

TNF- α levels did not change in any group or tissue studied compared with the control group (Figure 1A).

However, the L diet caused a decrease in IL-10 levels in MES and RET white adipose tissue depots, and the H diet promoted a similar effect in the RET depot (Figure 1B). Furthermore, the IL-6 content was elevated in mice that ingested the diet containing saturated fatty acids (L) (Figure 1C). In group H, the IL-10/TNF- α ratio was higher in MES adipose tissue compared with groups S and L (Figure 1D).

We ran correlation tests for IL-10 and TNF- α and found the following to be positively correlated: group C, retroperitoneal fat depot, liver and gastrocnemius muscle; group S, epididymal and mesenteric fat depots and gastrocnemius muscle; and group L, liver and gastrocnemius muscle. In group H, only mesenteric fat tissue did not correlate.

Discussion

The ingestion of high-fat diets for 8 weeks did not modify body or tissue weight. Similar results were observed by others with eight or seven weeks of high-fat diet treatment (Bueno *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2013, Rustan *et al.*, 1993). However, other studies have reported an increase in body weight after 16 weeks of high-fat diet treatment (Naderali *et al.*, 2003, Noeman *et al.*, 2011). As stated by Noeman *et al.*, (2011), the high-fat diet effect is subtle but cumulative, needing at least 10 weeks to increase body weight. These results suggest that the difference in weight gain in the above studies may be due to the period of treatment.

Despite the fact that the carcass lipid content in groups S and L was higher than in group C, this parameter was similar between groups C and H. The oxygen consumption after a meal was significantly lower in rats fed a lard diet than in rats fed a safflower oil or linseed oil diet (Takeuchi *et al.*, 1995). In this sense, Dube *et al.*, (2002) demonstrated that the ingestion of a hyperlipidic diet, enriched with lard, caused a decrease in the mRNA expression of UCP-1 in brown adipose tissue. Furthermore, the energy cost of lipid deposition from dietary fat is lower than from dietary carbohydrate (Oudart *et al.*, 1997). Gaiva *et al.*, (2001) demonstrated that enrichment of the diet with polyunsaturated fatty acids caused changes in adipose tissue metabolism, such as the increased uptake of diet-derived lipids favoring fat deposition. Machado *et al.*, (2010) reported that mice fed with a trans fat-enriched diet for 16 weeks showed a reduction in subcutaneous and epididymal fat pads, suggesting an effect on the stimulation of lipolysis. Taken together, these reports suggest that the effects on fat accumulation depend on the type and source of lipids present in the diet and could be related to the effects on energy expenditure and adipose tissue metabolism, such as lipoprotein lipase activity, lipogenesis and lipolytic enzyme activities.

The diet intervention did not alter the concentrations of serum glucose, triacylglycerol, total cholesterol, adiponectin or insulin. Previous studies have demonstrated no effect of high-fat diets on the serum adiponectin concentration (de Oliveira *et al.*, 2011; Barnea *et al.*, 2006). However, a time-dependent effect of a high-fat diet on the adiponectin serum concentration has been shown; 10 weeks of treatment increased and 18 weeks of treatment reduced the serum adiponectin concentration compared with the initial experimental period (Bullen *et al.*, 2007), suggesting a

compensatory mechanism to maintain metabolic homeostasis, as this adipokine is associated with the maintenance of carbohydrate and lipid metabolism and also acts to improve insulin sensitivity (Tschrittef *et al.*, 2003, Prins, 2002; Xu *et al.*, 2003; Berg and Scherer, 2005; Bueno *et al.*, 2008; Yamane *et al.*, 2011). In fact, in our study, 8 weeks of a high-fat diet treatment did not modify serum glucose, triacylglycerol, total cholesterol, or adiponectin and insulin concentrations, in spite of the increasing adiposity in groups L and S.

Another possible explanation related to the similar serum lipid profile among the groups is the decrease in the carbohydrate content of the high-fat diets. The review from Volek *et al.*, (2005) reported that the serum total cholesterol level remained unchanged from baseline values while both the HDL and LDL cholesterol levels increased and the TAG levels dramatically decreased under a high-fat diet compared with high-carbohydrate diets.

In the current study, the lard diet caused a decrease in the serum free fatty acid concentration in relation to the control diet. The plasma free fatty acids resulted from hydrolyzed triacylglycerol in chylomicrons and VLDL by lipoprotein lipase activity and lipolysis in adipose tissue. One important mechanism for the removal of unesterified plasma fatty acids is through oxidation of these fatty acids in skeletal muscle and the heart (Mittendorfer, 2011). Several studies have demonstrated that IL-6 can increase fatty acid oxidation in myocytes (Bruce e Dyck, 2004; Carey *et al.*, 2006) and “in vivo” (Van Hall *et al.*, 2003). When we analyzed the IL-6 content in gastrocnemius muscle, we verified an increase in group L compared with group C, which could partially explain the reduction in serum fatty acids in lard-treated animals.

Nutrients such as the fatty acids in special saturated fatty acids can activate intracellular pathways through TLR2 and TLR4, leading to increased pro-inflammatory gene transcription (Caricilli *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2009). In this sense, we analyzed the TNF- α , IL-6 and IL-10 concentrations in RET, EPI, MES, gastrocnemius muscle and liver. The TNF- α content was similar among groups in all tissues studied. The literature is controversial about the effects of a high-fat diet on TNF- α expression. A similar result was observed by Flanagan *et al.*, (2008), who showed that TNF- α gene expression in muscle was not significantly affected by the amount or type of dietary fat.

Hong et al (2009) showed that 10-week-old mice treated with a high-fat diet (55% fat by calories) for 3 weeks had lower IL-10 levels in muscle than control mice, accompanied by a decrease in muscle insulin sensitivity. Furthermore, IL-10 treatment prevents muscle insulin resistance by decreasing obesity-associated macrophages and cytokines in muscle from high-fat diet-treated mice. In the present study, the IL-10 gastrocnemius muscle content did not change in treated mice between 30 and 90 days of life with high-fat diets. However, the lard diet caused a decrease in IL-10 in MES and RET, and the same result was observed in RET from group H without any change in glycemia or insulin plasma concentration, suggesting that the type of diet, age of the animal, and time of treatment could have different effects depending on the tissues evaluated. In addition, we cannot dismiss the possibility that metabolic processes adapt to changes in dietary components during a specific period of life.

The IL-6 level in gastrocnemius muscle increased in group L compared with group C. The role of IL-6 action in obesity-associated insulin resistance remains highly controversial; Wunderlich et al (2010) showed that mice with a hepatic deficiency of IL-6 receptor α (IL-6Ra) develop insulin resistance not only in the liver but also in skeletal muscle and WAT. In addition, the IL-6 level increases with exercise, a situation in which glucose uptake by muscles is high (Pedersen *et al.*, 2004). However, it has been demonstrated that IL-6 administration causes hepatic insulin resistance (Klover *et al.*, 2003).

It is interesting to note that, in the present study, the lard diet, which promoted a decrease in IL-10 in adipose tissue depots, caused an increase in IL-6 in gastrocnemius muscle. From these results, it is possible to suggest that the whole body of an adult animal tries to maintain carbohydrate and lipid metabolism homeostasis by modifying the expression and secretion of cytokines. In fact, by analyzing the ratio between IL-10 and TNF- α , which is used as an indicator of the inflammatory condition of the individual (where lower values are associated with a poor prognosis) (Kaur *et al.*, 2006; Leonidou *et al.*, 2007), we verified a similar result among groups in all tissues studied. In addition, a positive correlation between TNF- α and IL-10 was observed in the liver (groups C, L and H) and muscle (all studied groups) (figure 2), which could contribute to the maintenance of glucose, insulin and lipid profiles at normal values.

REFERENCES

- BALISTRERI, C.R.; CARUSO, C.; CANDORE, G.. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators. Inflamm.** v. 2010, p. 1-19, 2010.
- BARNEA, M.; SHAMAY, A.; STARK, A.H.; MADAR, Z. A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. **Obesity.** v. 14(12), p. 2145-53, 2006
- BERG, A.H.; SCHERER, P. E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 96, p. 939-945, 2005.
- BRUCE, C.R.; DYCK, D.J. Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**; v.287(4), p.E616–2, 2004.
- BUENO, A.A.; HABITANTE, C.A.; OYAMA, L.M.; et al. White adipose tissue re-growth after partial lipectomy in high fat diet induced obese Wistar rats. **J. Physiol. Sci.** v. 61(01), p. 55-63, 2010.
- BUENO, A.A.; OYAMA, L.M.; DE OLIVEIRA, C. et al. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. **Pflugers Arch.** v. 455(4), p. 701-709, 2008.
- BULLEN, J. W.; BLUHER,S.; KELESIDIS, T. et al. Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 292, p. E1079–E1086, 2007.
- CAREY, A.L.; STEINBERG, G.R.; MACAULAY, S.L.; et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. **Diabetes.** v.55(10), p. 2688–97, 2006.
- CARICILLI, A. M.; NASCIMENTO, P. H.; PAULI, J. R. et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. **J. Endocrinol.** v. 199, p. 399–406, 2008.
- CUNHA, C.A.; LIRA, F.S.; ROSA NETO, J.C. et al. Green tea extract supplementation induces the lipolytic pathway, attenuates obesity, and reduces low-grade inflammation in mice fed a high-fat diet. **Mediators. Inflamm.** 2013:635470, 2013.
- DE OLIVEIRA, C.; IWANAGA-CARVALHO, C.; MOTA, J.F. et al. Effects of adrenal hormones on the expression of adiponectin and adiponectin receptors in adipose tissue, muscle and liver. **Steroids.** v. 76(12), p.g. 1260-7, 2011.
- DOUCET, E.; ALMÉRAS, N.; WHITE, M.D. et al. Dietary fat composition and human adiposity. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 52(1), p.2-6, 1998.

DUBE, M.G.; BERETTA, E.; DHILLON, H.; UENO, N.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. Central leptin gene therapy blocks high-fat diet-induced weight gain, hyperleptinemia, and hyperinsulinemia: increase in serum ghrelin levels. **Diabetes**, v. 51(6), p.1729–1736, 2002.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; GIUGLIANO, F. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 88(3), p.1055-8, 2003.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DAMASO, A.R. et al. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Nutrition**, v.20(2), p. 218-24, 2004.

ESTADELLA, D.; OLLER DO NASCIMENTO, M.P.; OYAMA, L.M. et al.; Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids. **Mediators of Inflammation** ID 137579, 13 pages – 2013

EXEL, V.; GUSSEKLOO, E. J.; CRAEN, A. J., et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: The Leiden 85-Plu Study. **Diabetes**, v. 51, p. 1088, 2002.

FLANAGAN, A.M.; BROWN, J.L.; SANTIAGO, C.A. et al. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. **J. Nutr. Biochem.** v. 19(8), p.505-13, 2008.

GAÍVA, M.H.; COUTO, R.C.; OYAMA, L.M. et al. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **Br. J. Nutr.** v. 86(3), p.371-7, 2001.

HEREDIA, F.P.; GOMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and immune system. **Proc. Nutr. Soc.** v. 71(2), p. 332-8, 2012.

HERMSDORFF, H. H.M.; MONTEIRO, J. B.R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 48, p.803-811, 2004.

HILL, J.O.; WYATT, H.R.; PETERS, J.C. Energy balance and obesity. **Circulation.** v.126(1), p.126-32, 2012.

HONG, E.G.; KO, H.J.; CHO, Y.R. et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**. v.58(11), p.2525-35, 2009.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity**, v. 11, p. 11-18, 2009

KAUR, K.; SHARMA, A.K.; DHINGRA, S.; SINGAL, P.K. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 41, p. 1023–1030, 2006.

KLOVER, P.J.; ZIMMERS, T.A.; KONIARIS, L.G.; MOONEY, R.A. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. **Diabetes**. v. 52(11), p. 2784-9, 2003.

LENZ, A.; DIAMOND JR, F.B. Obesity: the hormonal milieu. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes**. v. 15, p. 9-20, 2008.

LEONIDOU, L.; MOUZAKI, A.; MICHALAKI, M.; et al. Cytokine production and hospital mortality in patients with sepsis induced stress hyperglycemia. **J. Infect**. v. 55, p. 340–346, 2007.

MACHADO, R.M.; STEFANO, J.T.; OLIVEIRA, C.P. et al. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. **J. Nutr**. v. 140(6), p.1127-32, 2010.

MITTENDORFER, B. Origins of metabolic complications in obesity: adipose tissue and free fatty acid trafficking. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. v. 14(06), p. 535-41, 2011.

MORAES, J. C.; COOPE, A.; MORARI, J. et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **PLoS One**. v. 4(4), p. e5045, 2009.

NADERALI, E.K.; ESTADELLA, D.; ROCHA, M. et al. A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. **Clin. Sci**. v. 105(4), p. 403-8. 2003.

NOEMAN, S.A.; HAMOODA, H.E.; BAALASH, A.A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetol Metab Syndr**. v. 3;3(1), p.17, 2011.

LOUDART, H., GROSCOLAS, R.; CALGARI, C. et al Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord**. v. 21(11), p.955-62, 1997.

PEDERSEN, B.K.; STEENSBERG, A.; FISCHER, C. et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? **Proc. Nutr. Soc**. v.63(2), p.263-7, 2004.

PISANI, L.P.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M.; BUENO, A.A.; et al. Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. **Lipids Health Dis**. v.4;7, p. 13, 2008a.

PISANI, L.P.; OYAMA, L.M.; BUENO, A.A.; et al. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. **Nutrition**. v. 24(3), p. 255-61, 2008b.

PRINS, J.B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**. v.16(4), p.639-51, 2002.

RUSTAN, A.C; HUSTVEDT, B.E; DREVON, C.A. Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat. **J. Lipid. Res.** v.34(8), p. 1299-309, 1993.

TAKEUCHI, H. MATSUO, T. TOKUYAMA, K. SHIMOMURA, Y. SUZUKI, M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. **J Nutr.** v. 125(4), p.920-5, 1995.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr.** v. 92(3), p.347-55, 2004.

TSATSANIS, C. et al. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 335(4) p. 1254-63, 2005.

VAN HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACCHETTI, M. et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.88(7), p. 3005–10, 2003.

VOLEK, J.S.; SHARMAN, M.J.; FORSYTHE, C.E. Modification of lipoproteins by very low-carbohydrate diets. **J. Nutr.** v. 135, p. 1399–1342, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em 5 de jan. 2013.

WUNDERLICH, F.T.; STRÖHLE, P.; KÖNNER, A.C. et al. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. **Cell Metab.** v. 2(3), p.237-49, 2010.

XU A.; WANG, Y.; KESHAW, H. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 112(1), p. 91-100, 2003.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest.** v. 112, p.1821-1830, 2003.

YAMANE, T.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; OISHI, Y.. A high-fat diet reduces ceramide synthesis by decreasing adiponectin levels and decreases lipid content by modulating HMG-CoA reductase and CPT-1 mRNA expression in the skin. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 55, p. S186–S192, 2011.

YANAI, H.; TOMONO, Y.; ITO, K.; FURUTANI, N.; YOSHIDA, H.; TADA, N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. **Nutrition Journal**, v. 7, p. 10-17, 2008.

Tables and Figures

Table 2 – Body Mass (g), carcass relative lipid content (g/100g), sum of adipose tissue depots (g/100g) and tissue weight (g/100g) of studied mice groups - (C) control group, (S) Soybean, (L) Lard and (H) Hydrogenated vegetable fat groups.

Variables	Groups			
	C	S	L	H
Weight (g)				
Initial	22.09±1.08	22.36±0.93	22.87±0.52	22.08±0.51
Final	48.17±1.83	51.31±1.92	52.55±2.18	51.70±2.18
Carcass relative lipid content	21.82±0.85	31.59±2.18*	30.28±3.57*	22.02±1.95 ⁺
EPI	3.70±0.25	4.23±0.20	4.69±0.29	4.43±0.29
RET	0.94±0.05	1.22±0.08	1.21±0.12	0.94±0.06
MES	2.01±0.19	2.41±0.25	2.45±0.21	2.28±0.24
Sum of adipose tissue depots	6.53±0.42	7.87±0.35	8.35±0.49*	7.66±0.45
Liver	3.62±0.12	3.76±0.33	3.66±0.15	3.69±0.14
GAST	0.60±0.06	0.56±0.06	0.56±0.05	0.54±0.04

All results are presented as means ± standard error of the mean (n = 9).

* Values significantly different from (C) group at p< 0.05

+ Values significantly different from (S) group at p< 0.05

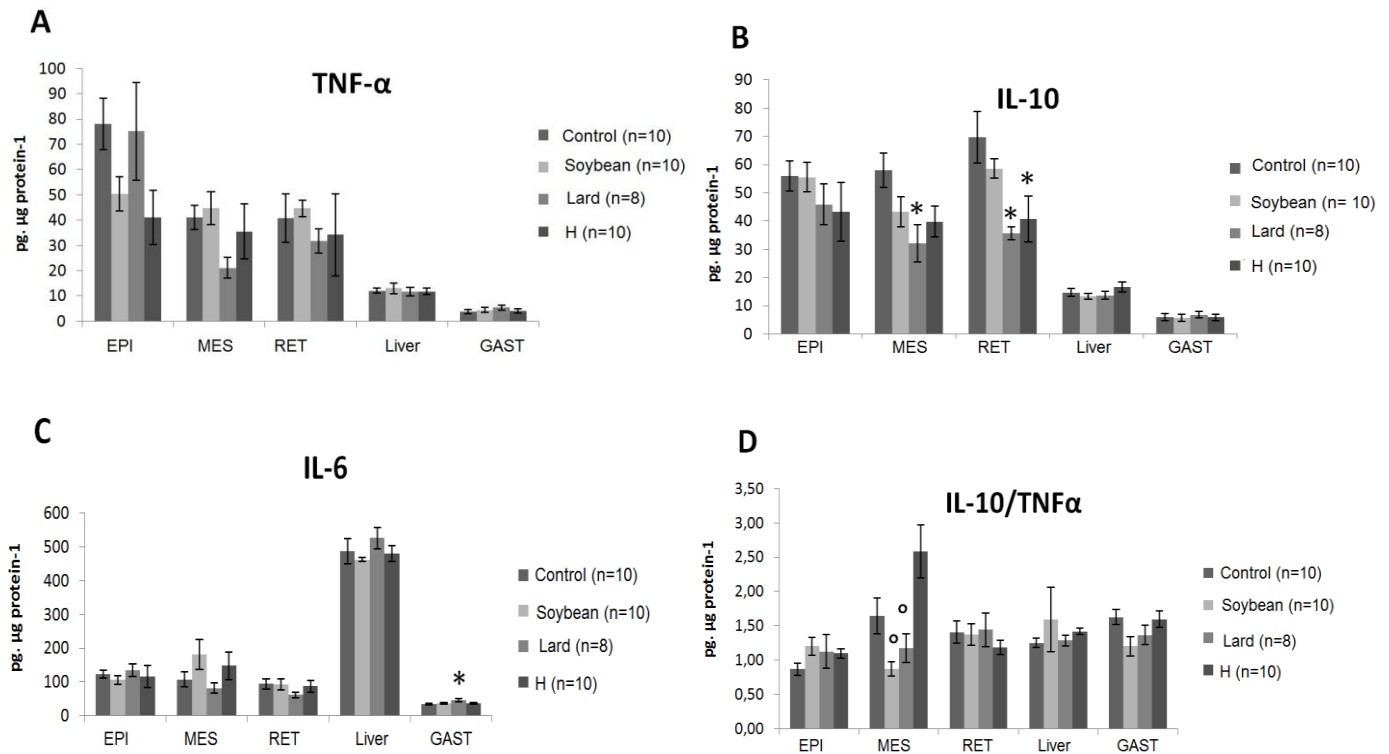
Table 3 - Serum triacylglycerols, total cholesterol, free fat acids, insulin, adiponectin and glucose of studied mice groups - (C) control group, (S) Soybean, (L) Lard and (H) Hydrogenated vegetable fat groups.

Variables	Groups			
	C	S	L	H
Triacylglycerols (mg/dl)	182±7.88	165±7.67	158±5.54	168±5.12
Total cholesterol (mg/dl)	158±7.09	147±5.38	143±4.79	160±15.66
Free fat acids (µM)	2.80±0.16	2.26±0.13	1.77±0.24*	2.15±0.25
Insulin (ng/ml)	1.60±0.33	1.45±0.13	0.93±0.18	2.02±0.38
Adiponectin (µg/ml)	3.46±0.28	4.14±0.25	3.17±0.39	3.45±0.39
Glucose (mg/dl)	120±7.68	130±11.14	125±13.44	120±10.52

All results are presented as means ± standard error of the mean (n=8)

* Values significantly different from (C) group at p< 0.05

Figure 1 – Cytokines levels (IL-6 (pg/ug protein⁻¹) in adipose tissue depots, liver and gastrocnemius muscle of studied mice groups - (C) control group, (S) Soybean, (L) Lard and (H) Hydrogenated vegetable fat groups. A) Tumoral Necrosis Factor alpha (TNF- α), B) interleukin-10 (IL-10), C) interleukin-6 (IL-6), D) IL-10/TNF- α ratio.

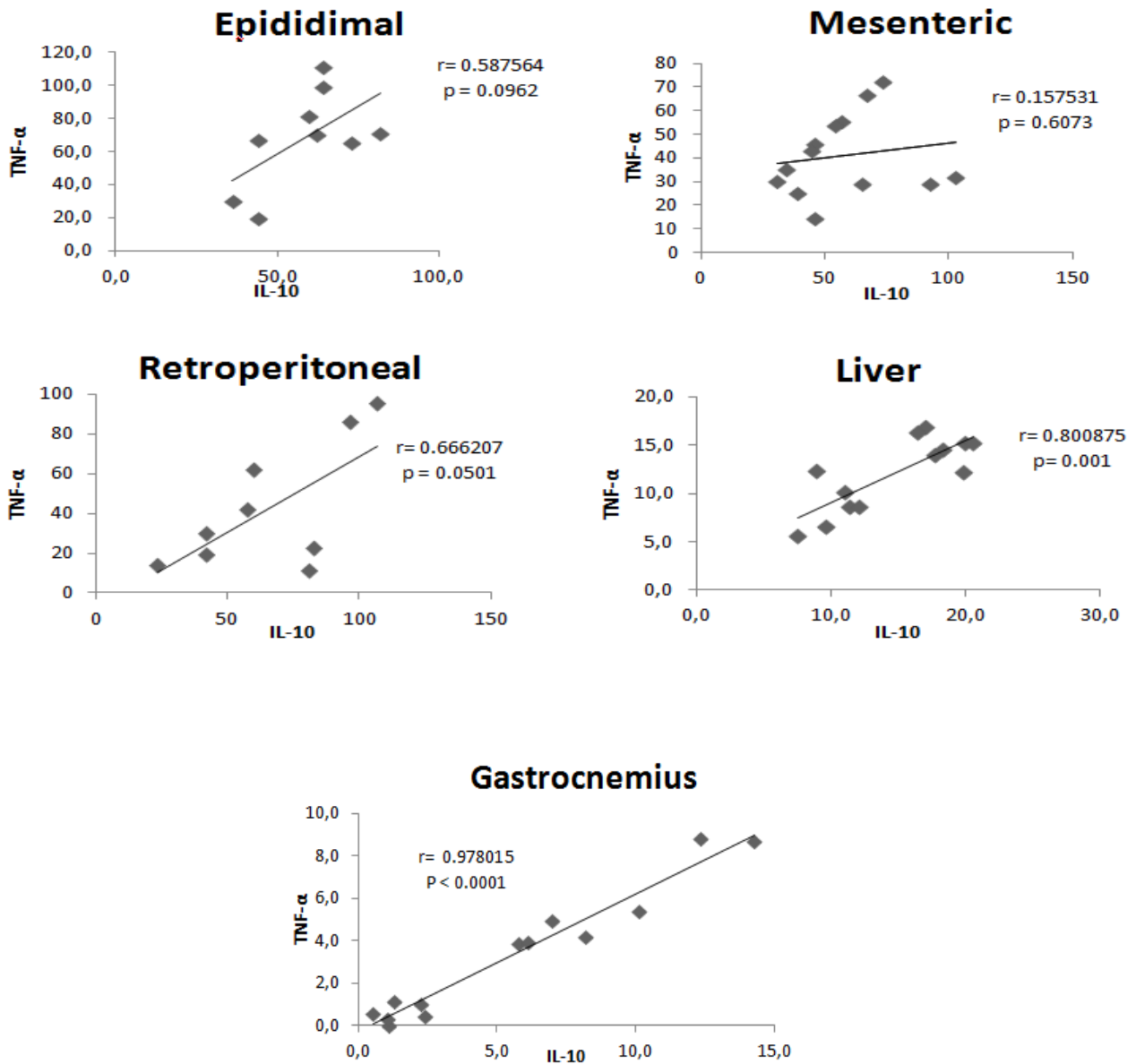


* Values significantly different from (C) group at $p < 0.05$

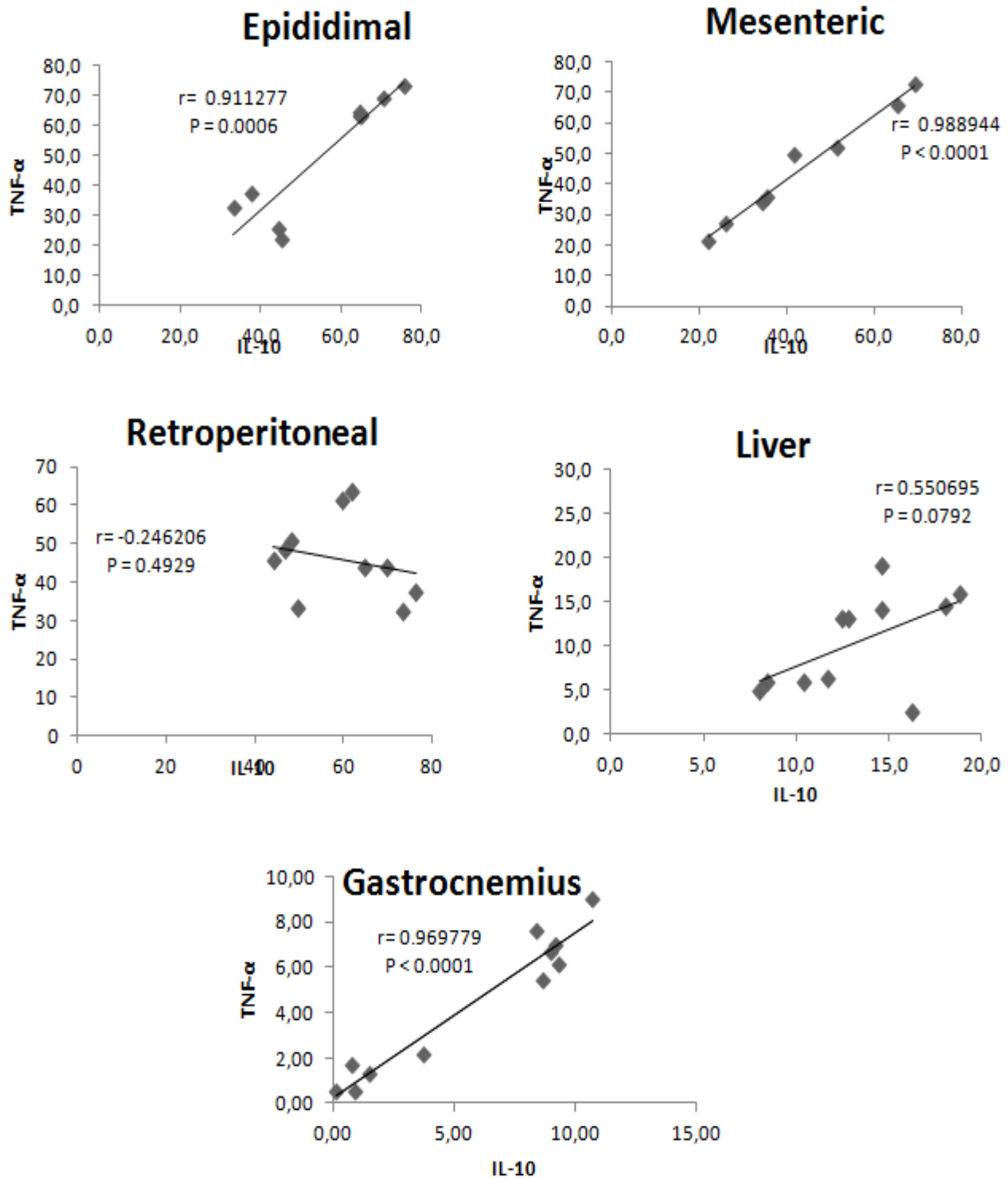
° Values significantly different from (H) group at $p < 0.05$

Figure 2 – Correlation between cytokines (IL-10 and TNF- α) in adipose tissue depots, liver and gastrocnemius muscle of studied mice groups - (C) control group, (S) Soybean, (L) Lard and (H) Hydrogenated vegetable fat groups. (n=9)

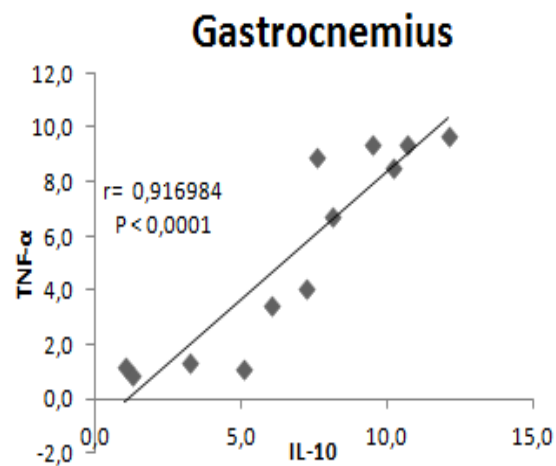
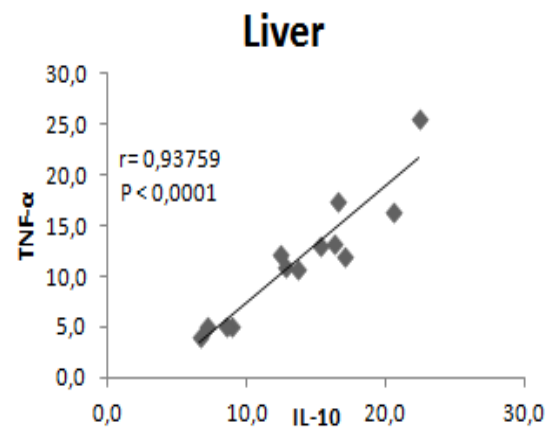
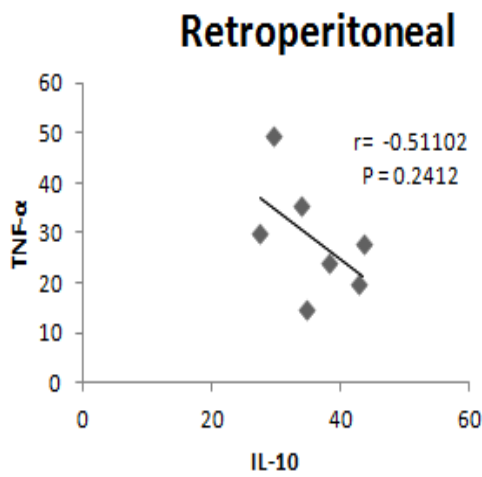
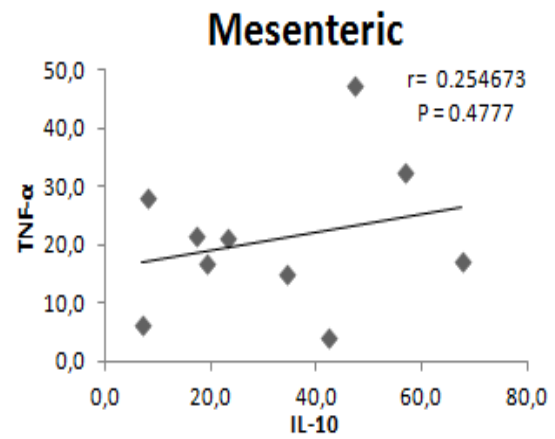
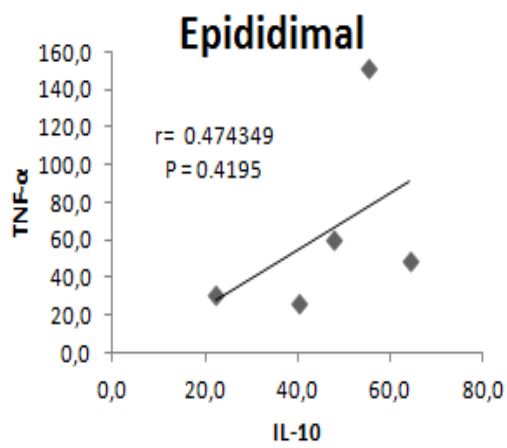
A) Control



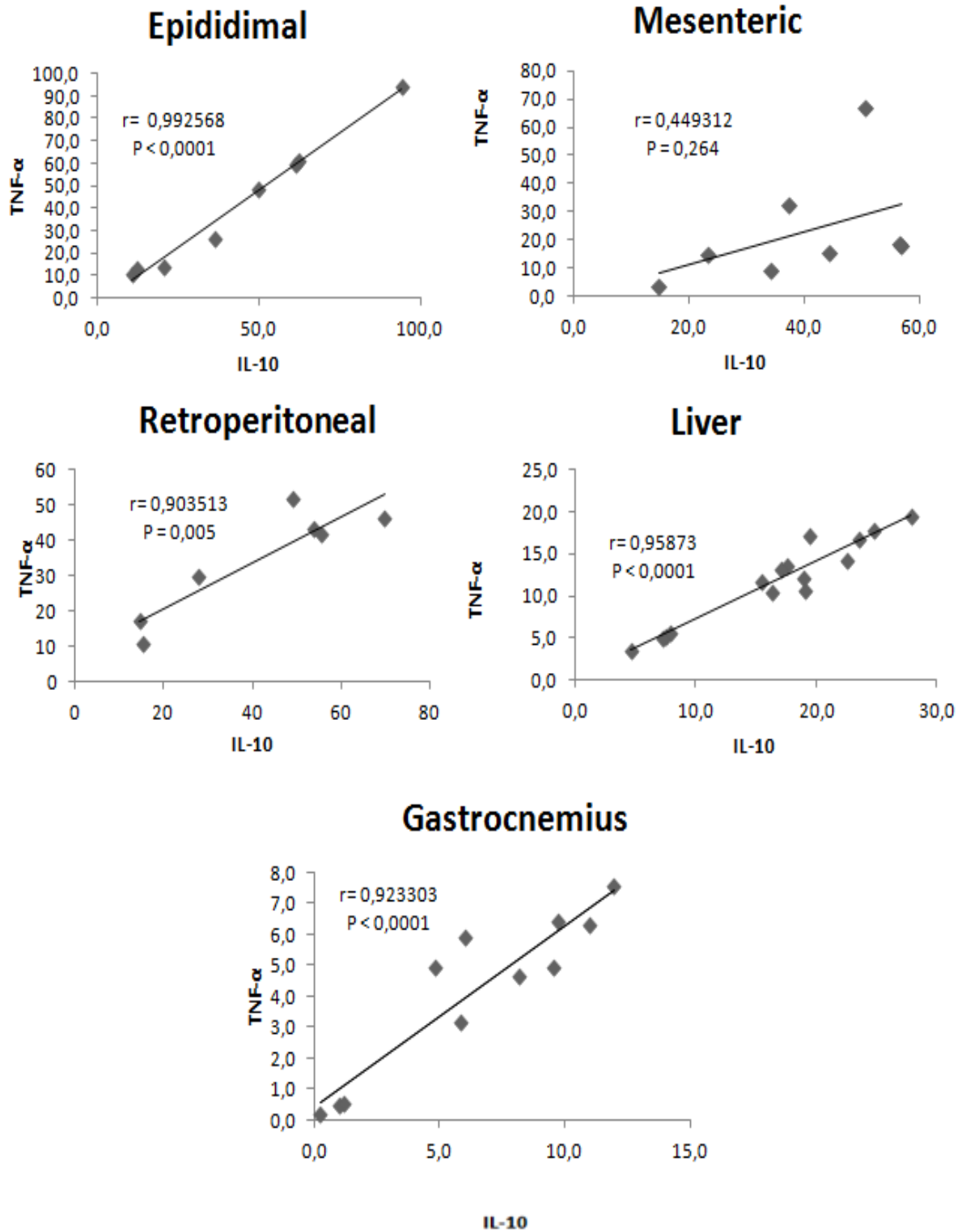
B) Soybean



c) Lard



D) Hydrogenated vegetable fat



6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

O tratamento com dietas enriquecidas com lipídeos distintos durante oito semanas apresentou os seguintes resultados:

- Não houve alteração no ganho de peso corporal e massa dos tecidos analisados em relação ao grupo controle;
- Os grupos tratados com banha e óleo de soja apresentaram maior conteúdo de gordura da carcaça e apenas o grupo banha aumentou a soma da massa dos depósitos dos tecidos adiposos brancos (RET, EPI e MES);
- As concentrações séricas de ácidos graxos livres foram menores somente no grupo banha, sendo que a concentração sérica de insulina, adiponectina, colesterol total, triacilgliceróis e glicose semelhante entre os grupos estudados.
- As concentrações de TNF- α nos tecidos analisados não alteraram, após 8 semanas de de tratamento com as diferentes dietas;
- O conteúdo de IL-10 apresentou redução no tecido adiposo retroperitoneal dos grupos tratados com banha e gordura vegetal hidrogenada. Por outro lado, apenas o grupo banha teve diminuição desta citocina no tecido adiposo mesentérico;
- A dosagem de IL-6 nos tecidos revelou elevação somente no músculo gastrocnêmio dos animais que receberam dieta enriquecida com banha;
- A análise de Correlação Linear Simples mostrou correlação positiva entre TNF- α e IL-10 em especial no fígado dos grupos C, L e H e no músculo gastrocnêmio de todos os grupos estudados.

Nossos resultados demonstram que o tipo de dieta hiperlipídica, mais que o conteúdo de lipídeos, pode influenciar a adiposidade corporal, o conteúdo de citocinas teciduais e a concentração sérica de ácidos graxos. Adicionalmente, observa-se que dietas com o mesmo teor, mas com diferentes tipos de lipídeos podem agir de forma diferenciada na composição do tecido adiposo, na resposta inflamatória e na etiologia da obesidadee.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**. v. 406, p.g. 782-787, 2000.

AKIRA, S.; AND TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.** v. 4, p.g. 499-511, 2004.

BALABAN, G.; SILVA, G. A. P. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil. **J. Pediatr.** v. 80, p.g. 7-16, 2004.

BALISTRERI, C.R.; CARUSO, C.; CANDORE, G.. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators. Inflamm.** v. 2010, p.g 1-19, 2 010.

BERG, A.H.; SCHERER, P. E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 96, p.g. 939-945, 2005.

BRAY, G.A.; CLEARFIELD, M.B.; FINTEL, D.J.; NELINSON, D.S. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risks. **Clinical Cornerstone**. v.9, p.g. 30-42, 2009.

BRAY, G.A.; POPKIN, B.M. Dietary fat intake does affect obesity. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 68, p.g 1157–1173, 1998.

BUENO, A.A.; HABITANTE, C.A.; OYAMA, L.M.; et al. White adipose tissue re-growth after partial lipectomy in high fat diet induced obese Wistar rats. **J. Physiol. Sci.** v. 61(01), p.g. 55-63, 2010.

BUENO, A.A.; OYAMA, L.M.; DE OLIVEIRA, C. et al. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. **Pflugers. Arch.** v.455(4), p.g 701-709, 2008.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. High fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity** v.15, p.g 798–808, 2007.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D.F. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK β and NF- κ B. **Nat. Med.** v.11, p.g.183–190, 2005.

CANI, P.D. ;DELZENNE, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Curr. Pharm. Des.** v.15(13), p.g.1546-58, 2009.

CHOI, S.; DIEHL, A.M. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. **Curr. Opin. Gastroenterol.** v.;21, p.g. 702-7, 2005.

CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res.** v. 46, p.g. 2347-2355, 2005.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Méd. Port.**, Lisboa, v. 19, p.g. 251-256, Set. 2006.

DOUCET, E.; ALMÉRAS, N.; WHITE, M.D. et al. Dietary fat composition and human adiposity. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 52(1), p.g. 2-6, 1998.

DZOPALIC, T.; RAJKOVIC, I.; DRAGICEVIC, A.; COLIC, M.; The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. **Immunol. Res.** v. 52(1-2), p.g. 20-33, 2012.

ESCRIBESE, M.M; CASAS, M.; CORBÍ, A.L.; Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization. **Immunobiology**, v. (12), p.g. 1233-40, 2012.

ESPOSITO, K.; GIUGLIANO, D.; NAPPO, F., et al. Regression of carotid atherosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus: Campanian Postprandial Hyperglycemia Study Group. **Circulation**, v. 110 p.g. 214, 2004.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; GIUGLIANO, F. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** V. 88(3), p.g. 1055-8, 2003.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DÂMASO, A.R. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20(2), p.g. 218-24, 2004.

ESTADELLA, D.; OLLER DO NASCIMENTO, M.P.; OYAMA, L.M.; et al.; Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids. **Mediators of Inflammation** ID 137579, 13 pages – 2013;

EXEL, V.; GUSSEKLOO, E. J.; CRAEN, A. J., et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: The Leiden 85-Plu Study. **Diabetes**, v. 51, p.g. 1088, 2002.

FAIN, J.N.; BAHOUTH, S.W.; MADAN, A.K. TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** V.28(4), p.g. 616-22, 2004.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, Chicago, v. 115, p.g. 911-919, 2005.

FEINSTEIN, R.; KANETY, H.; PAPA, M. Z.; LUNENFELD, B.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J. Biol. Chem.** v. 268, p.g. 26055-26058, 1993.

FERRANTE, A. W. JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.** v. 112, p.g. 1796-1808, 2003.

FLACHS, P.; MOHAMED-ALI, V.; HORAKOVA, O. et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**. v. 49(2), p.g. 394-7, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, São Paulo, v. 83, n. 5, p.g. 192-203, 2007.

FORTIS, A.; GARCIA-MACEDO, R.; MALDONADO-BERNAL, C. et al. The role of innate immunity in obesity. **Salud pública Méx**, Cuernavaca, v. 54, p.g. 2, 2012.

FRENCH, S.; ROBINSON, T. Fats and food intake. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care** v.6, p.g. 629–634, 2003.

FRIED, S. K.; BUNKIN, D. A.; AND GREENBERG, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J Clin Endocrinol Metab** v.83, p.g.847-850, 1998.

GHIBAUDI, L.; COOK, J.; FARLEY, C. et al. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. **Obes. Res.** v. 10, p.g. 956–963, 2002.

GREENBERG, A.S.; OBIN, M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.83(supl), p.g. 461S-465S, 2006.

HAN, S.; YOON, K.; LEE, K. et al. TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 13;305(4), p.g. 789-96, 2003.

HARIRI, N.; THIBAUT, L.; High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr. Res. Rev.**, v. 23(2), p.g. 270-99, 2010.

HAUNER, H. ; PETRUSCHKE, T. ; RUSS, M. et al. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. **Diabetologia**.v.38(7), p.g.764-71, 1995.

HEREDIA, F.P.; GOMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and immune system. **Proc. Nutr. Soc.** v. 71(2), p.g.332-8, 2012.

HERMSDORFF, H. H.M.; MONTEIRO, J. B.R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 48, p.g.803-811, 2004.

HILL, J.O.; MELANSON, E.L.; WYATT, H.T. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. **J. Nutr.** v. 130, p.g. 284S-88S, 2000.

HILL, J.O.; WYATT, H.R.; PETERS, J.C. Energy balance and obesity. **Circulation**. v.126(1), p.g. 126-32, 2012.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v.284, p.g. 1313-1318, 1999.

HOSOGAI, N.; FUKUHARA, A.; OSHIMA, K. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v.56, p.g. 901–11, 2007

HOTAMISLIGIL G.S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v. 27 Suppl 3:S53-5, 2003.

HOTAMISLIGIL, G. S., ARNER, P., CARO, J. F., ATKINSON, R. L., and SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.** v. 95, p.g. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science** v. 259, p.g. 87-91, 1993.

HU, F.B.; VAN DAM, R.M.; LIU, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. **Diabetologia** v. 44(7), p.g. 805-817, 2001.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity**, CAIRO, v. 11, p. 11-18, 2009.

JARRAR, M.H.; BARANOVA, A.; COLLANTES, R. et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**; v. 27, p.g. 412-21, 2008.

JUGE-AUBRY, C.E.; SOMM, E.; PERNIN, A. et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. **Cytokine**, v.29(6), p.g. 270-4, 2005.

KAUR, K.; SHARMA, A.K.; DHINGRA, S.; SINGAL, P.K. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 41, p.g.1023–1030, 2006.

KERN, P. A.; SAGHZADEH, M.; ONG, J. M.; BOSCH, R. J.; DEEM, R.; SIMSOLO, R. B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J. Clin. Invest.** v. 95, p.g. 2111-2119, 1995.

KÖNNER, A. C.; AND BRÜNING, J.C. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. **Endocrinology and Metabolism.** v. 22(1), p.g.16-23, 2011.

KVARNHAMMAR, A.M.; CARDELL, L.O. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. **Immunology.** v36(1), p.g. 11-20, 2012

LENZ, A.; DIAMOND JR, F.B. Obesity: the hormonal milieu. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.** v. 15, p.g. 9-20, 2008.

LEONIDOU, L.; MOUZAKI, A.; MICHALAKI, M.; et al. Cytokine production and hospital mortality in patients with sepsis induced stress hyperglycemia. **J. Infect.** v. 55, p.g. 340–346, 2007.

LOLMÈDE, K.; DURAND DE SAINT FRONT, V.; GALITZKY, J. et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p.g. 1187-1195, 2003.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, vol.53, p.g. 595-607, 2009.

MAURY, E.; BRICHARD, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 314, p.g. 1-16, 2010.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, p.g. 295-298, 1997.

MIHARA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin. Sci.** v122, p.g 143-159, 2012.

MIYAZAWA-HOSHIMOTO, S.; TAKAHASHI, K.; BUJO, H. et al.; Roles of degree of fat deposition and its localization on VEGF expression in adipocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288(6), p.g. E1128-36, 2005.

MOHAMED-ALI, V.; GOODRICK, S. RAWESH, A. et al.; Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82(12), p.g. 4196-200, 1997.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J.H.; COPPACK, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v. 22(12), p.g.1145-58, 1998.

NADERALI, E.K.; ESTADELLA, D.; ROCHA, M. et al. A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. **Clin Sci.** v.105(4), p.g. 403-8, 2003

OLLER DO NASCIMENTO C.O.; HUNTER, L.; TRAYHURN, P. Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPARgamma. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 313(3), p.g. 702-708, 2004.

OLLER DO NASCIMENTO, C.M.; WILLIAMSON, D.H. dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. **Biochem. J.**, v. 239, p.g. 233-236, 1986.

OUCHI, N.; NIHARA, S.; ARITA, Y. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, Osaka, v. 100, p.g. 2473-2476, 1999.

PISANI, L.P.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M.; BUENO, A.A.; et al. Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. **Lipids Health Dis.** v. 4, p.g. 7-13, 2008a.

PISANI, L.P.; OYAMA, L.M.; BUENO, A.A.; et al. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. **Nutrition**. v. 24(3), p.g. 255-61, 2008b.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**; v. 127, p.g. 838S– 41, 1997.

ROPELLE, E.R.; FLORES, M.B.; CINTRA, DE. et al. IL-6 and IL-10 Anti-Inflammatory Activity Links Exercise to Hypothalamic Insulin and Leptin Sensitivity through IKK β and ER Stress Inhibition. **PLoS. Biol.**v. 24, p.g.8(8), 2010.

RYDEN, M.; ARVIDSSON, E.; BLOMQVIST, L. et al. Target for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 318(1), p.g. 168-175, 2004.

RYFFEL, B.; MIHATSCH, M.J.; TNF receptor distribution in human tissues. **Int. Rev. Exp. Pathol.** v.34 p.g. 149-56, 1993.

SACKS, F.M.; KATAN, M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **Am. J. Med.** v. 113(9B) p.g. 13S-24S, 2002.

SAID, E. A.; TRAUTMANN, L.; DUPUY, F.; et al. PD-1 Induced IL10 Production by Monocytes Impairs T-cell Activation in a Reversible Fashion, **Nature Medicine**, p.g 452–459, 2009.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D.J.; Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 100(12), p.g. 7265-70, 2003.

SCHERER, P.E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M. et al.; A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J. Biol. Chem.** v. 270(45), p.g. 26746-9, 1995.

SCHOTTELIUS, A. J.; MAYO, M. W, SARTOR, R. B. BALDWIN, A. S. JR. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. **J. Biol. Chem.** v. 274, p.g. 31868–31874, 1999.

SHKODA, A.; RUIZ, P. A.; DANIEL, H.; et al. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. **Gastroenterology**, v. 132, p.g. 190–207, 2007.

SMITH, M.M; MISON, C.T. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity.**J. Physiol.** v. 590(pt8), p.g. 1781-801, 2012.

STANSBIE, D.; BROWNSEY, R.W.; CRETAAZ, M. et al. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. **Biochem. J.** v.1 5;160(2), p.g. 413-6, 1976.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol** .v. 21, p.g. 335-376, 2003.

TRAYHURN, P.; WANG, B.; WOOD, I.S. Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. **Arch. Physiol. Biochem.** v. 114(4) p.g 267-76, 2008b.

TRAYHURN, P.; WANG, B.; WOOD, I.S. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? **Br. J. Nutr.** v. 100, p.g 227–35, 2008a.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr.** v. 92(3)p.g. 347-55, 2004.

TSATSANIS, C.; ZACHARIOUDAKI, V.; ANDROULIDAKI, A. et al. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 335(4), p.g. 1254-63, 2005.

TSUKUMO, D. M.; CARVALHO, B.M.; CARVALHO-FILHO, M.A et al . Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 53, p.g. 2, 2009.

VODOVOTZ, Y.; The hepatocyte as a microbial product-responsive cell. **J. Endotoxin. Res.** v 7(5) p.g. 365-73, 2001.

VOZAROVA, B.; WEYER, C.; HANSON K, T. et al. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. **Obes. Res.** v. 9(7), p.g. 414-7, 2001.

VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E.G. et al. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. **Diabetologia**, v. 53(4), pg. 606-13, 2010.

WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B. et al.; Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.** v. 174(5), p.g. 1209-20, 1991.

WANG, B.; JENKINS, J.R.; TRAYHUM, P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. **Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.288(4), p.g. E731-40, 2005.

WARWICK, Z.S.; SCHIFFMAN, S.S. Role of dietary fat in calorie intake and weight gain. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 16, p.g 585–596, 1992.

WATARI, M.; WATARI, H.; NACHAMKIN, I.; STRAUSS, J.F.; Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and the elastin-degrading enzyme, cathepsin S, in human cervical smooth-muscle cells. **J. Soc Gynecol. Investig**, v7(3), p.g190-8, 2000.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest**, v.112(12), p.g. 1796-808, 2003.

WELLEN, K. E., and HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J. Clin. Invest.** v. 115, p.g. 1111-1119, 2005.

WHO (2002). The World Health Report 2002 Reducing Risks, Promoting Healthy Life (Geneva).

WULLAERT, A.; HEYNINCK, K.; BEYAERT, R.; Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.** v. 72(9), p.g. 1090-101, 2006.

XU A.; WANG, Y.; KESHAW, H. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 112(1), p.g. 91-100, 2003.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest.** v. 112, p.g.1821-1830, 2003.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, Tokyo, v. 8, p.g 1288-1295, 2002.

YANAI, H.; TOMONO, Y.; ITO, K.; FURUTANI, N.; YOSHIDA, H.; TADA, N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. **Nutrition Journal**, v. 7, p.g. 10-17, 2008.

YE, J.; GAO, Z.; YIN, J.; HE, Q.; Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 293, p.g 1118–28, 2007.

YU, C.; CHEN, Y.; CLINE, G.W. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J. Biol. Chem.** V.277(52), p.g.50230-6, 2002

ZHANG Y.; PROENÇA R.; MAFFEI M.; BARONE M.; LEOPOLD L.; FRIEDMAN J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p.g. 425-32, 1994.

ZUMBACH, M.S.; BOEHME, M.W.; WAHL, P. et al. Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82(12), p.g. 4080-2, 1997.