

JOAO VICTOR FORNARI

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE TNF- α SOBRE AS
ALTERAÇÕES HEPÁTICAS ASSOCIADAS À
OBESIDADE EXPERIMENTAL.**

**BRAGANÇA PAULISTA
2009**

JOAO VICTOR FORNARI

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE TNF- α SOBRE AS
ALTERAÇÕES HEPÁTICAS ASSOCIADAS À
OBESIDADE EXPERIMENTAL.**

ORIENTADORA

PROFA. DRA. ALESSANDRA GAMBERO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BRAGANÇA PAULISTA
2009**

WD 210 Fornari, João Victor.
F824e Efeito da inibição de TNF- α sobre as alterações
 hepáticas associadas à obesidade experimental / João
 Victor Fornari. -- Bragança Paulista, 2008.
 49 p.

 Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

 Orientação de: Alessandra Gambero

 1. Dieta hiperlipídica. 2. Talidomida. 3. Inibição de
 TNF- α . I. Gambero, Alessandra. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Dra. Profa. Alessandra Gambero

Membros:

1. Prof. Dr. Profa. Alessandra Gambero

2. Prof. Dr. Profa. Alessandra Lia Gasparetti Guarilha

3. Prof. Dr. Profa. Aparecida Erica Bighetti

Suplentes:

1. Prof. Dr. Profa. Pérola Ribeiro

2. Prof. Dr. Prof. Jose Pedrazzoli Junior

**Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.**

Data: 29/01/2009

“A Deus por ter me dado forças para a realização deste trabalho”.

“Dedico este trabalho a minha mãe e minha irmã por me incentivarem e me conduzirem a este sonho”.

“Dedico a meu pai que não está mais presente em minha vida, mas que muito me ensinou nesta vida”.

“Dedico este trabalho a Mariana Tiemi Hara que me ajudou muito na elaboração e formação deste trabalho”.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus pela oportunidade de concretizar este sonho.

Agradecemos a nossos familiares pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Alessandra Gambero pela preciosa orientação, dedicação e coordenação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ribeiro pela sua disponibilidade para esclarecimento na elaboração deste trabalho.

Aos Alunos de iniciação científica, em especial à Lívia e à Cecília, pela colaboração e condução desta pesquisa, pois a ajuda desses fez com que este trabalho tivesse êxito .

À toda equipe de pesquisadores da UNIFAG, além dos professores responsáveis pelo Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Celular e Molecular.

“Se num dia de tristeza você tiver de escolher entre o mundo e o amor, escolha o amor e com ele conquiste o mundo”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

EIA - Ensaio imunoenzimático (Enzymatic Immunoassay)

EPM - Erro padrão da média

IL- 6 - Interleucina-6

IMC - Índice de massa corporal

IRS - Substrato do Receptor de insulina

i.p. - Intra-peritonal

i.v. - Intra-venosa

NAFLD - Doença hepática gordurosa não-alcoólica

NF – KB – Fator de Transcrição Nuclear Kappa-B

NK – Células matadoras (Natural Killer)

RNA - Acido Ribonucléico

TNF – Alfa - Fator de necrose Tumoral - alfa

TZDs - Tiazolidinodionas

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TALIDOMIDA.

FIGURA 2 - GANHO DE PESO CORPORAL NOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM DIETA HIPERLIPÍDICA E DIETA PADRÃO.

FIGURA 3 - GANHO DE PESO CORPORAL NOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM DIETA HIPERLIPÍDICA TRATADOS E NÃO TRATADOS COM TALIDOMIDA.

FIGURA 4 - GLICEMIA DE JEJUM DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

FIGURA 5 - NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO EM TIROSINA DO SUBSTRATO DE RECEPTOR DE INSULINA (IRS – 1).

FIGURA 6 – NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DA AKT.

FIGURA 7 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL - OMS 1997.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DE MACRONUTRIENTES DAS DIETAS.

TABELA 3 - ANÁLISE SÉRICA DE AST E ALT

RESUMO

A obesidade é definida pelo excesso de gordura corporal, decorrente da interação de fatores genéticos, dietéticos, metabólicos, psicológicos e do nível de atividade física, que acarreta repercussões à saúde com perda de qualidade de vida. Atualmente, acredita-se que o excesso de peso esteja associado a um quadro de inflamação sistêmica originando possíveis doenças como diabetes tipo II, hipertensão, doença coronariana e cérebro-vascular. O tecido adiposo sintetiza e secreta mediadores clássicos do processo inflamatório, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e a Interleucina (IL)-6, que contribuem para o estabelecimento do quadro de inflamação sistêmica. Desse modo, este trabalho visa avaliar o efeito do tratamento com um fármaco imunossupressor e anti-TNF- α , a talidomida, nas alterações hepáticas e sistêmicas em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Camundongos Swiss, num total de 45 animais (N= 45), foram divididos em três grupos, no qual o primeiro recebeu dieta normal para a espécie denominado grupo controle (CT), o segundo grupo experimental recebeu dieta hiperlipídica durante 12 semanas, denominado grupo mantido com dieta hiperlipídica (DH) e o terceiro e último grupo, recebeu dieta hiperlipídica e fez uso de talidomida (100 mg/kg/dia) nos últimos 10 dias (DH+T). O grupo DH apresentou maior peso corporal, glicemia basal, níveis séricos de TNF- α e resistência periférica à insulina após 12 semanas de dieta hiperlipídica quando comparados com o grupo CT. O tratamento com talidomida DH + T foi capaz de reverter tais alterações quando comparados com o grupo DH. A melhora dos parâmetros sistêmicos foi acompanhada por uma

redução significativa da área de esteatose hepática nos animais tratados com talidomida (DH + T).

Assim, o uso de um fármaco com atividade imunossupressora e que inclui como alvo à inibição da produção de TNF- α em animais com obesidade experimental resulta em melhora de vários parâmetros sistêmicos e hepáticos alterados pela obesidade, sugerindo que fármacos com esse perfil de atividade farmacológica possam ser úteis no tratamento do diabetes tipo 2 e da doença gordurosa do fígado.

ABSTRACT

Obesity is characterized by an adiposity excess due genetic, dietetic, metabolic, psychological factors and physical activity level which reduce the life quality. Development of obesity is associated with a low-chronic inflammatory status and it is associated with the genesis of development of various disease, including type 2 diabetes, hypertension, coronary heart disease and cerebral vascular diseases. White adipose tissue produces and releases classical inflammatory mediator, such as Tumoral Necrosis Factor (TNF)- α and Interleukin (IL)-6 which contribute to low-grade inflammatory status. So, we herein study the effects of an immunosuppressant and anti-TNF- α drug, thalidomide, upon systemic and hepatic modifications induced by high-fat diet in mice.

Swiss mice were feed with high-fat diet for 12 weeks (DH) and received thalidomide (100 mg.kg⁻¹.day) in the last 10 days (DHT). Control animals were maintained with standard diet (CT). We found an increase on body weight, basal glucose blood level, serum TNF- α and insulin resistance after 12 weeks of DH. Thalidomide treatment was able to reduce all parameters. The improvement of systemic parameters was correlated with a significant reduction of hepatic steatosis area.

We concluded that immunosuppressant drugs that target TNF- α restore systemic and hepatic alterations provide by experimental obesity, suggesting that drugs with this profile could be useful in type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade, inflamação e resistência à insulina.

A obesidade é uma condição crônica, definida pelo excesso de gordura corporal, decorrente da interação de fatores genéticos, dietéticos, metabólicos, psicológicos e do nível de atividade física que acarreta repercussões à saúde com perda de qualidade e na quantidade de vida (Ramos *et al.*, 2003). Atualmente, a obesidade é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia global, com mais de um bilhão de adultos com excesso de peso e pelo menos trezentos milhões com obesidade (World Health Organization, 2003). Nos Estados Unidos, o epicentro dessa epidemia, 64% da população adulta acima de 20 anos apresenta excesso de peso e 30% dessa população apresenta algum grau de obesidade (Ramos *et al.*, 2003).

No Brasil, a prevalência da população adulta chega a 15% de sobrepesos e obesos, isso varia de região para região, porém a obesidade é considerada um problema de saúde pública tanto nacional, quanto mundial (World Health Organization, 2006). Segundo dados do DATASUS a obesidade infantil vem crescendo no Brasil e no mundo, estimasse que a obesidade infantil brasileira já chega a 2% (Ramos *et al.*, 2003).

O tratamento da obesidade está indicado somente quando o paciente apresentar o Índice de Massa Corporal (IMC) maior que 30 ou quando apresenta patologias associadas ao excesso de peso com IMC superior a 25 (Mancini e Halpern, 2002). O IMC é um indicador simples e preciso do estado nutricional, calculado através do peso em kilogramas, dividido pela altura em metros ao

quadrado. O estado nutricional, segundo o IMC, pode ser classificado conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação do Estado Nutricional

IMC (Kg/m²)	Classificação
<16	Magreza grau III
16-16,9	Magreza grau II
17-18,4	Magreza grau I
18,5-24,9	Eutrofia
25-29,9	Sobrepeso
30-34,9	Obesidade grau I
35-39,9	Obesidade grau II
≥40	Obesidade grau III

(Organização Mundial de Saúde, 2002)

A intervenção cirúrgica vem sendo aplicada com boa aceitação no tratamento da redução de peso e das co-morbidades da obesidade grau III. A intervenção farmacológica também tem sido utilizada empregando drogas como orlistat, um inibidor de lipase pancreática que diminui a absorção de gorduras no intestino e sibutramina, um inibidor seletivo da recaptação neuronal de serotonina e noradrenalina, que diminui a ingestão de alimentos e aumenta a termogênese, contribuindo para a perda de peso (Blackburn e Walthman, 2005). O fármaco rimonabante também está sendo utilizado no Brasil. Trata-se de um inibidor seletivo de receptor canabinóide-1 e, quando associado à dieta, induz a perda de peso e redução da adiposidade visceral (Blackburn e Walthman, 2005).

Atualmente, acredita-se que o excesso de peso esteja associado a um quadro de inflamação sistêmica originando possíveis doenças como diabetes tipo II,

dislipidemias, hipertensão, doença coronariana e cérebro-vascular, colelitíase, osteoartrite, insuficiência cardíaca, síndrome da apnéia do sono, alterações menstruais e psicológicas. A obesidade gera prejuízos no estado normal do organismo, modificando algumas funções vitais como a cardíaca, pulmonar, hepática, endócrina e imune (Kopelman, 2000).

A associação entre obesidade e inflamação tem sido muito discutida nos últimos anos e acredita-se que o tecido adiposo seja o responsável por essa. Esse tecido sintetiza e secreta mediadores clássicos do processo inflamatório, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e a Interleucina (IL)-6, sendo que o grau de elevação na produção e secreção desses mediadores corresponde diretamente ao grau de obesidade. O aumento da expressão do RNA mensageiro de TNF- α em gordura abdominal subcutânea ocorre em roedores obesos e em humanos (De Taeye *et al.*, 2007). Similarmente, a expressão da IL-6 está elevada no tecido adiposo humano (Ramos *et al.*, 2003). Adicionalmente, o tecido adiposo também produz e secreta outras citocinas, conhecidas coletivamente como adipocitocinas (Senello *et al.*, 2005). Estas influenciam vários processos fisiológicos, como por exemplo, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, proteção vascular, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, regulação da pressão arterial, da coagulação sanguínea, além de atuar como moduladores nas funções imunológicas (Guimarães *et al.*, 2007).

A hipertrofia ou hiperplasia dos adipócitos causa alterações na secreção de adipocitocinas, podendo gerar uma situação relacionada à origem do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (Guimarães *et al.*, 2007).

Dentre as adipocitocinas podemos citar a resistina, leptina e adiponectina. A resistina pertence a uma família de proteínas ricas em cisteína com padrões de

expressão e atividades biológicas distintas (Rabe *et al.*, 2008). É sintetizada pelo tecido adiposo branco e sua secreção está fortemente relacionada à resistência a insulina, visto que a resistina administrada intraperitonealmente eleva os níveis de glicose plasmática e induz a uma resistência insulínica hepática. Os anticorpos anti-resistina diminuem a glicemia e melhoram a sensibilidade à insulina em camundongos obesos (Chen *et al.*, 2002). Alguns estudos mostram aumento das concentrações de resistina em modelos animais de obesidade e diabetes, embora existam resultados controversos (Rabe *et al.*, 2008). Estudos em humanos também apresentaram resultados controversos, pois a expressão gênica da resistina pelo tecido adiposo não foi encontrada em indivíduos magros, porém não foi possível estabelecer uma correlação entre sua expressão, massa corporal, adiposidade e resistência insulínica em indivíduos obesos (Janke *et al.*, 2002). Em nível celular, a resistina exerce potente efeito pró-inflamatório levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (Rabe *et al.*, 2008).

A leptina é uma proteína produzida no tecido adiposo branco que demonstra similaridade estrutural com família de citocinas como, por exemplo, a resistina (Fantuzzi, 2008). Ela atua nos receptores expressos no hipotálamo para promover a sensação de saciedade e equilibrar o balanço energético. Em situações fisiológicas a insulina promove uma melhora na sensibilidade à insulina (hepática e no músculo esquelético) além de modular a função das células β pancreáticas (Fantuzzi, 2008). Estudos mostram que crianças obesas portadoras de deficiências congênitas de leptina tratadas com essa proteína reverteram o quadro de obesidade (Guimarães *et al.*, 2007). Tanto a deficiência como a resistência à leptina podem causar o aumento e o desenvolvimento da obesidade, sendo assim, observou-se que em indivíduos obesos é possível encontrar níveis normais de receptores, níveis adequados de

leptina circulante, mas que não se traduzem em ações benéficas, provavelmente pela presença de resistência à leptina nestss (Rabe, 2008). Adicionalmente, a leptina parece desempenhar funções imunológicas diretas, modulando a ativação, proliferação e maturação de células do sistema imunológico, como linfócitos, NK, monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilo, conferindo o status de molécula pró-inflamatória (Lam e Lu, 2007).

A adiponectina é uma proteína sintetizada exclusivamente no tecido adiposo, e ao contrario de outras proteínas que são secretadas pelos adipócitos, sua expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (Maynadier *et al.*, 2008). Sua concentração se encontra diminuída em humanos e camundongos obesos ou portadores de resistência insulínica. Conforme descreve Guimarães *et al.*, 2007 indivíduos que apresentam altas concentrações de adiponectina estão menos sujeitos a desenvolver diabetes tipo II quando comparados a indivíduos com concentrações de adiponectina baixas. Essa adipocitocina é capaz de inibir a adesão de monócitos ao endotélio vascular, a transformação de macrófagos em células espumosas (*foam cells*) e a expressão de moléculas de adesão (Goldstein *et al.*, 2004). A concentração plasmática diminuída de adiponectina também se associa com risco de doenças cardiovasculares em humanos. A adiponectina tem a função de proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose. Também foi sugerido, por Maeda e Funahashi (2004), a existência de associação entre a baixa concentração de adiponectina e o estabelecimento da síndrome metabólica e aumento do risco de câncer de mama. Alguns tratamentos nutricionais e terapêuticos que melhoram a sensibilidade à insulina, como por exemplo, a restrição energética, perda de peso e tratamento com

tiazolidinodionas (TZDs), aumentam a expressão gênica de adiponectina e sua quantidade circulante (Maynard et al. 2008).

Estudos demonstraram que os adipócitos são capazes de expressar uma clássica citocina pró-inflamatória, o TNF- α , que a expressão desse nos adipócitos de animais e humanos obesos estava aumentada e relacionada à resistência a insulina (Hotamisligil *et al.*, 1999). Adicionalmente, animais que não expressam essa citocina ou os receptores para TNF- α são protegidos da indução da obesidade quando submetidos a dietas experimentais (Uysal *et al.*, 1997 e Hotamisligil *et al.*, 2006). A neutralização do TNF- α com o uso de um anticorpo monoclonal anti-TNF, também leva à diminuição da resistência insulínica em animais submetidos à dieta hiperlipídica (Araújo *et al.*, 2007). A relação entre a produção de TNF- α e a resistência à insulina reside no fato de que a ativação celular induzida pela insulina inclui a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRSs), como será detalhado à diante e observa-se que na presença de TNF- α , esses substratos encontram-se fosforilados em serina, sugerindo que insulina e TNF- α compitam pelos mesmos substratos durante a sinalização intracelular (Hotamisligil., 1996).

O processo de sinalização da insulina inicia-se com a ligação do hormônio insulina ao seu receptor. O receptor de insulina pertence à família dos receptores de membrana que possuem capacidade tirosina-quinase intrínseca. Ele é composto de duas sub-unidades α extra-celulares e duas sub-unidades β transmembrana, ligadas por ponte dissulfeto (Saad., 1996). A insulina liga-se à sub-unidade α do receptor, provocando uma mudança conformacional na sub-unidade β , que leva a sua auto-fosforilação em tirosina e ativa sua capacidade tirosina-quinase. Uma vez ativado, o receptor de insulina é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares, entre eles os substratos do receptor de insulina (IRS-1-4), Shc (Src homology collagen) e

JAK-2 (Satiel *et al.*, 2001; Veloso *et al.*, 1998 e Saad *et al.*, 1996). Essas proteínas, uma vez fosforiladas, recrutam e ativam diversos efetores intracelulares, com diversas funções celulares diferentes (Satiel *et al.*, 2001). A via da ERK está principalmente envolvida no controle do crescimento e da mitogênese, enquanto a ativação da PI-3 quinase ou AKT pelo IRS-1 está preferencialmente ligada às ações metabólicas da insulina (Satiel *et al.*, 2001 e Araújo *et al.*, 2007). As respostas metabólicas finais também diferem em relação ao tecido-alvo. A insulina inibe a produção e liberação de glicose no fígado através do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise. A insulina estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo. Esse último efeito é obtido via desfosforilação da glicogêniosintetase. Após estímulo com insulina a Akt fosforila e inativa a GSK-3, o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio-sintetase aumentando sua atividade (Mothe *et al.*, 1996).. Em adipócitos a insulina reduz a lipólise através da inibição da lipase hormônio sensível (Zou *et al.*, 1996). Essa enzima é ativada pela PKA (proteína quinase A). A insulina inibe a atividade da PKA, ativando a fosfodiesterase AMP cíclico específica (PDE3B), que reduz os níveis de AMP cíclico nos adipócitos (Zeng *et al.*, 2000). A ativação da PDE3B é dependente e distal à ativação da PI 3-quinase e Akt pela insulina.

Adicionalmente, Indivíduos obesos têm quantidades aumentadas de macrófagos acumulados no tecido adiposo e sugere-se que essas células também contribuam para a produção de TNF- α pelo tecido adiposo (Zeyda e Stulnig, 2007). Os pré-adipócitos também podem se converter em macrófagos sobre certas condições da obesidade. Um estudo realizado com camundongos obesos analisou as atividades inflamatórias dos macrófagos no tecido adiposo e verificou que o TNF- α poderia ativar pré-adipócitos, aumentando a expressão de mediadores da

inflamação (Zeyda e Stulnig, 2007). É provável que pelo recrutamento de monócitos circulantes e ativação de macrófagos residentes, eventos característicos do processo inflamatório, e pela combinação da presença de pré-adipócitos convertidos em macrófagos localmente, temos como resultado a produção aumentada de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1, que atraem outros macrófagos além de ativar respostas imunes mediadas por linfócitos (Salemi *et al.*, 2003).

1.2 Obesidade e Esteatose Hepática

O acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos é um mecanismo natural utilizado para estocar energia. A quantidade de energia acumulada na gordura é muito maior que na glicose e na proteína, podendo fornecer ao animal grande quantidade de energia nos momentos de necessidade. O fígado mantém dois grandes estoques de energia: a gordura e o glicogênio. Quando permanecemos em jejum e o nível de açúcar no sangue diminui, a insulina envia estímulos ao fígado para transformar o glicogênio em glicose e manter o organismo funcionando. Se a falta de comida persistir, a gordura começa a ser utilizada, mas esse processo é mais demorado. Além disso, estudos sugerem que as células esteladas (Stellate cells) do fígado tentam controlar os níveis de colesterol no sangue transportando o colesterol para dentro do fígado. Os coelhos, por exemplo, que não têm células esteladas, sofrem muito mais com o excesso de colesterol (Browning e Horton, 2004).

O diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica (*Nonalcoholic fatty liver disease* - NAFLD) é feito pela demonstração de acúmulo de gordura no fígado em pacientes com consumo de álcool insuficiente para levar a esse tipo de alteração. Esse nível é considerado na maioria dos estudos como inferior a 20

gramas de álcool por semana. Assim, a doença hepática gordurosa está relacionada à obesidade afetando grande contingente de adultos e crianças (Wieckowska et al., 2007).

A resistência à insulina resulta no acúmulo excessivo de triglicérides nos hepatócitos e é considerado o primeiro passo na patogênese da NAFLD. O estresse oxidativo resultante da oxidação de ácidos graxos na mitocôndria, a expressão hepática de citocinas inflamatórias por mecanismos dependentes de NF-KB e os níveis de resistina e leptina elevados são considerados fatores envolvidos na injúria dos hepatócitos que pode progredir a um quadro de inflamação (hepatite) e fibrose levando à perda funcional do fígado (Browning e Horton, 2004). Um desequilíbrio na produção de citocinas, em particular, TNF- α /adiponectina parece desempenhar uma função importante no desenvolvimento da NAFLD (Wieckowska *et al.*, 2007).

Atualmente, o único tratamento utilizado de rotina para a NAFLD é o controle dos fatores que levaram ao seu aparecimento. Um estudo experimental recente, no entanto, utilizando um anticorpo monoclonal que bloqueia as ações do TNF- α , o infliximab, apresentou resultados interessantes, como melhora histológica do fígado, melhora da via de sinalização da insulina no fígado e diminuição de peso dos animais estudados que apresentavam esteatose hepática (Barbuio et al., 2007).

Apesar de algumas raras pessoas apresentarem esteatose (acúmulo de gordura no citoplasma celular) sem uso de álcool, ou outras substâncias, ou a presença de obesidade, todos os que apresentam esteatose têm realmente algum grau de resistência à insulina. Vale ressaltar que podemos caracterizar situações de esteatose "simples" e a esteatose com inflamação associada. A elevação das aminotransferases como o aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), na ausência de outras causas (como a hepatite C) tende a

cursar com o aparecimento de uma esteatose e, geralmente, indica a presença de inflamação, confirmada sempre pelo diagnóstico obtido com biópsia hepática (Wieckowska et al., 2007). Os mecanismos que desencadeiam a hepatite e a cirrose em um paciente com esteatose simples não são conhecidos, mas estudos recentes já têm mostrado que os mecanismos inflamatórios contribuem para a formação de fibrose.

1.3 Talidomida e seu mecanismo de ação

A indústria farmacêutica apresentou o fármaco talidomida em meados da década de 50 (Dredge *et al.*, 2002). Esse fármaco começou a ser utilizado com o propósito sedativo e antiemético em gestantes, obtendo ótima aceitação no tratamento de enjôos matinais provocados pela gravidez (Chong *et al.*, 2006). No final da década de 50, uma das empresas que comercializavam a talidomida começou a receber notificações de neuropatia periférica traduzida por intensas câimbras, fraqueza muscular e perda da coordenação motora pelos indivíduos que haviam utilizado o fármaco, porém, mesmo assim o fármaco continuou no mercado (Dredge *et al.*, 2002). Na década de 60, a talidomida começou a ser investigada e associada a neuropatias e mais tarde em ser responsável por causar má-formação em crianças recém-nascidas sendo retirada do mercado em 1961 (Boreges *et al.*, 2003).

Atualmente, a talidomida ressurge com um novo propósito devido à sua atividade antiinflamatória e imunomoduladora como novas perspectivas para o tratamento de uma variedade de condições, incluindo o tratamento de eritema nodoso, das complicações inflamatórias associadas à hanseníase e nas complicações associadas à infecção por HIV. A talidomida está sendo associada à

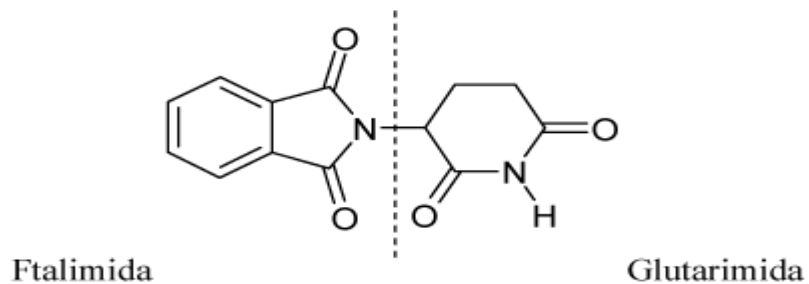
outros fármacos no tratamento de algumas neoplasias por suas propriedades anti-angiogênicas, como imunossupressor no tratamento de pacientes submetidos à transplantes renais e de medula e, no tratamento de artrite reumatóide, tuberculose crônica e doença de Crohn (Boreges *et al.*, 2003).

No Brasil, a Talidomida está sendo utilizada em três programas do Governo Federal (DST/AIDS, Tuberculose/TB e Hanseníase), fazendo parte dos insumos do Ministério da Saúde, porém o seu uso é extremamente restrito e controlado, devido à Portaria Número 354 de 15 de dezembro de 1997. Essa Portaria restringe esse fármaco quanto a seu registro, produção, fabricação, comercialização exposição à venda, prescrição e dispensação dos produtos à base de talidomida (SVS/MS., 1997).

O mecanismo exato de ação da talidomida ainda não é conhecido, porém sua utilização resulta em uma diminuição dos níveis de TNF- α provavelmente por aumentar a degradação de seu mRNA. Há relatos que a talidomida tem um papel na regulação dos linfócitos auxiliares (Th2). Essa regulação aumentaria a produção de citocinas Th2, IL-4 e IL-5 e inibiria a produção dos linfócitos inflamatórios (Th1) e da citocina interferon (IFN)- γ em células periféricas de sangue, estimuladas por antígenos e mitógenos (Dredges *et al.*, 2002). O mecanismo de ação da talidomida no tratamento de alguns tipos de câncer, como o mieloma, parece estar relacionado a suas propriedades anti-angiogênicas, provavelmente por bloquear a ação de potentes fatores angiogênicos como o fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (Boreges *et al.*, 2003).

A talidomida (N-alfa-ftalimido-glutarimida) é um derivado sintético do ácido glutâmico e sua estrutura química está demonstrada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da talidomida



Considerando o exposto de que a talidomida atua como um potente inibidor da produção de TNF- α e, que várias alterações hepáticas e sistêmicas associadas à obesidade contam com a participação do sistema imunológico (inflamação) e estão relacionadas à produção aumentada de TNF- α , este trabalho teve como objetivo avaliar se o bloqueio da produção de TNF- α , utilizando o fármaco talidomida como ferramenta farmacológica para essa finalidade, modifica as alterações sistêmicas e hepáticas induzidas por obesidade em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do bloqueio da produção de TNF- α , obtido com a administração de talidomida sobre as alterações hepáticas e sistêmicas em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do bloqueio da produção de TNF- α , obtido com a administração de talidomida sobre a glicemia de jejum, resistência periférica à insulina, sinalização da insulina no fígado e estabelecimento da esteatose hepática em camundongos mantidos em dieta hiperlipídica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss com seis (6) semanas de idade, pesando 10-15 g, livres de patógenos específicos, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, individuais e mantidos no Biotério da Universidade São Francisco (USF), com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e se serviram *ad libitum* de água e ração.

3.2 Indução da obesidade e tratamento dos animais

Os camundongos receberam, durante 12 semanas, uma dieta especialmente preparada conforme Tabela 2 e, essa amostra foi considerada como o grupo mantido com dieta hiperlipídica (DH). Parte dos camundongos também recebeu pelo mesmo período ração padrão (dieta padrão) esse grupo de camundongos foi denominado grupo controle (CT), conforme a tabela 2. A dieta hiperlipídica foi preparada usando, predominantemente, como fonte de lipídeos, a gordura suína, rica em gordura saturada (Pauli *et al.*, 2008). Essa dieta foi oferecida ao grupo DH e também ao grupo que foi mantido com essa dieta hiperlipídica e, posteriormente, tratados com talidomida (DH+T)

Os animais foram pesados individualmente e semanalmente durante a vigência da dieta e no período do tratamento com talidomida foram pesados no início, no quinto dia e no décimo dia (dia do sacrifício).

A metade dos camundongos em DH (N = 15) recebeu, por via intraperitoneal, 100 mg/kg de talidomida, diariamente, durante os 10 dias que antecederam o sacrifício dos mesmos.

Tabela 2. Composição de macronutrientes da dieta.

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipídica	
	g/kg	Kcal/kg	g/kg	Kcal/kg
Amido de Milho (Q.S.P.)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Maltodextrina	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de Minerais	35	-	35	-
Mix de Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

3.3 Determinação dos níveis glicêmicos e KITT

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e anestesiados com uma mistura 1:1 de cetamina 100 mg/ml e xilasina a 2% no volume de 0,1 ml para cada 100 g de peso corpóreo. Após o procedimento anestésico foi feita uma pequena incisão na cauda de cada animal para a coleta de uma pequena gota de sangue e determinação da glicemia basal utilizando glicosímetro. Insulina (1,5 U/kg) foi injetada intraperitonealmente e novas amostras de sangue periférico foram coletadas após 10, 15, 20 e 30 minutos para determinação da glicemia. A taxa de desaparecimento da glicose (KITT) foi calculada baseando-se na inclinação de cada curva glicêmica (Bonora *et al.* 1987).

3.4 Determinação da atividade de AST, ALT

Após anestesia como descrito no item anterior, a cavidade torácica foi aberta para coleta de sangue por punção cardíaca. Após a punção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Do sangue coletado obteve-se o soro e esse foi utilizado para determinar os níveis séricos enzimáticos de ALT e AST (Cobas-Mira System - Roche Diagnostics).

3.5 Determinação dos níveis séricos de TNF- α e IL-6

Após anestesia como descrito no item anterior, a cavidade torácica foi aberta para coleta de sangue por punção cardíaca. Após a punção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Do sangue coletado obteve-se o soro e

esse foi utilizado para determinar os níveis séricos de TNF- α e IL- 6 usando kit comercial de EIA (GE Healthcare, UK).

3.6 Extração de proteínas e Western blot

Após anestesia como descrito no item anterior, os animais receberam através da veia porta hepática 0,5 ml de salina contendo ou não 10^{-6} M de insulina e tiveram biópsias de fígado coletadas após 30 s desse procedimento para análise de proteínas por *Western blot*. As biópsias do tecido hepático foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (Triton X-100 1%, Tris-HCL 100 mM (pH 7.4), Pirofosfato de Sódio 100 mM, Fluoreto de Sódio 100 mM, EDTA 10 mM, Ortovanadato de Sódio 10 mM. PMSF 2,0 mM e 0,1 mg/ml de aprontinina) e centrifugadas (20 minutos, 12000 rpm, 4° C). A concentração de proteínas presente no sobrenadante foi determinada pelo método de Biureto (Gornall et al, 1949), no qual 20 μ m do sobrenadante foram adicionados a 1 ml de reagente de Biureto (Labtest). Após 30 minutos, a absorvância das amostras foi lida em espectrofotômetro (modelo Hitachi U-2001) em 595 nm. As amostras receberam Tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%; SDS – dodecil sulfato de sódio – 10%) contendo DTT (dithiotheritol) 100 mM foram aquecidas em banho-maria por 5 minutos e estocadas a -70°C .

Nos ensaios de *Western Blot*, alíquotas contendo 0,2 mg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) e separadas por eletroforese (Bio-Rad). Após separação, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com solução contendo anticorpo anti-IRS-

1, anti-fosfo-IRS, anti-AKT e anti-fosfo-AKT (Santa Cruz Biotechnology Inc.CA, USA) *overnight* a 4 °C.

As membranas foram reveladas utilizando Kit comercial de quimioluminescência (GE Healthcare, UK). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria ótica utilizando o programa *Scion Image Software* (ScionCorp, Frederick, MD).

3.7 Análise histológica

Os fragmentos do fígado foram armazenados em formalina tamponada e posteriormente processados para a obtenção de cortes histológicos. Os cortes histológicos foram feitos com sessões de 4 µm de espessura, colocados em lâminas de vidro e corados pela com Hematoxilina e Eosina (HE).

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média, acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM) de n experimentos. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste Dunnett para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Ganho de peso corporal

Na Figura 2 podemos observar que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (DH) apresentaram um ganho maior de peso corpóreo quando comparado aos animais que foram mantidos com a dieta padrão (CT). A diferença de peso corporal entre os grupos tornou-se significativa depois de 3 semanas (total de 10 semanas). Após o tratamento com a talidomida (DH +T), observou-se uma redução significativa no peso corporal dos animais quando comparados com o grupo mantido com dieta hiperlipídica (DH) (Figura 3).

4.2 Glicemia de jejum e Sensibilidade periférica à insulina

Na figura 4 podemos observar a glicemia de jejum nos camundongos que receberam dieta padrão (CT), nos animais que receberam dieta hiperlipídica (DH) e nos animais tratados com Talidomida (DH +T), e constatar que houve o estabelecimento de um quadro de hiperglicemia nos animais com dieta hiperlipídica (DH) e uma melhora nos níveis glicêmicos dos animais que tiveram tratamento com Talidomida (DH + T) por 10 dias, aproximando aos valores dos animais mantidos com dieta padrão. Administração de insulina *in vivo* resulta em queda progressiva dos valores glicêmicos em função do tempo, resultando em curvas glicêmicas. A inclinação dessas curvas reflete a sensibilidade dos tecidos à insulina (K_{ITT}). Os animais controle apresentaram valores de inclinação das curvas de $3,02 \pm 0,78$,

enquanto que os animais em DH apresentaram valores de $0,58 \pm 0,57$ ($p < 0,05$ comparado ao grupo C). A queda nos valores de inclinação das curvas glicêmicas reflete a resistência periférica à insulina. O grupo DH+T apresentou valores de inclinação das curvas glicêmicas de $1,22 \pm 0,58$ ($p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH), ou seja, houve uma melhora significativa na redução da glicemia após a administração de insulina nesses animais, refletindo uma melhora na sensibilidade periférica à insulina.

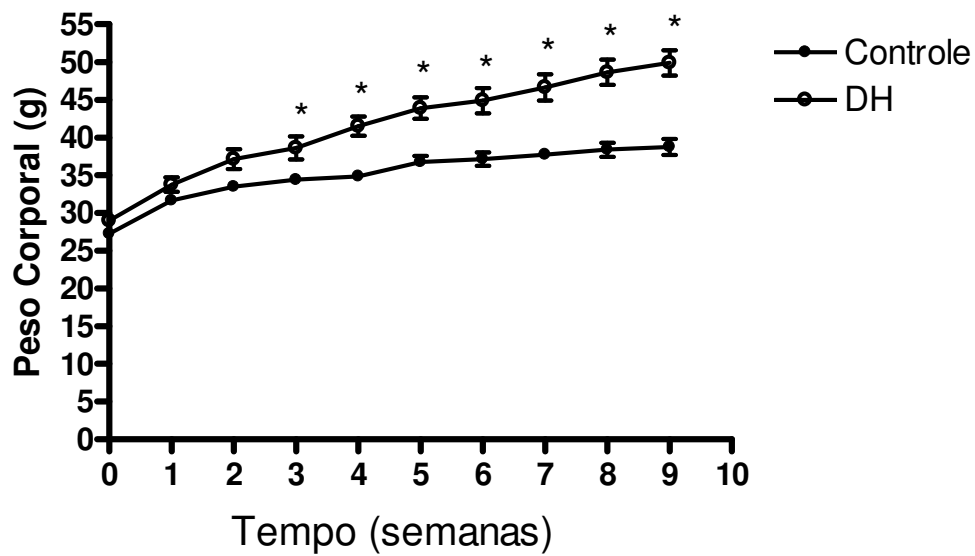


Figura 2. Ganho de peso corporal nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica (DH) e nos animais com dieta padrão (CT) durante 10 semanas. Os resultados estão expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=6). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CT.

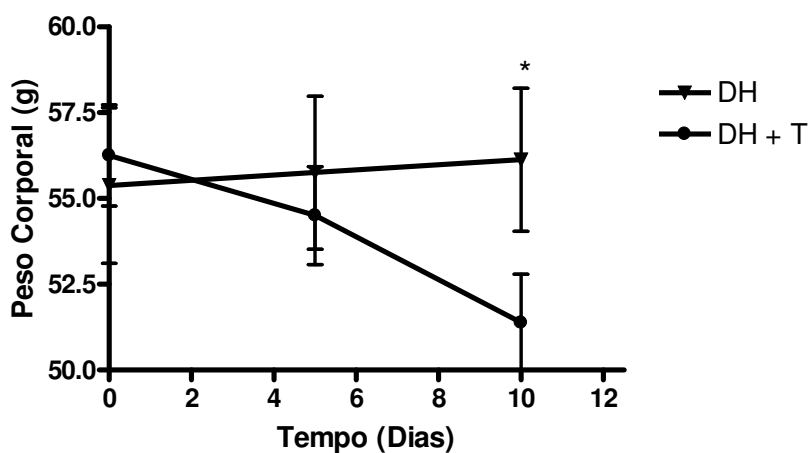


Figura 3. Ganho de peso corporal nos camundongos tratados com talidomida (DH+T; 100 mg/kg; 10 dias conforme protocolo) e que receberam a dieta hiperlipídica (DH), onde a pesagem foi realizada no primeiro, quinto e décimo dia de tratamento. Os resultados estão expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=6). *p<0,05 quando comparado com o grupo DH.

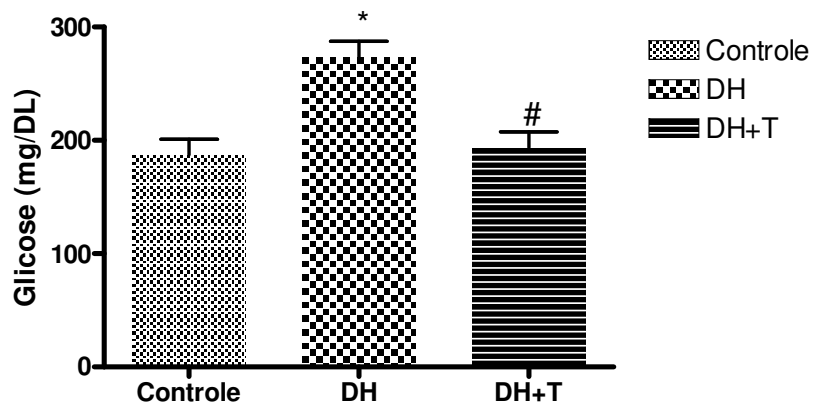


Figura 4. Glicemia de jejum nos camundongos tratados com talidomida (DH+T; 100 mg/kg; 10 dias), que receberam a dieta hiperlipídica (DH) e nos animais controle (CT). Os resultados estão expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=6). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CT. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo DH.

4.3 Análise molecular da sinalização da insulina no fígado

Na figura 5 podemos observar a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) em tirosina, desencadeada pela administração de insulina i.v. aos animais controle. Nos animais obesos o mesmo não pode ser observado e, após o tratamento com talidomida, voltamos observar a fosforilação do substrato do receptor de insulina em tirosina, confirmando molecularmente os resultados obtidos com o teste de tolerância à insulina. Também foi realizada a análise do nível de fosforilação da AKT e resultados semelhantes foram observados (Figura 6).

4.4 Níveis séricos de TNF- α e IL-6

A determinação dos níveis de TNF- α presentes no soro dos animais revelou que a manutenção da dieta hiperlipídica resulta em aumento desses níveis (388,3 \pm 96,4 pg/ml nos animais com DH e 58,8 \pm 17,3 pg/ml nos animais controle, n=15; p<0,01). Após o tratamento com talidomida os animais apresentaram uma redução significativa dos níveis séricos de TNF- α (80,0 \pm 13,9 pg/ml, n=15, p<0,05).

A determinação dos níveis séricos de IL-6 nos animais também foi realizada. Observamos que o grupo controle apresentou níveis não detectáveis desta citocina. O grupo DH apresentou valores de 30,1 \pm 6,4 pg/ml e o grupo DH tratado com talidomida apresentou valores de 33,0 \pm 4,8 pg/ml. Ou seja, os grupo DH e DH + T apresentaram valores semelhantes de IL-6 sérica.

4.5 Níveis séricos das enzimas hepáticas

Na tabela 3 podemos observar que não houve alteração nos níveis séricos de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) entre os diferentes grupos.

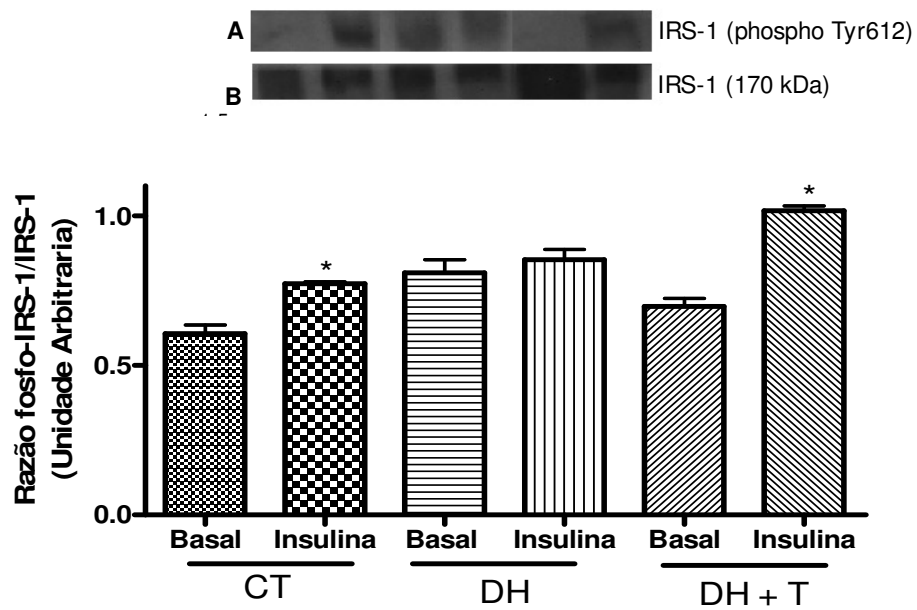


Figura 5. Níveis de fosforilação em tirosina do Substrato do Receptor de Insulina (IRS)-1 antes e após a administração de Insulina in vivo aos animais dos grupos controle (CT), dieta hiperlipídica (DH) e nos animais tratados por talidomida (DH+T). A e B – Imagem representativa de um experimento. C - Resultados expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=4). *p<0,05 quando comparado ao nível de fosforilação observado na ausência de insulina.

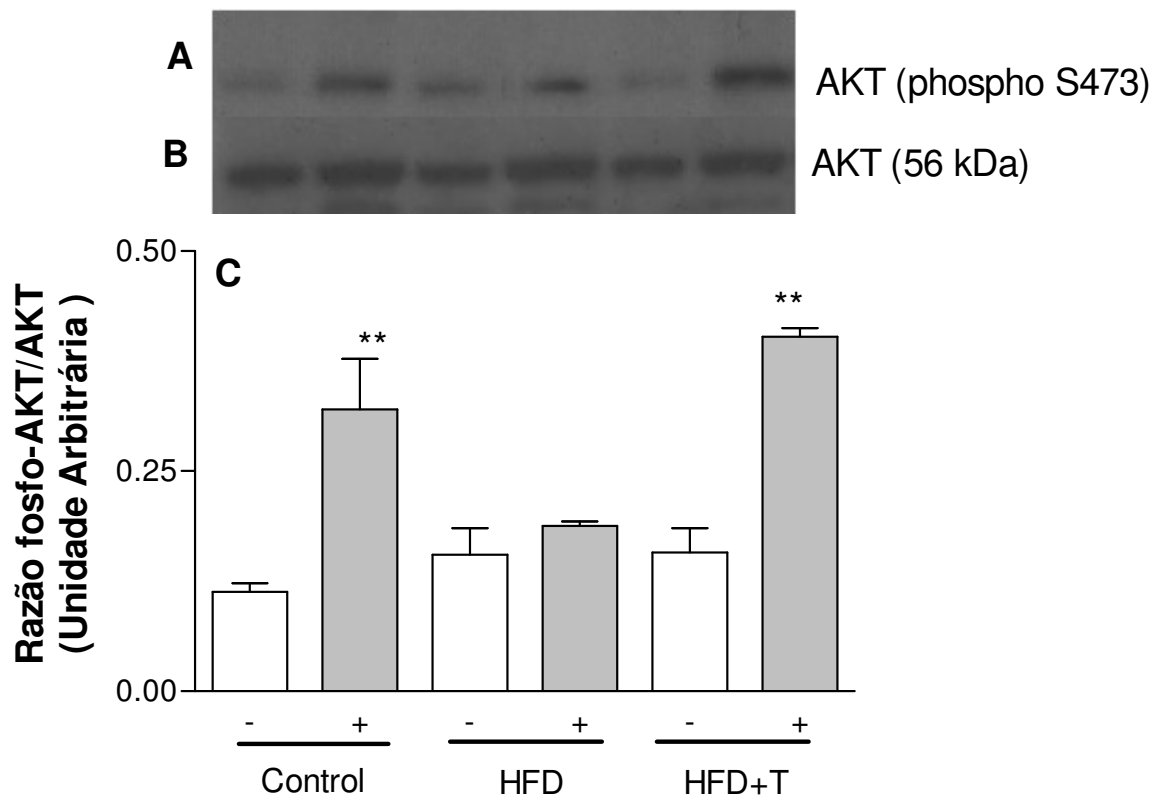


Figura 6. Níveis de fosforilação da AKT antes e após a administração de insulina *in vivo* aos animais dos grupos controle (CT), dieta hiperlipídica (DH) e nos animais tratados por talidomida (DH+T). A e B – Imagem representativa de um experimento. C - Resultados expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=4). * $p < 0,05$ quando comparado ao nível de fosforilação observado na ausência de insulina.

Tabela 3. Análise sérica de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) nos camundongos que receberam dieta padrão (CT), dieta hiperlipídica (DH) e tratados com talidomida (DH + T).

Grupo	AST (mg/DL)	ALT (mg/DL)
Controle (n = 15)	180,5 ± 12,7	35,3 ± 3,1
Dieta Hiperlipídica (n = 15)	180,3 ± 6,9	40,7 ± 3,9
Talidomida (n = 15)	161,8 ± 18,2	34,3 ± 3,1

4.5 Análise histológica do fígado

Na figura 7 podemos observar cortes histológicos de tecido hepático dos camundongos que receberam dieta padrão (CT, painel A) dos animais que receberam dieta hiperlipídica (DH, painel B) e dos animais tratados com talidomida por 10 dias (DH + T, painel C). Podemos observar no painel B a presença de esteatose, caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos. Já no painel C houve uma redução das áreas de esteatose.

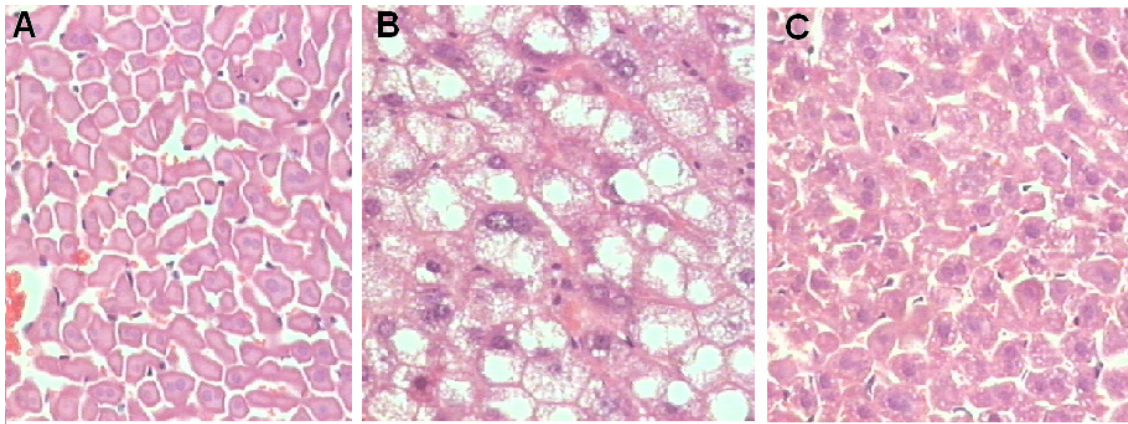


Figura 7. Corte histológico do fígado dos camundongos controle (CT, painel A), após 10 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica (DH, Painel B) e após 10 dias de tratamento com Talidomida (DH + T, painel C). Hematoxilina e Eosina com corte de 4.0 μ M de tecido hepático, 400X.

5. DISCUSSÃO

A talidomida é um fármaco atualmente utilizado no tratamento de patologias linfoproliferativas, de diversos cânceres e na hanseníase. Sabe-se que esse fármaco apresenta ação antiinflamatória, anti-angiogênica e imunossupressora (Boreges e Froehlich, 2003). Dentre os mecanismos descritos para a talidomida, está a capacidade de inibir a produção de TNF- α (Calabrese e Fleischer, 2000), uma citocina pró-inflamatória secretada pelo tecido adiposo em maiores quantidades no indivíduo obeso e, atualmente, associada à indução da resistência à insulina (Maynadier *et al.*, 2008). Por esse motivo, a talidomida foi utilizada neste estudo, como uma ferramenta farmacológica, que apresenta a capacidade de inibir a produção de TNF- α (Calabrese e Fleischer, 2000).

Camundongos mantidos com uma dieta rica em gordura saturada desenvolvem alterações glicêmicas, resistência periférica à insulina, alterações hepáticas e aumento da adiposidade, sendo considerado um bom modelo de obesidade para o estudo de características fisiopatológicas e intervenções farmacológicas (Carvalho *et al.*, 2007 e Flowers *et al.*, 2007).

Em nossos experimentos mostramos que após 12 semanas de dieta hiperlipídica os animais apresentavam um peso corporal maior que os animais que permaneceram com a ração comercial, bem como apresentavam altos valores de glicemia de jejum e, a administração de insulina i.v. não era capaz de reduzir de maneira adequada a glicemia, caracterizando a resistência à insulina. A administração de talidomida durante os últimos 10 dias do protocolo utilizado (12 semanas) foi capaz de reduzir o peso corporal, melhorar a glicemia de jejum, bem como restaurar a capacidade da insulina reduzir a glicemia nos animais que

permaneciam em dieta hiperlipídica. Em um estudo experimental descrito na literatura em que ratos Wistar foram também alimentados com dieta hiperlipídica e, posteriormente, tratados com infliximab, um anticorpo monoclonal anti-TNF- α , observou-se também uma redução do peso corporal, da glicemia de jejum e da sensibilidade periférica à insulina (Araújo *et al.*, 2007).

A análise molecular da via de sinalização da insulina no fígado, através da quantificação da forma fosforilada do substrato do receptor de insulina (IRS)-1, mostrou que o tratamento com talidomida foi capaz de restaurar a fosforilação do IRS-1 em tirosina após a administração da insulina, nos animais obesos. A fosforilação da AKT também foi analisada e seguiu o padrão de resposta observado para o IRS-1. Nossos resultados estão de acordo com o descrito por Barbuio *et al.* (2007), que demonstrou que o tratamento com infliximab também foi capaz de restabelecer a sinalização hepática da insulina via receptor de insulina (IR)/IRS/Akt/FOXO1 em ratos com obesidade experimental (Barbuio *et al.*, 2007).

Os níveis séricos de TNF- α foram mensurados e verificou-se que eram maiores nos animais obesos e reduzidos nos animais tratados com talidomida, confirmando a capacidade da talidomida em inibir a produção de TNF- α e sugerindo que essa inibição possa ser em parte responsável pela melhora dos parâmetros metabólicos e da sinalização da insulina observada. Em um estudo com seres humanos portadores de diabetes tipo 2, que utilizaram talidomida por via oral, não houve relato de melhora dos níveis glicêmicos (Iqbal *et al.*, 2000). Nesse estudo, os autores utilizaram a talidomida na dose de 150 mg, porém não demonstraram se esta dose foi suficiente para induzir uma redução da produção de TNF- α nesses pacientes. A capacidade da talidomida em inibir a produção de TNF- α é controversa e acredita-se que seja dependente da dosagem do fármaco e do tipo de célula a ser

estudada (Calabrese e Fleischer, 2000). Já os níveis de IL-6 não foram alterados pelo tratamento com talidomida. Pacientes com câncer também não mostraram redução nos níveis séricos de IL-6 após o tratamento com talidomida, somente os níveis de TNF- α foram reduzidos (Stebbing *et al.*, 2001).

Estudos demonstram que pacientes que apresentam resistência à insulina podem evoluir para esteatose hepática pelo acúmulo de triglicerídeos no fígado. A resistência à insulina aumenta a liberação de ácidos graxos pelos adipócitos resultando em níveis elevados desses no plasma. A taxa de captação desses pelo fígado é proporcional o que acaba resultando na esteatose (Browning e Horton, 2004). A melhora da capacidade de sinalização da insulina poderia ser útil na redução da formação da esteatose. Em modelo experimental prévio de obesidade Barbuio *et al* (2007) demonstraram que o bloqueio de TNF- α , com o uso de infliximab, resultou em melhora da esteatose. Neste relato, os níveis de AST e ALT não apresentaram alterações, o que determina que a função hepática estava preservada (Barbuio *et al*, 2007). No nosso experimento, os níveis séricos de AST e ALT também não diferiram entre os animais que receberam a dieta hiperlipídica e os animais do grupo controle (CT). Os animais com dieta hiperlipídica apresentaram alterações histológicas caracterizadas pela presença de esteatose. Porém, após tratamento com talidomida foi possível observar uma redução das áreas de esteatose.

A talidomida também apresenta uma ação hepatoprotetora em outros modelos experimentais, como o de cirrose induzida por CCl₄, reduzindo a mortalidade, restaurando os níveis normais de AST/ALT e a arquitetura morfológica do fígado (Muriel e col., 2003). A ação hepatoprotetora da talidomida também foi atribuída a sua capacidade de bloquear a síntese de TNF- α , pois o mesmo

desempenha um papel central na necrose celular, apoptose, falência do órgão, dano tecidual, inflamação e fibrose, processos que podem levar ao estabelecimento da cirrose (Chong e col., 2006).

Assim, a inibição da produção de TNF- α nos animais obesos parece estar relacionada a uma melhora nas condições sistêmicas e hepáticas observadas, sugerindo que drogas que bloqueiam a produção de TNF- α devam ser exploradas visando à terapêutica da obesidade. A talidomida, em particular, é um fármaco potencialmente perigoso por seu conhecido efeito teratogênico e foi utilizada neste estudo somente como uma ferramenta farmacológica capaz de inibir a produção de TNF- α .

6. CONCLUSÃO

O bloqueio da produção de TNF- α obtido neste trabalho pelo tratamento com talidomida resulta em redução do peso corporal, na glicemia de jejum, em melhora na resposta sistêmica e hepática à insulina, contribuindo para a redução da esteatose hepática. Essas respostas corroboram os achados anteriores que sugerem que o TNF- α participe no desenvolvimento de ações deletérias associadas à obesidade. O desenvolvimento e uso de drogas que inibem a síntese de TNF- α podem abrir novas fronteiras no tratamento das doenças associadas à obesidade como a resistência à insulina e a doença do fígado gorduroso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo E. P, De Souza C. T, Ueno M, Cintra D. E, Bertolo M. B, Carvalheira J. B, Saad M. J & Velloso L. A 2007 Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* **148** 5991-5997.

Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA 2005 Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology*. **314**28-37.

Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ & Velloso LA 2007 Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *Journal of Endocrinology* **194** 539-50.

Boreges LG & Froehlich PE 2003 Talidomida – Novas perspectivas para Utilização com antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. *Associação Médica Brasileira* **49** 96-102

Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C & Butturini U 1987 Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes & Metabolism* **13** 116-21.

Browning JD & Horton JD 2004 Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation* **114** 147-52.

Blackburn GL & Waltman BA 2005 Pharmacotherapy to reduce visceral fat. *Clinical Cornerstone* **7** 52-60.

Calabrese L, Fleischer AB 2000 Thalidomide: current and potential clinical applications. *American Journal of Medical*. **108** 487-95.

Carvalho AT, Souza H, Carneiro AJ, Castelo-Branco M, Madi K, Schanaider A, Silva F, Junior F.A.P, Pereira MG, Tortori C, Dines I, Carvalho J, Rocha E, Elia C 2007 Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS- induced colitis: Synergistic effects on TNF- α , IL-12 and VEGF production. *World Journal Gastroenterol* **13** 2166-73

Chen J, Wang L, Boeg YS, Xia B, Wang J 2002 Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. *Journal of Endocrinology* **175** 499-504

Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC & Huang YT 2006. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *Journal of Biomedical Sciences* **13** 403-418.

De Taeye BM, Novitskaya T, McGuinness OP, Gleaves L, Medda M, Covington JW & Vaughan DE 2007 Macrophage TNF-alpha contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **293** E713-E725.

Dredge K, Marriott JB & Dalglish AG 2002 Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Critical Review of Immunology* **22** 425-37.

Fantuzzi G 2008 Three questions about leptin and immunity. *Brain Behav Immunology* (em impressão)..

Flowers JB, Rabaglia ME, Schueler KL, Flowers MT, Lan H, Keller MP, Ntambi JM, Attie AD 2007 Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice. *Diabetes* **56** 1228-39.

Guimarães DED, Sardinha FLC, Mizurini DM, Carmo MGT 2007 Adipocitocinas: Uma nova visão do Tecido Adiposo *Revista de Nutrição* **5** 549-559

GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MM 1948 Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry* **2** 751-66

Goldstein BJ, Scalia R 2004 Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. **89** 2563-68.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF & Spiegelman BM 1996 IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271** 665-68.

Hotamisligil GS 1999 Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance .*Experimental Clinlinical of Endocrinology Diabetes* **107** 119-25

Hotamisligil GS 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444** 860-67.

Iqbal N, Zayed M & Boden G 2000 Thalidomide impairs insulin action on glucose uptake and glycogen synthesis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23** 1172-76.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM 2002 Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obesity* **10** 1-5.

Kopelman PG 2000 Obesity as a medical problem *Nature*. **6** 635-43.

Lam QL & Lu L 2007 Role of leptin in immunity. *Cellular and Molecular Immunology* **4** 1-13.

- Maeda N, Funahashi T 2004 Adiponectin knockout mice *Nippon Rinsho* **62** 1067-76
- Mancini MC, Halpern A ,2002 Pharmacological treatment of obesity. *Arquivo brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* **50** 377-89
- Maynadier M, Basile I, Gary-Bobo M 2008 Adiponectin normalization: a clue to the anti-metabolic syndrome action of rimonabant. *Drug Discovery Today (em impressão)*
- Monthe I, Van Obberghen E 1996 Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on mutipless serine residues *Journal of Biological Chemistry* **271** 1122-27
- Muriel P, Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Lara-Ochoa F, Ponce S, García J, Shibayama M & Tsutsumi V 2003 Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15** 951-57.
- Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB & Saad MJ 2008 Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *Journal of Physiology* **586** 659-71.
- Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC 2008 Adipokines and insulin resistance. *Molecular Medical* **14** 741-51
- Ramos EJ, Xu Y, Romanova I, Middleton F, Chen C, Quinn R, Inui A, Das U 2003 Meguid MM Is obesity an inflammatory disease *Surgery* **134** 329-35
- Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA 1996 Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat *J Biol Chem.* **6** 271

Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S 2003 Sprott H. Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia *Journal of Rheumatology* **30**146-50

Saltiel AR, Kahn CR 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **686** 799-806.

Sennello JA, Fayad R, Morris AM, Eckel RH, Asilmaz E, Montez J, Friedman JM, Dinarello CA, Fantuzzi G 2005 Regulation of T cell-mediated hepatic inflammation by adiponectin and leptin. *Endocrinology*. **146** 2157-64

Sistema de Vigilância Sanitária / Ministério da Saúde 1997 Portaria n 354 15 de dezembro de 1997.

Stebbing J, Benson C, Eisen T, Pyle L, Smalley K, Bridle H, Mak I, Sapunar F, Ahern R, Gore ME 2001 The treatment of advanced renal cell cancer with high-dose oral thalidomide *Journal of Cancer* **7** 953-8.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS 1997 Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function *Nature* **9** 610-4.

Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ 1998 Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovascular* **1** 96-102.

Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE 2007 Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future *Hepatology*. **46** 582-9

World Health Organization Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva Switzerland 2003.

Zeng G, Nystrom F H, Rachichandran L V, Cong L N, Kirby M 2000 Roles for receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin – signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* **101** 1539-45

Zeyda M & Stulnig TM 2007 Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters* **112** 61-67.

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa 1996 Protein Kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **271** 3359-3362