

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE FFA/GPRs NO TECIDO
ADIPOSO DE CAMUNDONGOS OBESOS, RESISTENTES À OBESIDADE E APÓS
EMAGRECIMENTO.**

Thainá Rodrigues de Moraes¹, Cíntia Rabelo e Paiva Caria ² e Alessandra Gambero ³.

Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil

Laboratório de Farmacologia e Biologia Molecular/ Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – UNIFAG

Avenida São Francisco de Assis, 218, Bragança Paulista, São Paulo, 12.916-990, Brasil.

thayna_tha.5991@hotmail.com

RESUMO

Introdução: Recentemente tem sido demonstrado que ácidos graxos livres (Free fatty acids; FFA) podem atuar diretamente em receptores que atuam como sensores de nutrientes sinalizando informações sensoriais (paladar) e não-sensoriais, como a liberação de hormônios enteroendócrinos e inflamação. O FFA2/GPR43 e FFA3/GPR41 atuam como receptores para ácidos graxos de cadeia curta enquanto o FFA4/GPR120 parece ser ativado predominantemente por ácidos graxos de cadeia longa da série ômega-3. **Objetivo:** analisar a expressão de FFAs/GPRs no tecido adiposo de forma comparativa em animais magros, obesos, resistentes à obesidade e que perderam peso com restrição calórica, buscando correlacionar com a produção de hormônios intestinais e o grau de inflamação no tecido adiposo. **Métodos:** Avaliação da expressão proteica de FFAs/GPRs no tecido adiposo através do *Western Blot*, avaliação do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo por Citometria de fluxo, avaliação da produção de adipocinas por Kit de Multiplex, quantificação de níveis séricos basais das incretinas e outros sinalizadores intestinais e metabólicos. **Resultados:** No tecido adiposo foi observada uma expressão aumentada de GPR120 em níveis semelhantes aos animais obesos, sugerindo que possa estar relacionado ao infiltrado de macrófagos, mas não à inflamação ou ao processo de adipogênese que ocorreu inicialmente durante a expansão do tecido adiposo. A expressão de GPR120 no tecido adiposo dos animais resistentes à obesidade foi semelhante aos animais controle, embora estes apresentem inflamação no tecido adiposo. **Conclusão:** Concluímos que a avaliação da expressão do GPR120 no tecido adiposo mostra uma possível correlação com a expansão do tecido adiposo (adipogênese) e/ou com a presença de um infiltrado de macrófagos (que se mantém mesmo após o emagrecimento) e que sua ativação geral atenua a produção de citocinas pró inflamatórias nos animais obesos.

Palavras-chave: Adipocinas, Inflamação, Obesidade, Sensores de nutrientes, Tecido adiposo

ABSTRACT

Introduction: It has recently been shown that free fatty acids (FFA) can act directly on receptors that act as nutrient sensors signaling sensory (taste) and non-sensory information, such as releasing enteroendocrine and inflammation hormones. The FFA2 / GPR43 and FFA3 / GPR41 as a receptor for short-chain fatty acids while the FFA4 / GPR120 appears to be activated predominantly by long-chain fatty acids of the omega-3 series. **Objective:** Thus, this project aims to analyze the expression of FFAs / GPRs in the intestine and adipose tissue in a comparative way in lean animals, obese, obesity-resistant and obese that have lost weight with calorie restriction, seeking to correlate with the production of intestinal hormones and degree of inflammation in adipose tissue. **Methods:** Evaluation of the protein expression of FFAs / GPRs in adipose tissue through *Western Blot*, evaluation of infiltrating inflammatory cells in adipose tissue by Flow cytometry, evaluation of adipokine production and basal serum incretin levels by Multiplex Kit. **Results:** Increased expression of GPR120 at levels similar to obese animals was observed in adipose tissue, suggesting that it may be related to macrophage infiltrate but not to the inflammation or adipogenesis process that occurred initially during the expansion of adipose tissue. The expression of GPR120 in the adipose tissue of obesity-resistant animals was similar to control animals, although they exhibited inflammation in adipose tissue. **Conclusão:** At the end of the project, it was concluded that the evaluation of the expression of GPR120 in the adipose tissue shows a possible correlation with the adipose tissue expansion (adipogenesis) and / or the presence of a macrophage infiltrate (which remains even after slimming) and that its general activation attenuates the production of proinflammatory cytokines in obese animals.

Keywords: Adipocine, Inflammation, Intestine, Obesity, Nutrient sensors, Adipose tissue

1. INTRODUÇÃO

Lípídeos constituem o grupo de macronutrientes que tem recebido mais atenção quando se discute a obesidade e suas complicações, que incluem o diabetes tipo-2 (T2D) e as doenças cardiovasculares. O tipo de lípídeo que se ingere é extremamente importante e fica cada vez mais evidente que a identificação de ácidos graxos deveria ir além das classificações gerais em saturados, monossaturados, ômega-3, ômega-6 e gorduras trans (Uven *et al.*, 2015). Ácidos graxos também podem ser classificados de acordo com o comprimento da cadeia, sendo os ácidos graxos de cadeia curta (short-chain fatty acids, SCFAs) os que contêm entre 2 e 6 átomos de carbono, ácidos graxos de cadeia média (medium-chain fatty acids, MCFAs) os que contêm entre 7 e 12 átomos de carbono, ácidos graxos de cadeia longa (long-chain fatty acids, LCFAs) os que contêm entre 13 e 22 átomos de carbono e ácidos graxos de cadeia muito longa (verylong-chain fatty acids) os que contem acima de 22 átomos de carbono.

Ácidos graxos livres (Free fatty acids; FFA) podem atuar como precursores de mediadores químicos, alterar as propriedades físicas de membranas celulares, modificar a atividade de fatores de transcrição gênica, mas também podem diretamente sinalizar através de receptores que atuam principalmente como sensores de nutrientes (Vinolo *et al.*, 2012). Várias classes de receptores com sete domínios transmembrânicos têm sido identificadas como sensores de nutrientes. Em 2003, o GPR40 foi identificado como o receptor de ácidos graxos de cadeia longa/cadeia média (Briscoe *et al.*, 2003), enquanto o GPR43 e GPR41 foram identificados como receptores para ácidos graxos de cadeia curta (Brown *et al.*, 2003). Subsequentemente, GPR40, GPR43 e GPR41 foram renomeados para FFA1, FFA2 e FFA3 (Stoddart *et al.*, 2008). O receptor FFA1 (GPR40) foi identificado em células beta-pancreáticas como responsável por sinalizar a secreção de insulina a partir de ácidos graxos e em células endócrinas no trato digestório mediando a liberação de incretinas (Itoh *et al.*, Edfalk *et al.*, 2013). O gene do GPR120 foi também descrito em 2003 e recebeu especial atenção quando se

descobriu que este receptor era ativado por ácidos graxos promovendo a liberação da incretina peptídeo tipo-glucagon (GLP-1) e protegendo a célula endócrina que o produz (Hirasawa *et al.*, 2005). O GPR120 foi recentemente renomeado como FFA4 e acredita-se que seja ativado predominantemente por ácidos graxos de cadeia longa da série ômega-3 (Davenport *et al.*, 2013). Os receptores de FFA têm sido objeto de muitos estudos, pois, suas atividades não estão restritas a funcionarem como sensores de nutrientes, mas também como capazes de regular processos inflamatórios e metabólicos, podendo se constituir potenciais alvos-terapêuticos na descoberta de novas drogas ou em intervenções dietéticas (Dranse *et al.*, 2013). A idéia de que estes receptores atuem como sensores de lipídeos do ponto de vista sensorial tem sido cada vez mais aceita. O paladar é mediado pela ativação de receptores gustativos localizados predominantemente na língua, e a detecção de lipídeos parece estar localizada nas papilas circunvaladas e foliadas, pela presença de CD36, FFA1/GPR40 e FFA4/GPR120 (Mattes, 2009). CD36 ou translocase de ácidos graxos é uma proteína de membrana presente também em células gustativas que parece atuar como ponto de ligação de ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados (Laugerette *et al.*, 2005). Embora triglicerídeos constituam a maioria dos lipídeos dos alimentos, a percepção oral deve ser desencadeada por ácidos graxos de cadeias longas, sendo dependente da presença e atividade de lipases linguais que quebrariam estes triglicerídeos liberando pequenas porções de ácidos graxos de cadeias longas (Kawai e Fushiki., 2003). Como já citado, estes receptores para ácidos graxos estão expressos em diferentes tecidos, bem como nestes diferentes tecidos também é possível encontrar receptores gustativos e olfativos mediando ações não-sensoriais. Os receptores FFA1/GPR40, FFA2/GPR43, FFA3/GPR41, GPR119 e FFA4/GPR120 são expressos no trato digestório e a ativação destes receptores estimula a secreção de GLP-1 e do peptídeo insulinoatrópico glicosedependente (GIP) pelas células enteroendócrinas como já citado anteriormente. A composição da dieta pode interferir com a expressão destes receptores

em cavidade oral ou no intestino. Zhang e colaboradores demonstraram que a expressão de mRNA para CD36 era reduzida em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica sugerindo uma redução na habilidade destes em detectar lipídeos que poderia resultar numa maior ingestão destes (Zhang *et al.*, 2011). Já a expressão de FFA4/GPR120 no intestino encontra-se aumentada em ratos obesos independente do tipo de dieta empregada (hiper ou normolipídica) ou seja, não parece ser regulado por componentes da dieta (Pulsen *et al.*, 2014). A expressão gênica aumentada de FFA1/GPR40, FFA3/GPR41 e FFA4/GPR120 também se mostrou aumentada em ratos susceptíveis à obesidade quando comparado à ratos resistentes à obesidade, que também apresentavam reduzida capacidade de produzir GLP-1, colecistocinina (CCK) e peptídeo YY quando comparados a ratos resistentes à obesidade (Duca *et al.*, 2013). No tecido adiposo branco observa-se a expressão de FFA2/GPR43 e FFA4/GPR120. A linhagem celular de adipócitos 3T3-L1 também expressa o FFA4/GPR120 (Oh *et al.*, 2010). Mas, o estado inflamatório que se estabelece no tecido adiposo durante a obesidade é também capaz de alterar o padrão desta expressão. Macrófagos infiltrados durante o processo inflamatório, por exemplo, são capazes de causar alterações na expressão de FFA4/GPR120 nos adipócitos (Trayhurn e Denyer *et al.*, 2012). Mas, a suplementação com ácidos graxos ômega-3 com subsequente ativação de FFA4/GPR120 em monócitos ou macrófagos peritoneais resulta em resposta anti-inflamatórias. A propensão ao desenvolvimento da obesidade é variável em humanos, sugerindo a existência de indivíduos resistentes e indivíduos suscetíveis à obesidade (Garland *et al.*, 2011). A definição de resistência à obesidade do ponto de vista experimental se dá quando animais experimentais são submetidos à dieta hiperlipídica e exibem diferenças significativas no peso corporal e, apesar da condição de alta ingestão energética, o peso corporal aumenta lentamente, mantendo-os magros e num estado saudável. Explorar a fisiologia destes indivíduos poderia trazer o conhecimento adicional e favorecer o desenvolvimento de novas drogas para o

controle da obesidade. Levin e colaboradores demonstraram que cerca de 50% de ratos Sprague-Dawley são capazes de ganhar peso quando submetidos a uma dieta hiperlipídica, mas o restante não (Ding *et al.*, 2015). Estas características são mais presentes em linhagens experimentais resultantes do acasalamento ao acaso (outbreed) e refletem mais a variação presente na população da sociedade moderna.

A expressão de FFAs/GPRs, como vimos, está aumentada no intestino de animais resistentes à obesidade quando comparado aos obesos (Fam *et al.*, 2015), sugerindo que a sinalização no trato gastrointestinal realmente desempenha uma função importante no estabelecimento desta condição. Camundongos resistentes à obesidade apresentam um aumento na expressão ileal de FFA1/GPR40, mas a expressão de FFA4/GPR120, GPR119, FFA3/GPR41 no íleo, bem como a produção de GLP-1 estava reduzida. Embora resistentes à obesidade, estes camundongos apresentam uma expressão gênica maior de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo, embora a expressão dos GPRs não tenha sido ainda avaliada neste local (Fam *et al.*, 2015).

Dietas restritivas que levam a perda de peso costumam ser a terapia escolhida pelos pacientes e clínicos para controlar as alterações deletérias da obesidade, apesar do limitado sucesso em longo prazo (Ochner *et al.*, 2013). Não há dados experimentais sobre o efeito da perda de peso após indução da obesidade sobre a expressão destes sensores de nutrientes nos diferentes locais (intestino e tecido adiposo) e compreender se o emagrecimento restaura ou não a expressão normal destes receptores pode auxiliar na compreensão dos mecanismos que predisõem estes indivíduos ao reganho de peso.

Deste modo, buscamos ampliar nosso conhecimento sobre as alterações na expressão destes sensores de nutrientes determinadas pela obesidade, pela resistência a obesidade e pelo processo de emagrecimento em dois locais importantes e que podem potencialmente contribuir para as alterações metabólicas e inflamatórias observadas nestas condições.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss com 5 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas individuais e mantidos no Biotério da UNIFAG, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Os animais foram pesados semanalmente e tiveram a ingestão de ração monitorada.

2. Grupos experimentais

Ao completarem 5 semanas de idade, os animais foram divididos inicialmente em dois grupos, onde um grupo recebeu dieta padrão AIN-93 (grupo CN) e o outro grupo recebeu dieta hiperlipídica preparada em nosso laboratório conforme Tabela 1.

Após 8 semanas, o grupo mantido em DH foi redividido como se segue (Figura 1):

- Grupo DH – mantido por 8 semanas adicionais com DH;
- Grupo Restrição Calórica (animais obesos submetidos à restrição calórica substituindo-se a dieta hiperlipídica por dieta padrão AIN-93; Grupo RC).
- Grupo Resistente a Obesidade (animais que não ganharam peso nas 8 semanas iniciais e foram mantidos por mais 8 semanas em DH; Grupo ROb) ;

Tabela 1. Composição de macronutrientes da dieta

	Dieta (comercial)	Padrão	Dieta Hiperlipídica	
	g/kg	Kcal/kg	g/kg	Kcal/kg
Amido de milho	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	528
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

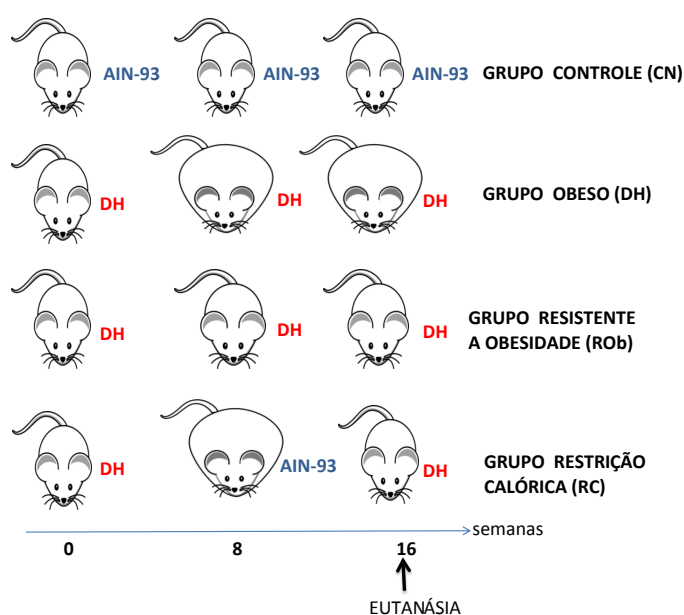


Figura 1. Grupos e tempos experimentais conforme a dieta e tempo de eutanásia.

3. Glicemia basal e Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e, então foi realizada uma pequena incisão na cauda de cada animal para coleta de uma pequena gota de sangue para determinação da glicemia basal utilizando-se o glicosímetro. Para o ITT, os animais receberam via i.p. 1,5 U/kg de insulina e os níveis glicêmicos foram avaliados após 5, 10, 20 e 30 minutos. Os valores glicêmicos foram ajustados em um modelo linear e o coeficiente angular da curva foi obtido no programa GraphPadInstat (kITT).

4. Análise de metabolismo por calorimetria indireta

Calorimetria indireta foi avaliada utilizando o sistema Oxylet/Physiocage (Panlab, Barcelona, Espanha), em que os animais foram colocados individualmente em câmaras respiratórias (temperatura: 22-23° C, umidade: 45-55%, ciclo claro escuro 12/12 hs) com fluxo de ar de 0,5 L/min. Durante as 24 hs de análise, O₂ (%) e CO₂ (%) foram medidos a cada 9 minutos. O consumo de O₂, de CO₂ e o gasto energético (Kcal/h/kg^{0.75}) foram calculados pelo Software Metabolism (Panlab).

5. Sacrificio dos animais e coleta de materiais

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e, então foram anestesiados com uma mistura 1:1 v/v de cetamina 100mg/ml e xilasina 2% no volume de 0,3 uL para cada 100g de peso corpóreo, visando uma anestesia profunda. Gotas de sangue caudal foram coletadas para quantificação de triglicérides e colesterol total utilizando o dispositivo portátil Accutrend Plus (Roche Diagnostics). A coleta de sangue nos camundongos foi realizada por punção cardíaca. O sangue foi coletado utilizando seringa sem anticoagulante.

Os estoques de tecido adiposo (epididimal, subcutâneo, perirenal e mesentérico), fígado e o músculo gastrocnêmio foram retirados, pesados e os valores expressos como porcentagem do peso corporal. Biópsias de tecido adiposo e intestino foram coletadas e armazenadas a seco para posterior utilização. O animal foi submetido à eutanásia pela retirada do coração sob efeito do anestésico.

6. Obtenção de células e caracterização do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo.

Biópsias de tecido adiposo epididimal foram fragmentadas em solução contendo collagenase (1mg/ml) e incubados com agitação constante (velocidade 100 rpm) em banho-maria a 37°C,

durante 45 min. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado coletado e filtrado em malhas de 150 µm e posteriormente em 37µm. As células obtidas foram utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo.

Para a análise do infiltrado de células inflamatórias do tecido adiposo visceral, as células obtidas na etapa descrita anteriormente foram contadas e a suspensão celular ajustada para conter 1×10^6 células/mL. A suspensão celular foi aliqotada em tubos plásticos e incubadas com 2,5 µL de anticorpo conjugado com fluorocromos conforme Tabela 2, por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Após a incubação as células foram lavadas e ressuspensas em PBS para leitura imediata. A expressão de marcadores de superfície celular foi avaliada utilizando um Citômetro Capilar (Guava easyCyte 5HT). Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra. O software utilizado na leitura e análise foi o InCyte.

Tabela 2. Marcação celular para análise por citometria do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo.

Nome do tubo	Conteúdo
Branco	Somente suspensão celular
CD45+	CD45+ (PerCP)
Macrófago	CD14+ (FITC) F4/80+ (PE) CD11b+ (PerCP)

Fernanda Roversi 28/10/2017 19:42

Deleted: -

7. Avaliação da inflamação no tecido adiposo

Biópsias de tecido adiposo congeladas à seco foram homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinin 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM para a extração de proteínas. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C, 45 min. O infranadante das amostras foi coletado. Os extratos de tecido adiposo obtidos foram utilizados na avaliação das concentrações de adiponectina, leptina, IL-6 e MCP-1 por kit Milliplex Mouse Adipocyte MADCYMAG-72K (Millipore, Billerica, MA, USA). A expressão de IL-10 e TNF- α foram avaliadas por kits comerciais (Quantikine Elisa mouse IL-10, R&D Systems, MN, USA; TNF alpha Mouse Elisa Kit, Abcam, Cambridge, UK respectivamente). O resultado da dosagem de proteínas foi utilizado na correção da quantidade de cada analito quantificado.

8. Avaliação da expressão proteica por *Western blot*

Biópsias de tecido adiposo e de intestino congeladas à seco foram homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinin 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM para a extração de proteínas. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C, 45 min e o sobrenadante das amostras foi coletado. Parte dos extratos de tecido adiposo obtidos foram utilizados para a dosagem de proteínas, e o restante, adicionado 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 100 mM e as amostras foram aquecidas em água fervente por 5 min., aplicadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separadas por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas

de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos anti-FFA2/GPR43, anti-FFA4/GPR120 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. – Santa Cruz, Califórnia, USA) e anti-vinculin (Abcam) *overnight* a 4°C antes de serem reveladas com Kits comerciais de quimioluminescência (GE HealthcareBio-Sciences AB, UK).

9. Quantificação sérica de hormônios metabólicos

Os níveis séricos de grelina, GIP, GLP-1, amilina, PP, insulina, leptina e PYY foram quantificados utilizando kit Multiplex Gut Hormones (Millipore, Billerica, MA, USA) conforme instruções do fabricante.

10. Quantificação dos níveis teciduais de DHA e EPA no tecido adiposo visceral

Amostras de tecido adiposo foram homogeneizadas em clorofórmio e metanol (2: 1 v / v) e uma solução aquosa de KCl foi adicionado (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957). A camada de clorofórmio foi seco sob N₂, e o extrato total foi convertido em metilo Ésteres de FA usando metanol BF₃, de acordo com o método delineado pela American Oil Chemist's Society (AOCS), A. O. C. S., (1993). Os ésteres metílicos serão diluídos em hexano e analisados por cromatografia gasosa usando um cromatógrafo de gás CHROMPACK® (modelo CP 9001; Chrom Tech, Inc., Apple Valley, MN, EUA) com uma ionização de chama, um detector e uma coluna capilar CP-Sil 88 (Chrompak, WCOT Fused Sílica 59 m × 0,25 mm).

A identificação de DHA e EPA será realizada comparando os tempos de retenção dos componentes da amostra com padrões autênticos (Sigma, St. Louis, MO, EUA) de ésteres de

FA injetados nas mesmas condições. A composição de FA, como porcentagem do peso total do ácido, será calculada usando contagens de área do cromatograma. As análises estão sendo realizadas pela Dra. Débora Konno e Dra. Gabriela Alves Macedo da FEA/Unicamp.

11. Análise histológica do tecido adiposo subcutâneo

As amostras de tecido adiposo subcutâneo foram fixadas em 10% de formalina tamponada e depois processadas para coloração com hematoxilina e eosina como descrito anteriormente (Beaudoin et al., 2013). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 40 ×. A avaliação da presença e adipócitos multiloculares foi realizada em por um observador que desconhecia os grupos experimentais (avaliação cega) utilizando as imagens captadas pelo microscópio ótico.

12. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (EPM) dos experimentos realizados. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido e pós-teste de *Dunnet e Test t Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3. RESULTADOS

1. Parâmetros antropométricos e metabólicos

Após 16 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, os camundongos obesos (DH) apresentaram uma alteração significativa no peso corpóreo (Figura 2), adiposidade (Figura 3), e um alta ingestão calórica (Figura 4) quando comparados aos animais do grupo controle (CN). Os animais que foram submetidos à restrição calórica (grupo RC) moderada por 8 semanas, ao final deste período, apresentaram uma redução significativa no peso corpóreo (Figura 2) e de adiposidade (Figura 3) não apresentando diferenças em relação ao grupo CN.

Os níveis glicêmicos de jejum encontrados no grupo RC estavam iguais aos animais do grupo CN (Figura 5) e a capacidade de reduzir a glicemia em resposta a insulina pelo teste de tolerância à insulina estava restaurada após a perda de peso do grupo RC (Figura 6). Nos animais DH, pode-se observar o aumento da glicemia de jejum bem como a resistência à insulina, pelo menor valor da constante de decaimento da insulina durante o ITT (Figuras 5 e 6). Os animais do grupo RC apresentaram a concentração sérica de colesterol e de triglicerídeos alterada se compararmos ao grupo CN (Figura 7).

Podemos observar que os animais resistentes à obesidade (Rob) não ganham peso igual aos obesos apesar da alta ingestão energética dada pela dieta hiperlipídica (Figura 4). Os níveis glicêmicos são maiores do que os animais controle (Figura 5) e apesar da pouca adiposidade, mas presente quando se corrige pelo peso corporal final, apresentam resistência periférica à insulina (Figura 6) pois os valores da constante do teste de tolerância à insulina são menores se comparados ao grupo controle (CN). A concentração sérica de colesterol e de triglicerídeos se mostra semelhante ao grupo Controle (Figura 7). O gasto energético dos animais dos grupos controle e ROb não apresentam diferenças significativas entre si, sendo um gasto energético maior que o do Obeso e o RC (Figura 8).

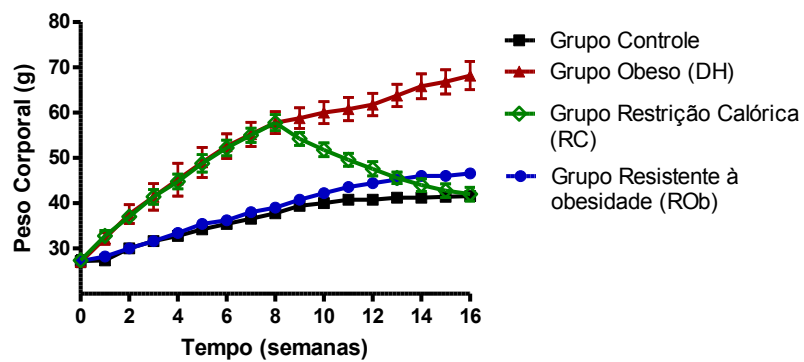


Figura 2. Peso corporal dos animais do grupo Controle, Grupo obeso (DH), resistentes à obesidade (Rob) e obesos submetidos à restrição calórica que resultou em emagrecimento (Grupo RC).

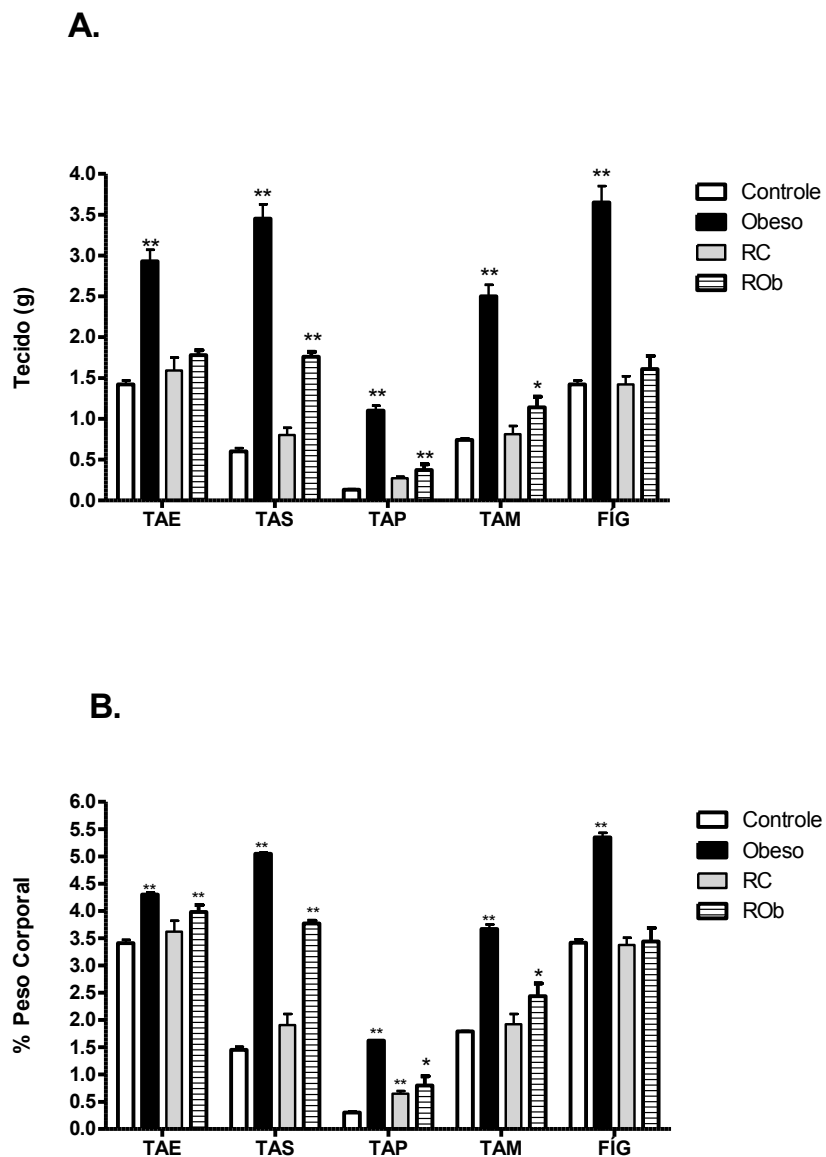


Figura 3. Avaliação dos estoques em gramas (A) e porcentagem (B) de tecido adiposo epididimal (TAE), subcutâneo (TAS), perirenal (TAP), mesentérico (TAM) e fígado (FÍG) dos animais Controle, Obeso, RC e ROb em 16 semanas de dieta. Os valores estão

apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais. Sendo $*p<0,05$ e $**p<0.01$ quando comparado com o grupo Controle.

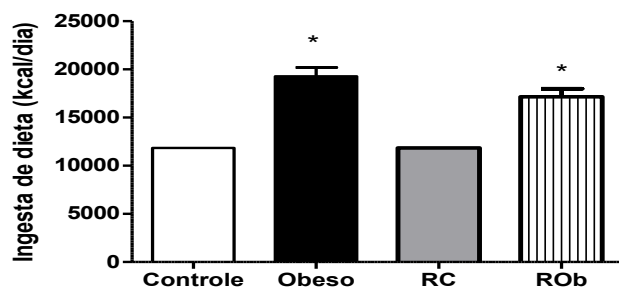


Figura 4. Ingestão calórica diária dos animais mantidos em AIN-93 (Controle), Obesos mantidos em dieta hiperlipídica (DH) e animais resistentes à obesidade mantidos em dieta hiperlipídica (ROb). Sendo $*p<0,05$ quando comparado com o grupo Controle.

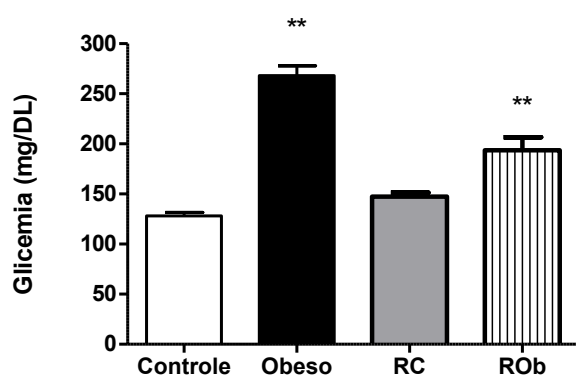


Figura 5. Níveis glicêmicos dos animais Controle, Obeso, RC e ROb. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais. ** $p < 0.01$ quando comparado com o grupo Controle.

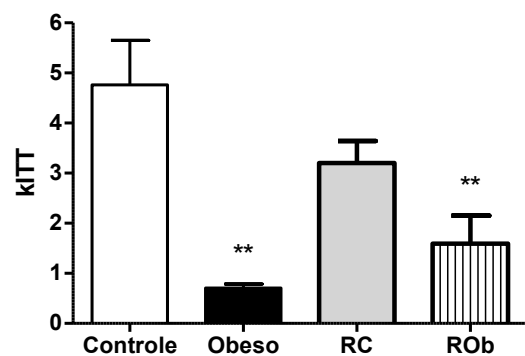


Figura 6. Teste de tolerância à insulina dos animais Controle, Obeso, RC e Rob. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais. ** $p < 0.01$ quando comparado com o grupo Controle.

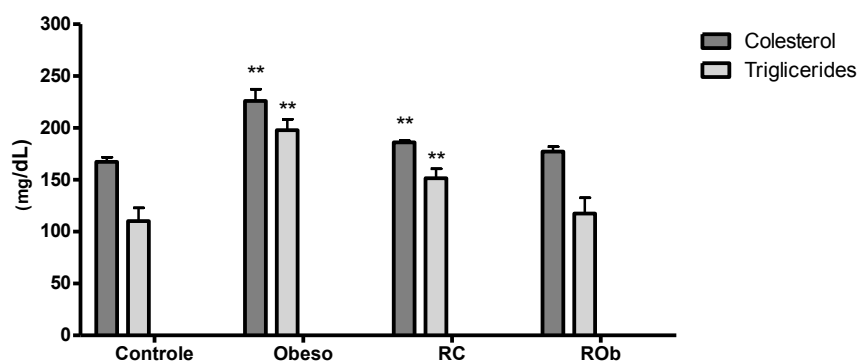


Figura 7. Concentração sérica de colesterol e de triglicerídeos dos animais Controle, Obeso, RC e ROb. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais, sendo ** $p < 0.01$ quando comparado com o grupo Controle.

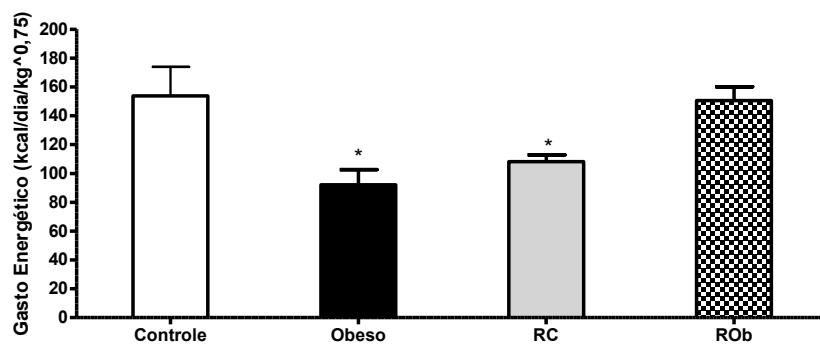
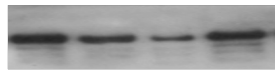


Figura 8. Gasto energético dos grupos Controle, Obeso, RC e ROb. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais, sendo * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Controle.

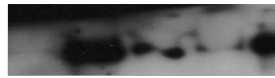
2. Avaliação da expressão proteica de FFA2/GPR43 e FFA4/GPR120 no tecido adiposo visceral e subcutâneo.

Avaliamos a expressão proteica dos receptores de FFAs, GPR43 e GPR120 no tecido adiposo visceral dos animais dos diferentes grupos experimentais. A expressão proteica do receptor GPR 43 não se mostra com diferenças significativas entre os grupos (Figura 9). Já a expressão de GPR 120 se mostra aumentada nos animais dos grupos Obesos e RC (Figura 9). Não houve detecção proteica dos GPRs no tecido adiposo subcutâneo (dado não mostrado).

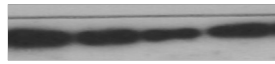
A.



FFA2/GPR43 (34 kDa)



FFA4/GPR120 (52 kDa)



VINCULIN (124 kDa)

B.

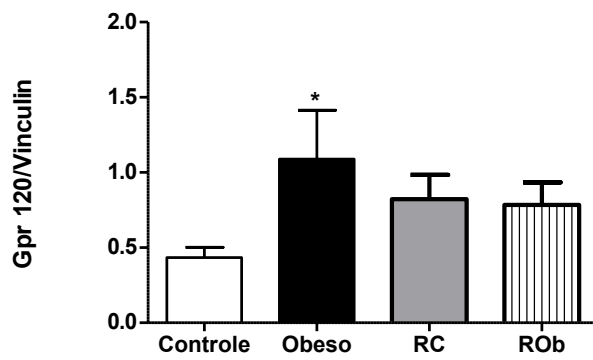
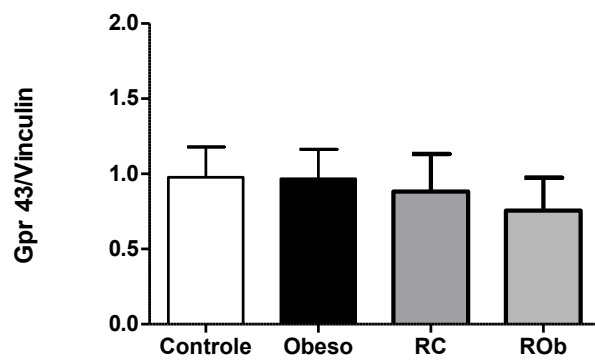


Figura 9. Expressão proteica de GPR 43, GPR 120 e Vinculin (constitutivo) no tecido adiposo visceral dos animais controle (CN), obesos (DH), emagrecidos (RC) e resistentes à obesidade (Rob). A. Imagens representativa de um experimento B. As barras representam os valores de média e erro padrão (EPM) de 3 animais, * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Controle.

3. Avaliação do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo visceral

Observamos um aumento significativo de leucócitos no tecido adiposo visceral dos animais obesos (DH) e também nos emagrecidos (RC) (Figura 10). O infiltrado de macrófagos se encontrou aumentado no grupo Obeso (DH) e RC. Não foram observadas diferenças no infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo dos animais resistentes à obesidade (Rob), quando comparados aos animais do grupo controle pela alta variação de resultados encontrada neste grupo.

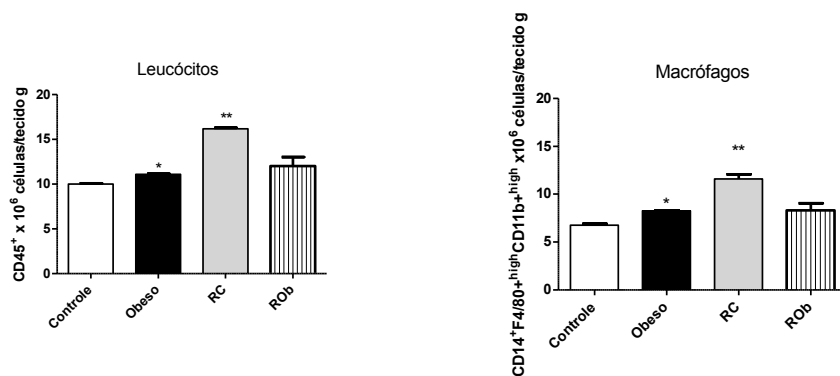


Figura 10. Leucócitos infiltrados no tecido adiposo dos animais Controle, Obeso, RC e ROb. Leucócitos (CD45+); Macrófagos (CD14+F4/80+CD11b+); * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparado com o grupo Controle.

4. Avaliação da produção de adipocinas no tecido adiposo visceral

Os animais obesos apresentaram níveis aumentados de MCP-1, leptina e TNF- α , e reduzidos de adiponectina quando comparado ao grupo controle. Os níveis de IL-6 e IL-10 não diferiram nos grupos experimentais. Nos animais do grupo RC não se observaram diferenças nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias tais como MCP-1 e leptina quando comparados ao controle, mas os níveis de TNF- α se mantiveram ainda aumentados bem como os níveis de adiponectina continuaram reduzidos após a perda de peso nos animais do Grupo RC. Os animais ROb apresentaram níveis aumentados de MCP-1 e reduzidos de adiponectina quando comparado aos CN (Figura 11).

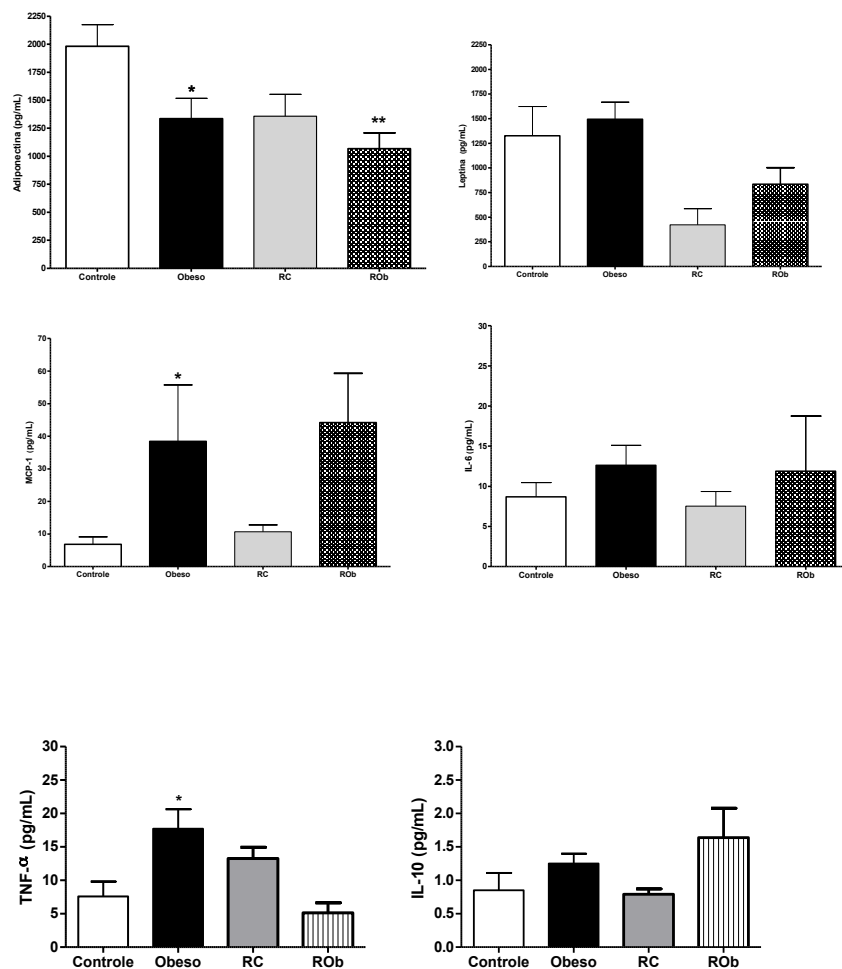


Figura 11. Adipocinas anti- e pró-inflamatórias no tecido adiposo visceral dos animais Controle, Obeso, RC e ROb. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais. *p<0.05 e **p<0.01 quando comparado com o grupo Controle.

5. Quantificação de níveis séricos basais das incretinas e outros sinalizadores intestinais ou metabólicos.

Os animais do grupo obeso apresentaram aumento dos níveis séricos basais de incretinas como o GIP (Figura 12). Os níveis séricos de insulina e leptina também estão aumentados nos animais obesos e nos animais ROb, enquanto os níveis de amilina, PP estavam reduzidos (Figura 12). Reduções de amilina foram também observadas nos grupos RC quando comparados ao grupo controle. Mas só o grupo obeso apresentou redução significativa de PYY (Figura 12).

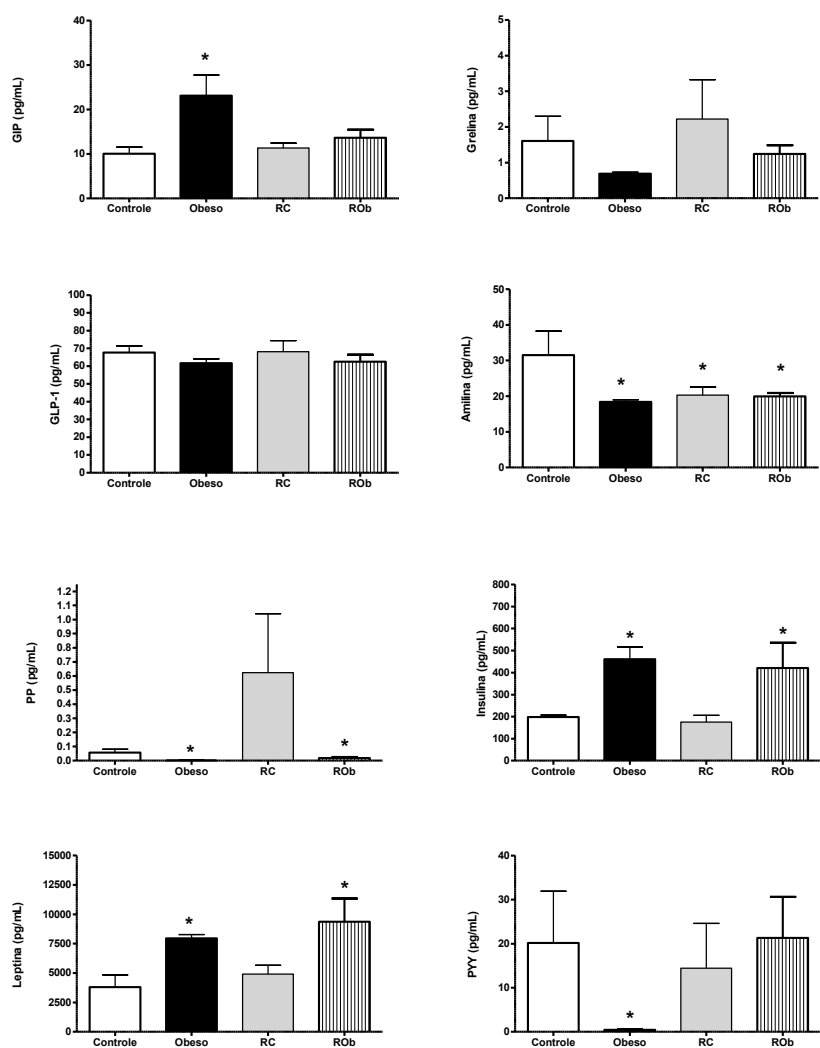


Figura 12. Níveis séricos basais das incretinas e outros sinalizadores intestinais ou metabólicos, sendo respectivamente (GIP, Ghrelina, GLP-1, Amilina, PP, Insulina, Leptina e PYY). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 5 animais. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparado com o grupo Controle.

A

B

6. Quantificação dos níveis teciduais de DHA e EPA no tecido adiposo visceral

As amostras foram extraídas e aguardam a quantificação que será realizada pelos nossos colaboradores da FEA/Unicamp.

C

D

7. Avaliação da presença de adipócitos multiloculares no tecido adiposo subcutâneo

Não observamos a presença de adipócitos multiloculares no tecido adiposo subcutâneo nos diferentes grupos experimentais (Figura 13 A-D).

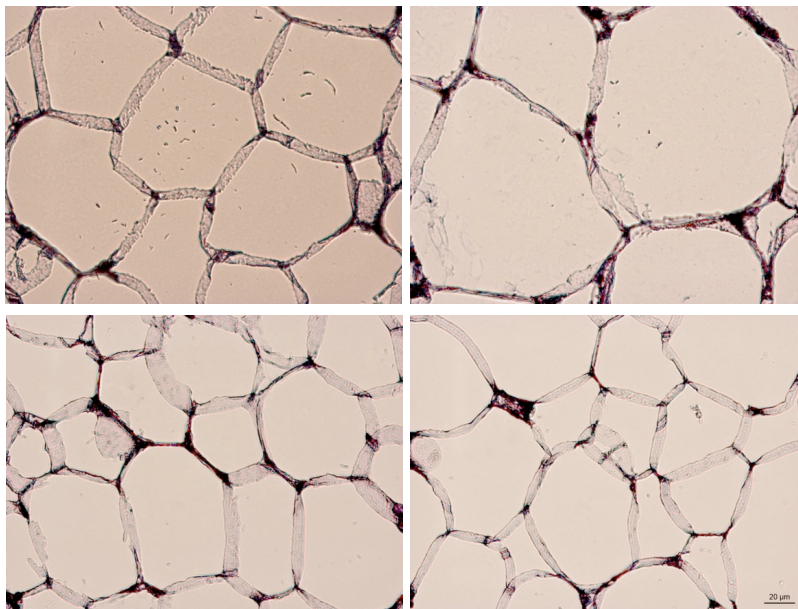


Figura 13. Imagens do tecido adiposo subcutâneo dos animais Controle (A), Obesos (B), Restrição calórica (C) e Resistentes à obesidade (D).

4. DISCUSSÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo, acompanhado de uma série de alterações que predispõe os obesos ao desenvolvimento de resistência a insulina e, conseqüentemente ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas (Da Costa *et al.*, 2012). De acordo com Polonsky *et al.* (1988), em um quadro de obesidade associada à resistência à insulina, inicialmente, há um aumento dos níveis da insulina na tentativa de manter a homeostase glicêmica. No entanto, com o tempo, haveria uma exaustão das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, e conseqüente queda nos níveis biodisponíveis de insulina, intolerância à glicose e hiperglicemia, caracterizando um quadro de diabetes melito do tipo 2 (Shah e Brownlee, 2016). Nosso modelo de obesidade induzida pelo consumo contínuo de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica leva a um aumento da adiposidade, resistência à insulina, mas ainda a uma produção aumentada de insulina (hiperinsulinemia) como resposta a hiperglicemia.

Camundongos obesos submetidos à moderada restrição calórica por 8 semanas, apresentaram redução de peso corpóreo e adiposidade, redução da glicemia basal e a recuperação da sensibilidade periférica a insulina, mas uma manutenção ainda anormal das concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos, quando comparados aos animais que se mantiveram magros durante o mesmo período. Estes resultados já foram descritos previamente por outros autores Anderson *et al.* (2013), List *et al.* (2013), Barbosa-da-Silva *et al.* (2014), evidenciando que regimes restritivos de calorias ainda são a melhor opção terapêutica para a prevenção e controle do diabetes melito tipo 2, embora nem todas as ações deletérias estabelecidas pela obesidade sejam prontamente revertidas..

A propensão ao desenvolvimento da obesidade é variável em humanos, sugerindo a existência de indivíduos resistentes e indivíduos suscetíveis à obesidade (Garland *et al.*, 2011). A definição de resistência à obesidade do ponto de vista experimental se dá quando

animais experimentais são submetidos à dieta hiperlipídica e exibem diferenças significativas no peso corporal (Ding, Guo e Su, 2015) e, apesar da condição de alta ingestão energética, o peso corporal aumenta lentamente, mantendo-os magros e com concentrações séricas baixas de colesterol e triglicerídeos. No entanto, uma análise proporcional da composição corporal revela que estes animais possuem uma relação massa gorda/peso corporal ainda em desequilíbrio e os níveis glicêmicos se mantêm aumentados assim como nos animais obesos. Apesar da adiposidade não ser tão importante como nos obesos não houve redução de glicemia em resposta a insulina semelhante ao observado nos controles magros que nunca estiveram expostos a dieta hiperlipídica ou que emagreceram. Alguns estudos já realizados demonstraram que alterações na resistência à insulina são independentes da adiposidade, mas estão estreitamente relacionadas com a ingestão de gordura ou com o tipo de gordura ingerida. Este é um dado muito importante, visto que alguns trabalhos demonstram que alteração na ação da insulina seria responsável por desencadear as outras consequências da síndrome X (Pereira, Francischi e Lancha Jr, 2003) e que nem sempre o peso corporal reflete a composição corporal.

O receptor GPR 43 pertence à família de receptores acoplados a proteína G inicialmente descrita por Swazdargo et al (1997), é expresso em leucócitos, principalmente neutrófilos e em menor quantidade em células mononucleares do sangue, como monócitos e linfócitos (Brown *et al.*, 2003; Le Poul, *et al.*, 2003). O receptor é ativado pelos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Hong *et al.*, 2005). Le Poul et al., (2003) sugerem que a ativação do GPR 43 é responsável pelas ações dos ácidos graxos de cadeia curta sobre os neutrófilos (quimiotaxia) e que esse receptor apresenta função similar à do receptor de fMLP no recrutamento de leucócitos para o local da infecção e ativação dos mesmos. Os receptores GPR120 são encontrados em macrófagos com fenótipo pró-inflamatório e são ativados através do reconhecimento dos ácidos graxos insaturados ômega-3 que no organismo são detectados na

forma de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) resultando em potentes respostas anti-inflamatórias (Oliveira et al., 2015). Estes receptores estão também associados à produção de incretinas e participam diretamente da resposta inflamatória do tecido (Bjursell, *et al.*, 2014).

No tecido adiposo, não observamos alterações na expressão de GPR43 nos diferentes grupos experimentais. No entanto observou-se a expressão aumentada de FFA4/GPR120 nos animais do grupo Obeso e de Restrição calórica. Tal aumento pode estar associado ao processo inflamatório que se estabelece no tecido adiposo durante a obesidade e que não é totalmente revertido com a perda de peso, pois os animais do grupo restrição calórica ainda apresentam aumento de TNF- α . Outra observação é que a expressão aumentada do GPR120 esteja relacionada ao infiltrado de macrófagos pois nossos resultados mostram aumento do infiltrado de macrófagos nos mesmos grupos experimentais em que a expressão está aumentada. Segundo a literatura, macrófagos infiltrados durante o processo inflamatório são capazes de causar alterações na expressão de FFA4/GPR120 nos adipócitos (Trayhurn e Denyer, 2012). O emagrecimento resulta na permanência de um infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, nos levando a sugerir que estas células possam ainda estar desempenhando funções que alteram o microambiente tecidual mesmo após a perda de peso e regressão do volume dos adipócitos. Segundo Gotoh et al., (2007), níveis de mRNA de GPR120 estavam aumentados em diferentes estoques de tecido adiposo de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura. A expressão do mRNA de GPR120 foi mais elevada nos adipócitos em comparação com as células do estroma-vascular (S-V). O nível de mRNA de GPR120 aumentou durante a diferenciação de adipócitos em células 3T3-L1. Além disso, o uso de um pequeno ARN de interferência (siRNA) para regular negativamente a expressão de GPR120 resultou na inibição da diferenciação de adipócitos, sugerindo que o GPR120 regula processos adipogênicos como o desenvolvimento e diferenciação de adipócitos. Nossos resultados nos

permitem concluir que a restrição calórica reduz a adiposidade, mas mantém as alterações na composição do infiltrado celular inflamatório no tecido adiposo e na expressão de GPR120. O controle glicêmico é recuperado, assim como a lipemia está normal e não se observam alterações na produção de incretinas. Já os resistentes à obesidade, apresentam alterações na composição corporal, o controle glicêmico não é normal, mas a lipemia sim. A produção de algumas adipocinas inflamatórias está aumentada no tecido adiposo, bem como os níveis séricos de insulina e leptina, reflexo do controle inadequado da glicemia.

Nossos resultados atuais mostram que há um aumento na expressão de TNF- α no tecido adiposo epididimal de animais obesos, que se mantém aumentada mesmo após o período de restrição calórica, Hasan *et al.*, (2017) descreve que a ativação geral do GPR120 atenua a produção de citocinas pró inflamatórias, o que justifica a forte expressão deste receptor nos animais obesos correlacionado com o aumento de TNF- α . Já no grupo resistente a obesidade a expressão de TNF- α se manteve reduzida aos níveis do grupo controle, e não há alterações estatisticamente significativas na expressão de GPR120.

Durante o estabelecimento da obesidade, ocorre aumento da expressão de quimiocinas. Essas substâncias atraem neutrófilos, linfócitos, macrófagos e outras células inflamatórias para o tecido adiposo que passam a secretar inúmeras citocinas pró-inflamatórias (Yu, Deng e Huang, 2009). A participação de citocinas no processo inflamatório se faz essencial no controle da homeostasia através de mecanismos que incluem a regulação da ingestão calórica e do balanço energético, ação da insulina, metabolismo dos lipídios e da glicose, angiogênese, remodelação vascular, entre outras funções (Athiros *et al.*, 2010; Rabe *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2012) sugeriram que as concentrações de marcadores inflamatórios são proporcionais as alterações associadas com a obesidade. Desta forma, avaliamos o infiltrado de leucócitos e macrófagos no tecido adiposo, e apesar da melhora dos parâmetros metabólicos observados após o período de emagrecimento, não observamos redução do infiltrado celular. No entanto,

faz-se uma ressalva, pois a marcação de macrófagos realizada não é capaz de promover informações sobre o fenótipo destas células. Macrófagos podem se apresentar com fenótipo M2 caracterizado pela expressão de arginase-1 (Arg-1), antígenos de superfície como CD206 e CD301 e produzindo IL-10 que regula de forma positiva a homeostase glicêmica no tecido adiposo. Mas também podem ser caracterizados como M1 pela produção de óxido nítrico sintase (NOS), TNF- α e IL-6, expressando marcadores como o F4/80 e CD11c apontados como o principal elo de ligação entre a inflamação sistêmica de baixo grau que se estabelece durante a obesidade e as alterações metabólicas como a resistência dos tecidos periféricos à insulina (Zeyda e Stulnig, 2007). As concentrações de IL-6 não foram diferentes entre os grupos. Já a avaliação dos níveis de adiponectina e leptina se encontraram reduzidos no tecido adiposo destes animais, mostrando que os adipócitos respondem parcialmente a perda de peso, inibindo a produção de leptina, mas não recuperam a produção da adiponectina antiinflamatória. Nos animais com resistência à obesidade observam-se uma expressão maior de adipocinas pró-inflamatórias como MCP-1 e Leptina (Fam *et al.*, 2015); mas infiltrado de macrófagos e leucócitos não mostraram diferenças estatisticamente significativas nesses animais quando comparado aos controles pois a variação entre os animais desse grupo é muito grande.

A expressão de MCP-1 no tecido adiposo é proporcional à massa adiposa e contribui para a infiltração de macrófagos e a resistência à insulina associada com a obesidade (Ohman e Eitzman, 2011). A leptina é uma citocina que apresenta um papel importante no metabolismo dos lipídeos e da glicose, bem como na regulação inflamatória (Stern, Rutkowski e Scherer, 2016.). Seus teores circulantes apresentam-se elevados em animais obesos (Hariri e Thibault, 2010) e reduzidos após a perda de peso (Rosenbaum e Leibel, 2014). Outra citocina pró-inflamatória que também está aumentada em indivíduos obesos é a IL-6. Além de sua função no metabolismo dos lipídios e da glicose, é um marcador de

resistência a insulina, pois se correlaciona positivamente com níveis de insulina em jejum (Nieto-Vazquez *et al.*, 2008). A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória e seus efeitos biológicos dependem não somente dos seus níveis circulantes na corrente sanguínea, mas também da especificidade tecidual e de seus receptores, ADP-R1 e ADP-R2 (Carvalho, Colaco e Fortes, 2006). A adiponectina aumenta a oxidação muscular dos ácidos graxos e reduz a concentração de glicose plasmática através do AMPK (adenina monofosfato quinase) (Costa e Duarte, 2006)

Ao contrário da maioria das proteínas secretadas pelo tecido adiposo, a expressão de adiponectina diminui à medida que o tecido adiposo aumenta, ou seja, apresenta baixas concentrações nos obesos (Fonseca *et al.*, 2006; Guimaraes *et al.*, 2007), conforme observado experimentalmente em nossos resultados.

Os receptores FFA1/GPR40, FFA2/GPR43, FFA3/GPR41, GPR119 e FFA4/GPR120 são expressos no trato digestório e a ativação destes receptores estimula a secreção de GLP-1 e do peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) pelas células enteroendócrinas (Hirasawa *et al.*, 2005). Vimos que em uma situação de jejum não há diferenças nos níveis séricos de GLP-1 nos diferentes grupos experimentais, mas um aumento nos níveis circulantes de GIP nos animais obesos. O GIP é uma incretina secretada pelas células K do intestino após ingestão de carboidratos e lipídios (Cavalcanti e Lins, 2014). Esse aumento de GIP nos obesos mesmo numa situação de jejum indica que algum mecanismo responsável por esta produção fica perturbado durante a obesidade. O aumento de leptina sérica corresponde a resultados aumentados também de leptina no tecido adiposo, característica observada na obesidade (Considine *et al.*, 1996), bem como o aumento sérico da insulina está relacionado ao desbalanço glicêmico (Polonsky *et al.* 1988) observado nos obesos e nos resistentes a obesidade.

Neste estudo observamos curiosamente a diminuição nos níveis de amilina em animais obesos e resistentes à obesidade; sendo que o nível de amilina tem correlação com o nível de insulina, se mostrando mais elevado em animais mais velhos e mais obesos (Castillo, Scheen e Lefebvre, 1995). A amilina/insulina está aumentada em animais geneticamente obesos e em diabéticos tipo 1 a amilina está ausente (Castillo, Scheen e Lefebvre, 1995).

Houve a redução na secreção de PP (em animais obesos e resistentes à obesidade) e PYY (animais obesos) e como já descrito em trabalhos científicos anteriores realizados em humanos, é observado alterações na secreção do PP em síndromes associadas com modificação no hábito alimentar. Uma diminuição na secreção pós-prandial do peptídeo também foi observada em obesos mórbidos (Cavalcanti e Lins, 2014), enquanto indivíduos com anorexia nervosa têm uma resposta pós-prandial exacerbada do PP (Cavalcanti e Lins, 2014). Os obesos também apresentam níveis plasmáticos mais baixos do PYY e uma relativa deficiência em sua secreção pós-prandial o que poderia contribuir para a manutenção da obesidade. Entretanto, esses indivíduos obesos se mantêm sensíveis às ações anoréticas do PYY 3-36 quando administrado perifericamente (Cavalcanti e Lins, 2014).

Não foi possível a detecção dos receptores GPRs no tecido adiposo subcutâneo devido a falhas técnicas ou sua real baixa expressão neste tecido. Também não houve modificação

Podemos concluir que a avaliação da expressão do GPR120 no tecido adiposo mostra uma possível correlação com a expansão do tecido adiposo (adipogênese) e/ou com a presença de um infiltrado de macrófagos (que se mantém mesmo após o emagrecimento) e que sua ativação geral atenua a produção de citocinas pró inflamatórias nos animais obesos.

REFERÊNCIAS

Anderson EK, Gutierrez DA, Kennedy A, Hasty AH. **Weight cycling increases T-cell accumulation in adipose tissue and impairs systemic glucose tolerance.** *Diabetes*. 2013; **62**(9): 3180-3188p.

A.U. Hasan, K. Ohmori, T. Hashimoto, K. Kamitori, F. Yamaguchi, T. Noma, J. Igarashi, K. Tsuboi, M. Tokuda, A. Nishiyama, M. **Kohno, GPR120 in adipocytes has differential roles in the production of pro-inflammatory adipocytokines,** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017.

Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Anagnostis P, Mikhailidis DP. **Should Adipokines be Considered in the Choice of the Treatment of Obesity-Related Health Problems?** *Current Drugs Targets*. 2010; **11**: 122-135p.

Barbosa-da-Silva S, Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. **Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice.** *Hepatology Research*. 2014; **44**(4), 450-459.

Brown, A.J et al. **The Orphan G protein-coupled receptors GPR 41 and GPR 43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids.** *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 13, p. 11312-9, 2003.

Carvalho MH, Colaco AL, Fortes ZB. **Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina.** *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; **50**(2): 304-312p.

Castillo MJ, Scheen AJ, Lefebvre PJ. **Amylin/islet amyloid polypeptide: biochemistry, physiology, pathophysiology.** *Diabete Metab.* 1995; **21**: 3-25p.

Cavalcanti N, Lins DC. **O papel dos hormônios intestinais no controle glicêmico.** *E-book 2.0, Diabetes na prática clínica. Edição 3, Módulo 1, cap5. Sociedade Brasileira de Diabetes.* 2014. Disponível em:
<http://www.diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/35-o-papel-dos-hormonios-intestinais-no-controle-glicemico>. Acesso em: 04 Jul 2016.

Chen SJ, Yen CH, Huang YC, Lee BJ, Hsia S, Lin PT. **Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome.** *PLoS One.* 2012; **7**(9).

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. **Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans.** *N Engl J Med.* 1996; **334**(5):292-5p.

Costa JV, Duarte JS. **Tecido adiposo e adipocinas.** *Acta Med Port.* 2006; **19**(3): 251-256p.

Da Costa LA, Arora P, García-Bailo B, Karmali M, El-Sohemy A, Badawi A. **The association between obesity, cardiometabolic disease biomarkers, and innate immunity related inflammation in Canadian adults.** *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2012; **5**:347-55p.

Ding C, Guo J, Su Z. **The status of research into resistance to diet-induced obesity.** *Hormone and Metabolic Research.* 2015; **47**(06), 404-410.

Fam BC, Sgambellone R, Ruan Z, Proietto J, Andrikopoulos S. **Contribution of the hypothalamus and gut to weight gain susceptibility and resistance in mice.** *The Journal of endocrinology*. 2015; **225**: 191-204p.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. **O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo.** *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; **50**(2):216-229p.

Garland T Jr, Schutz H, Chappell MA, Keeney BK, Meek TH, Copes LE, Acosta W, Drenowatz C, Maciel RC, van Dijk G, Kotz CM, Eisenmann JC. **The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives.** *The Journal of experimental biology*. 2011; **214**: 206-29p.

Guimaraes DED, Sardinha FLC, Mizurini DM, Tavares do Carmo MG. **Adipocitocinas: uma nova visao do tecido adiposo.** *Rev Nutr*. 2007; **20**(5):549-559p.

Hariri N, Thibault L. **High-fat diet-induced obesity in animal models.** *Nutr Res Rev*. 2010; **23**(2):270-99

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. **Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120.** *Nature medicine*. 2005; **11**: 90-4.

Thainá 23/11/2017 18:45

Formatted: English (US)

Le Poul, E. et al. **Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation.** *J. Biol. Chem.*, v 278, n. 28, p.25481-9, 2003.

List EO, Berryman DE, Wright-Piekarski J, Jara A, Funk K, Kopchick JJ. **The effects of weight cycling on lifespan in male C57BL/6J mice.** *International journal of obesity.* 2013; 37(8): 1088-1094p.

Mikael Bjursell, Xiufeng Xu, Therése Admyre, Gerhard Böttcher, Sofia Lundin, Ralf Nilsson, Virginia M. Stone, Noel G. Morgan, Yan Y. Lam, Leonard H. Storlien, Daniel Lindén, David M. Smith, Mohammad Bohlooly-Y, Jan Oscarsson. **The Beneficial Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Diet Induced Obesity and Impaired Glucose Control Do Not Require Gpr120.** *PLoS One.* 2014; 9(12):114942.

Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. **Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha.** *Arch Physiol Biochem.* 2008; 114(3):183-94.

Öhman MK, Luo W, Wang H, Guo C, Abdallah W, Russo HM, Eitzman DT. **Perivascular visceral adipose tissue induces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice.** *Atherosclerosis.* 2011; 219(1), 33-39.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM and Olefsky JM. **GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects.** *Cell*. 2010; **142**: 687-98.

Oliveira, V.; Marinho, R.; Vitorino, D.; Santos, G. A.; Moraes, J. C.; Dragano, N.; Sartori-Cintra, A.; Pereira, L.; Catharino, R. R.; Da Silva, A. S. R.; Ropelle, E. R.; Pauli, J. R.; De Souza, C. T.; Velloso, L. A.; Cintra, D. E. [Diets Containing alpha-Linolenic \(omega 3\) or Oleic \(omega 9\) Fatty Acids Rescues Obese Mice From Insulin Resistance.](#) *Endocrinology*, v. **156**, n. 11, p. 4033-4046, NOV 2015.

Pereira LO, Francischi RPD, Lancha Jr AH. **Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina.** *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003. **47**(2), 111-27.

Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C. **Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects.** *J Clin Invest*. 1988; **81**: 435-441p.

Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. **Adipokines and Insulin Resistance.** *Molecular Medicine*. 2008; **14** (11-12): 741-751p.

Rosenbaum M, Leibel RL. **20 years of leptin: role of leptin in energy homeostasis in humans.** *J Endocrinol*. 2014 Oct; **223**(1):T83-96.

Sawzdargo, M. et al. **A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q 13.1.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 239, n. 2, p. 543-7, 1997.

Shah MS, Brownlee M. **Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes.** *Circ Res.* 2016 May **27**;118(11):1808-29

Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. **Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk.** *Cell Metab.* 2016 May **10**;23(5):770-84.

Trayhurn P and Denyer G. **Mining microarray datasets in nutrition: expression of the GPR120 (n-3 fatty acid receptor/sensor) gene is down-regulated in human adipocytes by macrophage secretions.** *Journal of nutritional science.* 2012; 1: e3.

Yu Y, Deng C, Huang XF. **Obese reversal by a chronic energy restricted diet leaves an increased Arc NPY/AgRP, but no alteration in POMC/CART, mRNA expression in diet-induced obese mice.** *Behavioural brain research.* 2009; **205**(1): 50-56p.

Zeyda M, Stulnig TM. **Adipose tissue macrophages.** *Immunol Lett.* 2007; **112** (2): 61-67p.