



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLOGICAS**

**ANNA CAROLINA SAÚDE DANTAS**

**IMPACTO DA OVARIECTOMIA SOBRE ALTERAÇÕES  
METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS EM MODELOS DE  
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EM RATAS.**

Vitória da Conquista

2011

**ANNA CAROLINA SAÚDE DANTAS**

**IMPACTO DA OVARIECTOMIA SOBRE ALTERAÇÕES  
METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS EM MODELOS DE  
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EM RATAS.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Vitória da Conquista  
2011

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Dantas, Anna Carolina Saúde

Impacto da ovariectomia sobre alterações metabólicas e inflamatórias em modelos de obesidade induzida por dieta em ratas / Anna Carolina Saúde Dantas. - 2011.  
82 f. : il.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Amélia Cristina Mendes de Magalhães, Prof. Co-orientador:  
Dr.<sup>o</sup> Cândido Celso Coimbra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2011

1. Metabolismo - Resistência à Insulina. 2. Menopausa. 3. Obesidade – patologia - Inflamação. 4. Obesidade Abdominal. I. Universidade Federal da Bahia. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. II. Título.

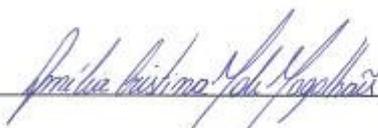
CDU – 616-008.9

ANNA CAROLINA SAÚDE DANTAS

**IMPACTO DA OVARIECTOMIA SOBRE ALTERAÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS EM MODELOS DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EM RATAS**

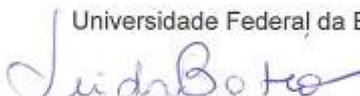
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 18 de fevereiro de 2011.



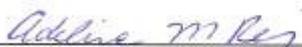
Prof.ª. Dr.ª. Amélia Cristina Mendes de Magalhães

Universidade Federal da Bahia



Prof.ª. Dr.ª. Leida Maria Botion

Universidade Federal de Minas Gerais



Prof.ª. Dr.ª. Adelina Martha dos Reis

Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Universidade Federal de Minas Gerais

*Aos meus amados pais, Luiz Carlos e Arlete, minha irmã Carla e ao meu marido,  
Fabiano.*

## AGRADECIMENTOS

Meus maiores agradecimentos a Deus, Pai Celestial, que com sua bondade e seu amor infinito permitiu minha chegada até aqui. Foi Ele quem me deu serenidade para enfrentar os momentos de maiores dificuldades.

Aos meus pais, Arlete e Luiz Carlos, que com palavras e gestos foram a minha segurança e meu apoio que me permitiram seguir sem desistir o caminho que escolhi.

À minha querida irmã Carla e meu cunhado Jorge, pela amizade e pelos momentos de alegria que compartilhamos juntos, lembrando-me sempre que amigos são companheiros eternos.

Ao meu amado marido, Fabiano, que em todos os meus momentos de ausência foi compreensivo, amigo e grande companheiro, me oferecendo sua tranquilidade e seu amor, e apostando, junto comigo, nos projetos que sonhei.

À Profa. Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães, minha orientadora, por me receber de braços abertos mesmo diante de algumas dificuldades e por confiar em mim. Por sua disponibilidade em sempre me ajudar, por dividir seu valioso saber, por seu exemplo de dedicação à vida acadêmica, pelos conselhos e incentivos. Para mim, a nossa relação iniciada pela ciência foi ampliada para a amizade.

À Profa. Dra. Telma de Jesus Soares, também por sua constante disponibilidade em me ajudar e pelos tão valiosos ensinamentos em renal e imuno-histoquímica.

Às Profas. Dras. Najara de Oliveira Belo e Regiane Yatsuda, pela iniciativa e coragem em tornar concreto o Programa Multicêntrico.

Ao Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, por aceitar ao convite para minha co-orientação, por sua vasta experiência que nos ajudou a realizar este trabalho. Agradeço por me receber no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do ICB (UFMG), permitindo a realização do radioimunoensaio para Insulina.

À Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis, por sua proximidade e seu interesse em ajudar os alunos da UFBA.

À Profa. Dra. Leida Botion, por me receber como aluna da disciplina “Controle Nutricional e Endócrino do Metabolismo Intermediário” e constituir a banca avaliadora deste trabalho.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade do excelente curso no campus Anísio Teixeira, do Instituto Multidisciplinar em Saúde, além das oportunidades de contato e de conhecimento nos Laboratórios da FMRP (USP) e do ICB (UFMG).

À CNPq e à FAPESB pelos auxílios financeiros, de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Às universidades públicas, em especial à UFBA, por atuarem não só como instituições de ensino, mas também de pesquisa e extensão.

Aos colegas de mestrado, Kelle e Everaldo, por dividir comigo momentos de tantas alegrias e me ajudarem em tantos outros mais difíceis. Em especial Lilianny, terei você para sempre como uma grande amiga.

Aos alunos de iniciação científica, Luciano, Grazi e Roberta, pela ajuda nas técnicas, no tratamento dos resultados e especialmente, pela convivência tão harmoniosa.

Aos professores da UFBA, em especial as Profas. Dras. Raquel Gestiarini e Maíse Mendonça, por sua contribuição na compreensão e desenvolvimento das técnicas de PCR e o Prof. Robson Amaro pela ajuda nos estudos histológicos.

Às equipes do Laboratório da Unidade de Emergência de Pirajá e do Lacen/Conquista, em especial a Dr. André Batista Matos, que me permitiram conciliar o mestrado à rotina do trabalho.

À Dra. Cláudia Macedo e Ana Paula Silva Pereira, do Laboratório Micro, pelos cortes histológicos.

Ao povo brasileiro que por meio dos impostos financiam o ensino público em suas diferentes instâncias, inclusive na pós-graduação.

Meu agradecimento a todos os amigos e familiares que torceram, ainda que de longe, por mais uma vitória.

*“A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas.”*

*“Uma verdadeira viagem de descobrimento não significa, necessariamente, encontrar novas terras, mas, isto sim, adquirir um novo olhar.”*

Marcel Proust

DANTAS, Anna Carolina Saúde. Impacto da ovariectomia sobre alterações metabólicas e inflamatórias em modelos de obesidade induzida por dieta em ratas. 82f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

## RESUMO

O aumento mundial da incidência de obesidade tem determinado um crescente interesse sobre as diversas alterações metabólicas associadas que aumentam os riscos do desenvolvimento de diabetes tipo 2 e de doenças cardiovasculares. O consumo de dietas com altas densidades energéticas, associado ou não a ausência do estrógeno, pode determinar um quadro de alterações metabólicas e inflamatórias, com modificação do perfil de distribuição do tecido adiposo, associado à resistência a insulina. O objetivo deste estudo foi verificar o impacto da ovariectomia sobre as alterações metabólicas e inflamatórias nos tecidos adiposo e hepático em modelos de obesidade baseado no fornecimento de dietas hipercalóricas para ratas. Ratas Wistar com dez semanas de idade foram submetidas aos procedimentos de ovariectomia ou “sham” e distribuídas entre três dietas: controle, hiperlipídica e hipersacarídica. Ao final de vinte e seis semanas de tratamento dietético, o grupo ovariectomizado tratado com dieta hiperlipídica apresentou o maior peso corporal dentre os grupos experimentais, bem como, maior depósito do tecido adiposo visceral e elevação dos níveis de pressão arterial sistólica. O perfil bioquímico plasmático não diferiu entre os grupos, no entanto o teste de tolerância a glicose revelou uma alteração especialmente nos grupos sham e ovariectomizado tratados com dieta hipersacarídica, demonstrando o maior impacto desta dieta sobre a resposta a sobrecarga de glicose. Mas foi o grupo ovariectomizado tratado com dieta hiperlipídica que apresentou os maiores níveis de insulina e do índice HOMA-IR (Homeostatic model assessment). Os grupos submetidos a dietas hipercalóricas também manifestaram infiltração gordurosa no fígado, os grupos sham e ovariectomizado tratados com dieta hipersacarídica com padrão microvesicular e os grupos sham e ovariectomizado tratados com dieta hiperlipídica desenvolveram esteatose hepática com padrão macrovesicular e infiltração inflamatória compatível com o quadro de esteato-hepatite. No tecido adiposo abdominal parametrial do grupo ovariectomizado tratado com dieta hiperlipídica também se observou uma maior infiltração de macrófagos/monócitos, com formação das estruturas do tipo “crown-like”. As dietas hipercalóricas hiperlipídicas e hipersacarídicas determinaram respostas diferentes quanto ao ganho de peso dos animais, padrão de deposição de gordura corporal, mas ambas, resultaram em algum grau de resistência a insulina. A ovariectomia apenas apresentou impacto sobre as alterações metabólicas quando associada às dietas hipercalóricas. A presença de gordura ectópica armazenada nos hepatócitos e a maior infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo e no parênquima hepático podem explicar em parte, o quadro de resistência a insulina desenvolvido, principalmente nos grupos que não apresentaram aumentos significativos do peso corporal e da gordura abdominal.

**Palavra-chave:** Metabolismo – Resistência à Insulina. Menopausa. Obesidade – patologia – Inflamação. Obesidade Abdominal.

DANTAS, Anna Carolina Saúde. Impact of ovariectomy on metabolic and inflammatory profiles in models of diet-induced obesity in female rats. 82pp. ill. 2011. Master Dissertation – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

### **ABSTRACT**

The worldwide incidence of obesity is increasing and has been associated with several metabolic alterations that increase the risks of the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases. The consumption of diets with high energy densities associated with the presence or absence of estrogen can determine inflammatory and metabolic disorders, modification of adipose distribution and insulin resistance. The aim of this study was to verify the effect of ovariectomy on metabolic and inflammatory profiles of hepatic and adipose tissues in models of diet-induced obesity in female rats. Female Wistar rats with ten weeks of age were submitted to the ovariectomy (O) or “sham” (S) surgery and distributed among three diets: control (C), high fat (HF) and high sucrose (HS) diets. At the end of twenty-six weeks of dietary treatment, the group of ovariectomized female rats submitted to high fat diet (OHF) presented the higher corporal weight among the experimental groups, as well as, larger visceral fat deposits and elevation of systolic blood pressure levels. The plasma biochemical profile was not significantly different amongst the groups however the glucose tolerance test revealed an alteration on the answer to the glucose overload in the groups of sham (SHS) or ovariectomized (OHS) female rats submitted to high sucrose diets, indicating the higher impact of these diets on glucose tolerance. The OHF group presented higher insulin levels and HOMA-IR (Homeostatic model assessment). The high energy diets also determined fatty infiltration on liver with microvesicular pattern on the SHS and OHS groups and macrovesicular steatosis and steatohepatitis on SHF and OHF groups. The OHF group also presented higher macrophage/monocyte infiltration in parametrial fat deposits, with formation of the "crown-like" structures. The diets with high fat or sucrose determined different answers with relationship to the animal weight, pattern of fat corporal deposition, but both, resulted in some degree of insulin resistance. The ovariectomy only presented impact on metabolic disorders when in association to the high energy diets. The presence of ectopic fat stored in the liver and the higher infiltration of inflammatory cells in the visceral fat deposits and in the hepatic parenquime can in part explain the development of insulin resistance, mainly in the groups that didn't present significant increases of the corporal weight and of the abdominal fat.

**Keywords:** Metabolism – Insulin Resistance. Menopause. Obesity – pathology – Inflammation. Obesity, Abdominal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo proposto para a resistência a insulina associada a um aumento nos níveis de AGL.....	28
Figura 2	Peso corporal médio de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas controle (DCO e DCS), hiperlipídica (DLO e DLS) e hipersacarídica (DSO e DSS) após 26 semanas de tratamento dietético.....	45
Figura 3	Variação do peso corporal médio de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas controle (DCO e DCS), hiperlipídica (DLO e DLS) e hipersacarídica (DSO e DSS) durante 26 semanas de tratamento dietético.....	46
Figura 4	Peso do tecido adiposo visceral (mesentérico, parametrial e retroperitoneal) corrigido pelo peso corporal após 26 semanas de dieta experimental.....	47
Figura 5	Ingestão alimentar (g) diário (A) e ingestão calórica (Kcal) diária (B) baseado no consumo alimentar (g) nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	48
Figura 6	Pressão arterial sistólica nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	49
Figura 7	Gráficos representando as curvas do teste de tolerância a glicose nos tempos de 0', 30', 60', 90' após a injeção intraperitoneal de glicose nos grupos DCS e DCO (A), DLS e DLO (B) e DSS e DSO (C) e as áreas sob as curvas (D) nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	51
Figura 8	Insulina plasmática nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	52

Figura 9	Porcentagem de hepatócitos com presença de microvesículas nos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	53
Figura 10	Porcentagem de hepatócitos com presença de macrovesículas nos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	54
Figura 11	Perfil histológico do parênquima hepático em cortes corados com HE .....	55
Figura 12	Número de células ED-1 positivas por campo microscópico (40x) no tecido hepático após 26 semanas de tratamento dietético.....	56
Figura 13	Infiltração de macrófagos/monócitos no parênquima hepático a partir da imuno-histoquímica para ED-1.....	57
Figura 14	Correlação de Pearson calculada entre número de células ED-1+ (macrófagos/monócitos) no parênquima hepático e área sob a curva do teste de tolerância a glicose.....	58
Figura 15	Número de linfócitos (células CD4+) por campo microscópico (40x) no tecido hepático após 26 semanas de tratamento dietético.....	59
Figura 16	Infiltração de linfócitos no parênquima hepático a partir da imuno-histoquímica para CD4.....	60
Figura 17	Número de estruturas “crown-like” no tecido adiposo parametrial (A) e no tecido adiposo mesentérico (B) por campo (40x) nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	61
Figura 18	Infiltração de macrófagos/monócitos no tecido adiposo parametrial com formação das estruturas “crown-like” a partir da imuno-histoquímica para ED-1.....	62

Figura 19 Número de linfócitos infiltrados no tecido adiposo parametrial (A) e no tecido adiposo mesentérico (B) por campo de 40x nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético..... 62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais controle (DC), hiperlipídicas (DL) e hipersacarídica (DS).....	35
Tabela 2	Composição bromatológica das dietas experimentais controle (DC), hiperlipídicas (DL) e hipersacarídica (DS).....	36
Tabela 3	Contribuição das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total da energia metabolizável nas dietas experimentais.....	36
Tabela 4	Contribuição das frações de amido de milho, farelo de soja, sacarose e maltodextrina na composição dos carboidratos totais nas dietas experimentais.....	37
Tabela 5	Peso dos depósitos de tecido adiposo(g)/100g de peso corporal dos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	47
Tabela 6	Perfil bioquímico plasmático dos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	49
Tabela 7	Valores médios do índice de resistência a insulina (HOMA-IR) dos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético.....	52

## LISTA DE ABREVIATURA

- Acil-CoA: Acil-Coenzima A
- ADD 1: Fator 1 de diferenciação de adipócitos
- AGL: Ácidos graxos livres
- ALT: Alanina amino-transferase
- ANP: Peptídeo natriurético atrial (*Atrial natriuretic peptide*)
- AP-1: Fator de transcrição AP-1
- AST: Aspartato amino-transferase
- AT1: Receptores tipo 1 da angiotensina II
- CD4: Marcador de linfócito
- CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
- C/EBP: Proteínas de ligação *enhancer*
- DAB: 3,3-Diaminobenzidina
- DAG: Diacilglicerol
- ED-1: Marcador de macrófago/monócito
- ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- FPG: Concentração plasmática de glicose basal
- FPI: Concentração plasmática de insulina basal
- Glut-4: Receptor da glicose tipo 4
- HE: Hematoxilina Eosina
- HDL: Lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)
- HOMA-IR: *Homeostatic model assessment*
- HRP: *Horse radish peroxidase*
- IKK: *I $\kappa$ B Kinase*
- IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$
- IL-6: Interleucina 6
- IL-8: Interleucina 8
- INF $\gamma$ : Interferon gama
- IRS1 – 2: Substratos do receptor de insulina 1 e 2
- JAK2: Janus Kinase
- JNK: Jun N-terminal Kinase
- LDL: Lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)
- MCP: Proteína quimioatraente de monócitos

NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NAFLD: Doença Gordura Não Alcoólica do Fígado (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*)

NASH: Esteato-hepatite não alcoólica (*Non Alcoholic Steatohepatitis*)

NF-κB: Fator de transcrição nuclear κB

NO: Óxido nítrico

NPr-A: Receptor tipo A do peptídeo natriurético (*Natriuretic peptide receptor A*)

NPr-C: Receptor envolvido no clearance do peptídeo natriurético (*Natriuretic peptide receptor clearance*)

OB-Rb: Receptor do tipo b da leptina

PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio

PBS: Tampão fosfato salina (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Proteína C reativa

PPAR: Receptor ativador da proliferação de peroxissomos

PKC: Proteína quinase C

RBP4: Proteína de ligação ao retinol

RIA: Radioimunoensaio

RNAm: Ácido ribonucleotídeo mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SREBP1: Proteína de ligação 1 de regulação de esteróis

STAT-3: Fator latente de transcrição gênica

TAG: Triacilglicerol

TLR: Receptor "Toll-like" (*Toll-like receptor*)

TMB: 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina

TNF-α: Fator de necrose tumoral alpha

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	ANIMAIS E DIETAS EXPERIMENTAIS .....	34
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	37
4.3	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E DA PRESSÃO ARTERIAL	38
4.4	AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR .....	39
4.5	PERFIL BIOQUÍMICO PLASMÁTICO .....	39
4.6	TOLERÂNCIA A GLICOSE .....	39
4.7	DOSAGEM DE INSULINA / DETERMINAÇÃO DO HOMA-IR.....	40
4.8	ENZIMAIMUNOENSAIO (ELISA) / DOSAGEM DE TNF $\alpha$ PLASMÁTICO.....	41
4.9	HISTOLOGIA / AVALIAÇÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA .....	41
4.10	IMUNO-HISTOQUÍMICA / AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS .....	42
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
5.1	PESO CORPORAL E DISTRIBUIÇÃO DE GORDURA .....	45
5.2	INGESTÃO ALIMENTAR .....	48
5.3	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	48
5.4	PERFIL BIOQUÍMICO PLASMÁTICO .....	49
5.5	TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE .....	50
5.6	INSULINA PLASMÁTICA / HOMA-IR .....	51

5.7	NÍVEIS DE TNF- $\alpha$ PLASMÁTICO .....	52
5.8	ESTEATOSE HEPÁTICA .....	53
5.9	INFLAMAÇÃO HEPÁTICA .....	56
5.10	INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO .....	60
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de obesidade observado em diferentes países do mundo ampliou o interesse na compreensão da sua fisiopatologia e das diversas alterações metabólicas e comorbidades associadas que aumentam os riscos do desenvolvimento de diabetes tipo 2 e de doenças cardiovasculares (JAMES et al., 2001; MONTANI et al., 2002).

Embora os fatores genéticos contribuam para o desenvolvimento da obesidade, o aumento nos casos de sobrepeso indica um importante papel de fatores ambientais, tais como o consumo de dietas de altas densidades energéticas (WOODS et al., 2003).

Em mulheres, alterações na composição corporal são observadas na pós-menopausa, com aumento da circunferência da cintura e da massa adiposa, nem sempre acompanhada de ganho de peso (LOBO, 2008).

Na ausência de estrógeno devido a menopausa ou a falência ovariana observa-se aumento da incidência de obesidade, resistência a insulina, e conseqüentemente da síndrome metabólica (POEHLMAN, 2002; CARR, 2003). Alguns estudos demonstram o efeito positivo da reposição hormonal sobre a resistência a insulina e uma melhora no controle glicêmico, sugerindo assim a participação do estrógeno como hormônio que melhora a sensibilidade a insulina (LOBO, 2008).

Alguns mecanismos, descritos na teoria da lipotoxicidade e na teoria da inflamação, são sugeridos para explicar as alterações metabólicas associadas à resistência a insulina que frequentemente acompanha os quadros de obesidade. Isso porque o tecido adiposo, já não mais reconhecido como um depósito estático de energia, é capaz de secretar citocinas inflamatórias, tais como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que altera a cascata de sinalização da insulina resultando em um quadro conhecido como resistência a insulina (TAUBES, 2009).

Com o objetivo de avaliar as alterações bioquímico-metabólicas e inflamatórias associadas à obesidade e à menopausa utilizou-se um modelo

experimental de ratas ovariectomizadas e recebendo dietas hipercalóricas hiperlipídicas ou hipersacarídicas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A pós-menopausa designa o período que tem início após a ocorrência do último ciclo menstrual na mulher podendo ser fisiológica ou cirúrgica (ovariectomia). A palavra menopausa vem do grego *men* (mês) e *pausis* (interrupção, pausa, repouso) referindo-se à interrupção o ciclo menstrual. A menopausa, por definição compreende a ausência permanente da menstruação após um período de amenorréia de ao menos 1 ano que nas mulheres se inicia em média aos 50 anos de idade (SHARMA et al, 2010)

A pós-menopausa é frequentemente associada a diversas mudanças fisiopatológicas tais como, ateroscleroses, obesidade, dislipidemias, distúrbios de humor, osteoporose e envelhecimento da pele que sugerem que a redução na produção de estrógeno pode acelerar o desenvolvimento de processos degenerativos (MIQUEL et al., 2006).

Dentre os efeitos negativos da deficiência de estrógeno destacam-se os relacionados ao perfil hemodinâmico, aos mecanismos hemostáticos, à função endotelial e ao metabolismo das lipoproteínas plasmáticas onde se observam aumentos nos níveis plasmáticos de LDL-colesterol (Lipoproteína de baixa densidade) e diminuição nos teores de HDL-colesterol (Lipoproteína de alta densidade), fatores estes que têm sido relacionados ao aumento do risco de doenças cardiovasculares neste período (BITTNER, 2005).

A menor incidência de doenças cardiovasculares em mulheres antes da pós-menopausa tem levantado à hipótese de que o estrógeno seja responsável por proteção cardiovascular (MENDELSON & KARAS, 1999; MEERSMAN et al., 1998; KHALIL, 2005). Vários mecanismos têm sido propostos na tentativa de elucidar os efeitos benéficos do estrógeno no sistema cardiovascular, como por exemplo, redução da pressão arterial (BELO et al., 2004), alterações no metabolismo lipídico (HIGASHI et al., 2001) e efeitos antioxidantes (RUIZ-LARREA et al., 2000). Outros autores, contudo observaram aumento nos teores plasmáticos de colesterol em mulheres apresentando pós-menopausa natural ou cirúrgica sem observar efeitos

significativos sobre a pressão arterial sistólica e o índice de massa corporal (AKAHOSHI et al., 1996).

Além dos efeitos centrais dos estrógenos que repercutem sobre o tecido adiposo tais como, regulação do consumo e do gasto de energia, estes também possuem efeitos diretos sobre os adipócitos onde inibem a lipogênese e interferem na morfologia e na função de adipócitos bem como na adipogênese (COOKE & NAAZ, 2004). A pós-menopausa natural ou induzida por ovariectomia tanto em mulheres quanto em roedores resulta em aumentos nos depósitos de tecido adiposo. Se o efeito da reposição com estrógeno em mulheres pós-menopausadas resulta na diminuição da ingestão de alimento, na ação direta do hormônio no tecido adiposo ou se ambos, isto continua não definido (WADE et al., 1985; BUTERA, 2010).

Importantes questões são focadas no efeito da terapia de reposição hormonal: idade, status reprodutivo e identificação de fatores de risco gênero específicos. A viabilidade das pesquisas em fêmeas é quase exclusivamente utilizando-se modelos animais com roedores. Os melhores resultados são mais detectáveis em estudos experimentais que em estudos clínicos e observacionais (MURPHY et al., 2004).

A hipertensão arterial associada à pós-menopausa parece estar relacionada às alterações renais que têm sido relatadas tanto em humanos (COGGINS et al., 1998) quanto em um modelo animal em ratas com doença renal relacionadas à idade e submetidas à ovariectomia (MARIC et al., 2004). Também o estresse oxidativo sistêmico parece contribuir para a hipertensão arterial devido ao aumento na degradação e à diminuição da biodisponibilidade de NO (óxido nítrico), mediada por ROS (espécies reativas de oxigênio) (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004).

A estreita relação entre o aumento de peso corporal com aumentos paralelos no estresse oxidativo e inflamatório tem sido intensivamente pesquisada. Alterações tais como, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nos depósitos de tecido adiposo, aumento da expressão de NADPH oxidase e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes podem ser vistas no aumento do peso corporal (FURUKAWA et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo e a inflamação estão frequentemente associados e têm uma importante participação no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Ainda não está esclarecido se o estresse oxidativo e a inflamação causam a hipertensão, ou se a hipertensão promove o aumento desses eventos nos tecidos cardiovasculares, renais, hepáticos e adiposos (VAZIRI & RODRIGUEZ-ITURBE, 2006). Essas observações indicam que o estresse oxidativo, a inflamação e a hipertensão arterial participam de um ciclo de ativação e perpetuação de sinais que pode causar a progressão de doenças cardiovasculares.

Ainda, alguns autores apontam a participação do sistema de peptídeo natriurético atrial no aumento da pressão arterial observada tanto na obesidade quanto na pós-menopausa. O ANP (Peptídeo Natriurético Atrial) é um hormônio secretado principalmente por cardiomiócitos em resposta a distensão mecânica do músculo cardíaco e está envolvido na regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo (WILKINS et al., 1997; DANIELS & MAISEL, 2007).

O ANP é um peptídeo com propriedades diuréticas e natriuréticas e os seus níveis na circulação são aumentados pelo efeito do estrógeno (BELO et al., 2008). Os receptores dos peptídeos natriuréticos dos tipos NPr-A e NPr-C têm sido identificados em tecido adiposo de ratos quanto de humanos, sendo que a abundância de NPr-C neste tecido poderia explicar os baixos níveis de ANP observados em indivíduos obesos, pois este tipo de receptor pode participar da remoção dos peptídeos natriuréticos da circulação (FULLER et al., 1988; WANG et al., 2004).

No Brasil, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a prevalência de sobrepeso e obesidade, (índice de massa corporal maior o igual a  $25\text{kg/m}^2$ ) aumenta com a idade em mulheres, sendo de 37,85% na faixa etária de 30 a 44 anos e de 55% em mulheres entre 45 a 64 anos (WHO, 2003). Este aumento da obesidade entre as mulheres na pós-menopausa, principalmente a obesidade central (POEHLMAN et al., 1995; TOTH et al., 2000), está associado com profundas alterações no sistema cardiovascular, incluindo aumentos no volume sanguíneo, frequência cardíaca, massa cardíaca e pressão arterial sistêmica.

Por definição, obesidade é o estado de aumento da massa corporal mais especificamente de tecido adiposo em magnitude suficiente para determinar

conseqüências adversas à saúde (SPIEGELMAN & FLIER, 2001). A massa corporal adiposa é determinada pela diferenciação de células precursoras em novos adipócitos e pelo aumento do tamanho dos mesmos (hipertrofia) (RISTOW et al, 1998)

O controle central do balanço energético e do peso corporal tem sido intensivamente estudado e envolve mecanismos comportamentais do consumo e da atividade física, atuação do sistema nervoso autônomo sobre a regulação do metabolismo energético, bem como efeitos neuroendócrinos incluindo estímulos para a secreção de hormônios de crescimento, tireoidianos, cortisol, insulina e esteróides sexuais (SPIEGELMAN & FLIER, 2001).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na diferenciação de pré-adipócitos incluem inúmeros fatores de transcrição, tais como o PPARs (receptores ativadores da proliferação de peroxissomos), C/EBP (Proteínas de ligação enhancer), ADD1 (Fator 1 de diferenciação de adipócitos) e SREBP1 (Proteína de ligação 1 de regulação de esteróis) (SPIEGELMAN, 1998; KUBOTA et al., 1999).

O tecido adiposo atualmente não é conhecido apenas por ser um estoque de energia na forma de gordura rapidamente mobilizado durante o jejum ou outros períodos de necessidade de energia, por regulação hormonal (insulina, glicocorticóides) ou pelo Sistema Nervoso Simpático (catecolaminas) (STEPPAN & LAZAR, 2002). Hoje, este tecido é considerado um tecido dinâmico por sua alta capacidade de produzir e secretar moléculas sinalizadoras do estoque energético.

Os produtos de secreção das células do tecido adiposo, incluindo citocinas, quimiocinas e outras moléculas ativas, são conhecidos como adipocinas e apresentam funções endócrinas importantes para o balanço energético (STEPPAN & LAZAR, 2002), patogênese da síndrome metabólica (STEARS & BYRNE, 2001), estado inflamatório crônico do obeso (SKURK et al., 2007), reprodução, regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios, pressão arterial, fibrinólise e apetite, e para a função neuroendócrina e imune (MORA & PESSIN, 2002; KERSHAW & FLIER, 2004; RASOULI & KERN, 2008). Dentre as adipocinas, cita-se: leptina, resistina, adiponectina, RBP4 (Proteína de ligação ao retinol), visfatina, TNF- $\alpha$ , MCPs (Proteína quimioatraente de monócitos), IL-6.

Roeminch et al (1998) analisaram as influências do gênero sobre as concentrações plasmáticas de leptina e concluíram que os níveis séricos de leptina correlacionam-se positivamente com a adiposidade subcutânea e negativamente com os níveis de andrógenos. A distribuição da adiposidade na forma ginecóide, em contraposição à distribuição andróide, propicia melhor ação insulínica e dos glicocorticóides, os quais seriam fatores lipogênicos e estimuladores da síntese de leptina.

Entretanto, a adiposidade não é o único fator determinante nas concentrações de leptina circulante, sabe-se que as concentrações plasmáticas de insulina podem agir regulando as mudanças na secreção de leptina frente a alterações na ingestão energética. Havel (2000) sugere que a insulina aumenta a produção de leptina via aumento da utilização da glicose por vias oxidativas pelos adipócitos, e não só pelos seus efeitos diretos. Então, quando a glicose é metabolizada em direção ao piruvato de modo a gerar outros produtos que não o lactato, há uma sinalização celular que resulta em aumento na secreção de insulina.

A noradrenalina, atuando via receptores  $\beta$ -3 adrenérgicos, reduz a produção e os níveis circulantes de leptina, de modo que, para Trayhurn et al (1998), o Sistema Nervoso Simpático exerce papel chave na regulação da produção de leptina através da modulação da transcrição do gene *ob*.

A obesidade em humanos e também em roedores está associada a um aumento nos níveis de leptina circulantes, entretanto, indivíduos obesos apresentam resistência aos efeitos da saciedade e da redução de peso da leptina (RASOULI & KERN, 2008). Alguns mecanismos podem estar envolvidos na resistência à ação da leptina, tais como defeitos no acesso da leptina a sítios de ação no hipotálamo, limitando sua capacidade de ativar a sinalização intracelular da cascata STAT-3 de neurônios hipotalâmicos responsivos a leptina (EL-HASCHIMI et al., 2000; WILLIAMS et al., 2004).

A STAT-3 é um fator latente de transcrição gênica ativada pela ligação da leptina ao seu receptor (OB-Rb). Essa ligação determina a ativação da Janus Kinase (JAK2 - Janus Kinase) e fosforilação de resíduos de tirosina promovendo a dimerização e translocação do STAT-3 para o núcleo onde pode induzir a transcrição gênica (ANUBHUTI & ARORA, 2008).

A adiponectina, uma adipocina com característica anti-inflamatória, tem um importante papel na ação da insulina, pois melhora a sensibilidade da célula a este hormônio. Isso porque esta adipocina age aumentando o gasto energético e a oxidação de AGL (Ácidos graxos livres), sendo que a hipoadiponectinemia pode resultar em resistência a insulina e diabetes. (MATSUZAWA et al., 2004). Ela é considerada protetora contra o desenvolvimento de aterosclerose, devido a sua habilidade em produzir o NO levando a uma vasodilatação e melhorando o fluxo sanguíneo (CHEN et al., 2003).

A diminuição da concentração plasmática de adiponectina, observada na obesidade, apresenta também um significativo papel no desenvolvimento da Síndrome metabólica, visto que a concentração desta adipocina tem correlação com os múltiplos componentes desta síndrome (RYO et al., 2006). Os níveis de adiponectina plasmático são influenciados por múltiplos fatores, tais como gênero (as mulheres apresentam maiores níveis que os homens), idade, estilo de vida e dieta (KADOWAKI et al., 2006).

As moléculas com características pró-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo despertam um interesse crescente uma vez que estas podem contribuir para o desenvolvimento de complicações associadas à obesidade incluindo a hipertensão e a resistência a insulina. Ademais, muitas citocinas secretadas pelo tecido adiposo são fatores derivados não só dos adipócitos, mas também de macrófagos infiltrados localmente em função do status pró-inflamatório do tecido adiposo (BASTARD et al., 2006).

As alterações hipertróficas dos adipócitos encontram-se associadas a disfunções no tecido adiposo, incluindo aumento da síntese de moléculas bioativas como leptina, angiotensinogênio, citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (SKURK et al, 2007).

Skurk et al (2007) em seu estudo entre a relação do tamanho do adipócito e a expressão e secreção de adipocina concluiu que o tamanho dos adipócitos é um determinante importante para a secreção de algumas adipocinas. A secreção de adipocinas pró-inflamatórias está elevada em adipócitos maiores comparados com adipócitos pequenos ou médios. A hipertrofia dos adipócitos, que aparece na obesidade, parece alterar a secreção de adipocinas pró e anti-inflamatórias, mudando o balanço em direção a expressão de proteínas pró-inflamatórias.

Ademais, quando o excesso da ingestão de energia ultrapassa a capacidade de deposição no tecido adiposo podem-se observar deposições ectópicas de lipídeos em outros tecidos (como o hepático), resistência a insulina, hiperinsulinemia e ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona promovendo o desenvolvimento da hipertensão associada à obesidade (PAUSOVA, 2006).

A heterogeneidade funcional observada entre os depósitos de tecidos adiposos pode ser constatada pelas diferentes taxas de secreção das adipocinas, tais como, as interleucinas IL-6, IL-8 e o TNF- $\alpha$ , correlacionadas com o aumento da massa de tecido adiposo, hipertensão arterial e substancial risco de doenças cardiovasculares (DORFFEL et al., 1999; PAUSOVA et al., 2000; BASTARD et al., 2000; FERNANDEZ-REAL et al., 2001; GRUNDY, 2003; ROSENSON & KOENIG, 2003).

O tecido adiposo visceral, ou intra-abdominal, é caracterizado por ser relativamente mais vascularizado e possuir mais eferentes simpáticos por unidade de volume que o tecido adiposo subcutâneo. Suas propriedades adipogênicas, metabólicas, pró-aterogênicas e pró-trombóticas são usualmente, relacionadas a aumentos nos teores de AGL, que são lançados diretamente na circulação portal, determinando estresse inflamatório e oxidativo e diminuição na sensibilidade a insulina periférica e hepática (JESSEN, 2008; SHI & CLEGG, 2009; TARANTINO et al., 2010).

Já o tecido adiposo subcutâneo é um depósito disperso em uma ampla área sob a pele e é relativamente, pobremente innervado e vascularizado. Este é um tecido importante para a recaptção de ácidos graxos e do excesso calórico em mulheres e homens, visto que o depósito de lipídios fornece uma vantagem evolucionária que permite eficiente estocagem calórica máxima por unidade de volume de tecido. O tecido adiposo subcutâneo libera na circulação sistêmica os AGL produtos da lipólise, evitando os efeitos mais diretos no metabolismo hepático (TARANTINO et al., 2010).

No fígado, os AGLs são re-esterificados a triglicerídeos e empacotados sob a forma de VLDLs (Lipoproteína de muito baixa densidade) que são liberados, elevando assim os níveis desta lipoproteína na circulação sanguínea, bem como de

LDL. A elevação dessas duas lipoproteínas é acompanhando com o aumento dos níveis de triglicerídeos e redução do HDL (ECKEL et al., 2005). Além da alteração do perfil lipídico, os AGLs diminuem a extração hepática da insulina, contribuindo para o quadro de hiperinsulinemia sistêmica (WIESENTHAL et al., 1999).

Alterações na concentração e na resposta periférica a insulina são observadas tanto na obesidade (JEANRENAUD, 1979; GRILL & QVIGSTAD, 2000; MOOK et al., 2004), quanto no período pós-menopausal (CARR, 2003; LOBO, 2008).

A insulina é inibidora produção hepática de glicose pela inibição das enzimas envolvidas na gliconeogênese e da glicogenólise (SEPPALA-LINDROOS et al., 2002). No músculo, por sua vez, a translocação do Glut-4 (Receptor da glicose tipo 4) e a ativação da enzima glicogênio sintase, estimuladas pela insulina, determinam a sua captação por este tecido (CAVALHEIRA et al., 2002). No quadro de resistência a insulina associada a obesidade, a produção hepática de glicose é estimulada e a sua captação pelo músculo é reduzida, resultando num desbalanço da glicose, podendo levar a hiperglicemia.

No tecido hepático observam-se ainda alterações funcionais associadas ao quadro de obesidade e resistência a insulina, tais como, aumentos na produção de fatores de risco para doença cardiovascular e síndrome metabólica, tais como VLDL, fibrinogênio, PCR (Proteína C reativa), fator de von Willebrand e PAI- 1 (Inibidor do ativador do plasminogênio) (TARANTINO et al, 2010).

Randle et al (1963) já relatavam que os ácidos graxos funcionavam como fator energético no controle metabólico, visto que estes competem com a glicose como substrato oxidativo da célula. Neste caso, o aumento da oxidação dos ácidos graxos determina diminuição da oxidação de carboidratos.

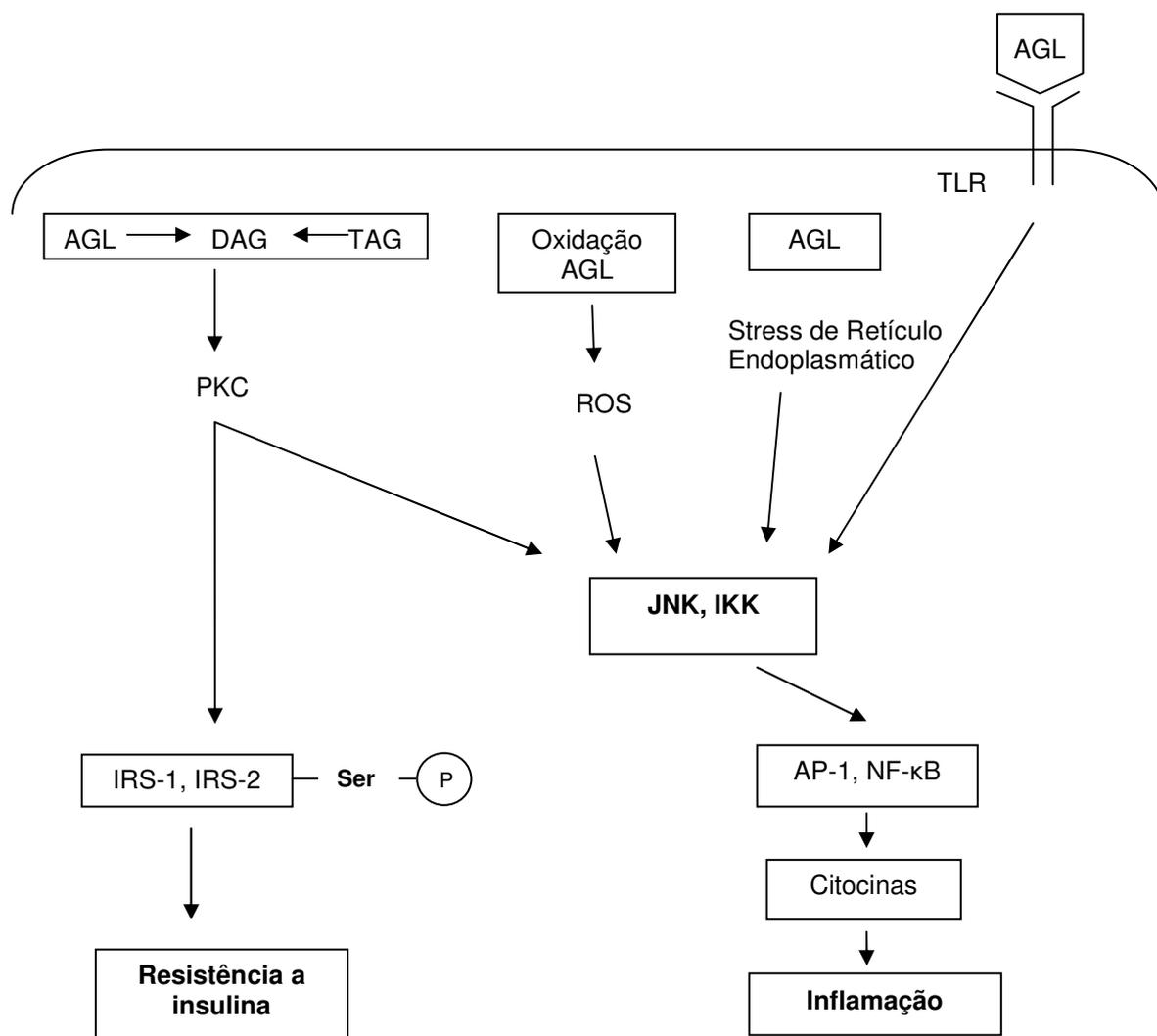
A resistência a insulina periférica ocorre por defeitos na sinalização intracelular. O receptor da insulina é constituído de 4 subunidades (duas  $\alpha$ -extracelular e duas  $\beta$ -transmembrana) com atividades intrínsecas de tirosina quinase. Quando ativado, pela ligação com o hormônio, a tirosina quinase fosforila o próprio receptor nos resíduos de tirosina bem como os IRS (Substratos do receptor de insulina ) também nestes resíduos (CARVALHEIRA et al., 2002).

As Teorias da Lipotoxicidade e da Inflamação buscam justificar e explicar o desenvolvimento da resistência a insulina observada na obesidade.

Alterações nas concentrações plasmáticas de AGL e outras moléculas do metabolismo lipídico como Acil-CoA (Acil-Coenzima A), ceramidas e DAG (Diacilglicerol) levam a ativação de proteínas quinases, e conseqüentes fosforilações dos resíduos de serina/treonina destes IRS, resultando em falha na cascata de sinalização da insulina (QATANI & LAZAR, 2007; HOTAMISLIGIL & ERBAY, 2008; ERION & SHULMAN, 2010). Além disso, a via do IKK $\beta$  (*I $\kappa$ B Kinase*) também pode ser ativada por meio da fosforilação da porção inibitória I $\kappa$ B que resulta em liberação do NF- $\kappa$ B (Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B) para o núcleo, onde funciona como um fator de transcrição levando a ativação de genes pró-inflamatórios (PERSEGHIN et al., 2003). A inibição farmacológica da via IKK2 bloqueia a esteatose hepática e a iniciação da esteato-hepatite, demonstrando a participação desta via na inflamação e na resistência à insulina que ocorre no fígado nesta condição (BERAZA et al., 2008).

No entanto, para Samuel et al (2004), as principais vias pró-inflamatórias que participam da resistência a insulina no fígado envolve o sistema JNK1 (Jun N-terminal Kinase) e PKC. Pela via JNK1, sinais inflamatórios externos levam a fosforilação e ativação da JNK, o qual, por sua vez fosforila o N-terminal de c-Jun de genes alvo, ativando também a transcrição de genes pró-inflamatórios.

Ademais, o acúmulo de triglicerídeo no hepatócito eleva o metabolismo local resultando em estresse oxidativo mitocondrial com aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 1).



**Figura 1:** Mecanismo proposto para a resistência a insulina associada a um aumento nos níveis de AGL. Os metabólitos DAG ou ROS ativam a cascata de serina/treonina quinase iniciado pela ativação das PKC ou pela IKK $\beta$  ou JNK levando a fosforilações dos resíduos de serina/treonina dos IRS-1 e 2. O resultado é alteração dos eventos associados à sinalização do receptor de insulina e a transcrição de genes relacionados a inflamação (Adaptado de Maher et al., 2008).

O aumento de ROS promove a peroxidação lipídica de membrana, secreção de citocinas pró-inflamatórias e consumo de enzimas e vitaminas envolvidas com o sistema antioxidante no fígado (ARAYA et al., 2004).

A Doença Gordurosa Não Alcoólica do Fígado (NAFLD – *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) é uma manifestação hepática do quadro de resistência a insulina. Esta alteração é observada na síndrome metabólica associada a obesidade e, potencialmente a outros fatores tais como, as dietas ricas em grandes quantidades de frutose e certos tipos de lipídios, mas não relacionada ao uso de álcool. A esteatose hepática é um tipo de NAFLD, onde apenas a deposição de gordura é

observada, enquanto na esteato-hepatite (NASH), quadro mais grave da NAFLD, é possível observar além da esteatose um quadro inflamatório associado, com aumento da expressão de mediadores inflamatórios, dano celular e fibrose (GARG & MISRA, 2002; ECKEL et al., 2005, CAVE et al., 2007; LI et al., 2009).

Os mecanismos de desenvolvimento e progressão da NAFLD não estão totalmente elucidados, mas a resistência a insulina, o estado inflamatório e outros fatores como a dieta podem estar incluídos (LIU et al., 2010).

É documentado que somente a obesidade, não associada a inflamação, não resulta em resistência a insulina periférica, assim como a esteatose, sem o quadro da NASH, não leva a resistência insulina hepática (OLEFSKY & GLASS, 2010). O TNF- $\alpha$  tem sido proposto como a chave entre obesidade e resistência a insulina, pois o tecido adiposo de animais e humanos obesos super expressa essa citocina. O quadro de esteato-hepatite geralmente cursa com maiores níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 do que a esteatose simples (HIJONA et al., 2010). A inflamação e a resistência a insulina frequentemente são vistas ocorrer em paralelo, o que reforça um mecanismo de feed-back positivo entre estas vias, sugerindo que a inter-relação entre vias inflamatórias e metabólicas é central na patogênese e progressão da NAFLD (LIU et al., 2010).

Para o diagnóstico da NAFLD é possível utilizar parâmetros bioquímicos como o perfil lipídico e os níveis das aminotransferases (AST – aspartato aminotransferase, e ALT – alanina aminotransferase), apesar destas enzimas nem sempre estarem alteradas (ARAYA et al., 2004). O método “padrão-ouro” para avaliar a NAFLD é a biópsia, apesar da sua necessidade na rotina clínica ser controversa (POYNARD et al., 2005).

O perfil histopatológico descrito para a esteatose hepática pode incluir degenerações lipídicas dos hepatócitos, com padrão macro ou microvesicular, além de alterações por infiltração de células inflamatórias e de tecido fibrótico (KLEINER et al., 2005). Os macrófagos que infiltram o sinusóide do tecido hepático são conhecidos como células de Kupffer e se comunicam com os hepatócitos de maneira análoga dos macrófagos com os adipócitos (OLEFSKY & GLASS, 2010).

A esteatose hepática pode ser classificada em grau de acordo com a porcentagem de hepatócitos acometidos por degeneração macrovesicular, sendo

grau 0 (<5%), 1 (5-33%), 2 (33-66%) e 3 (>66%) (KLEINER et al., 2005). Quanto maior o grau da esteatose, maior a probabilidade para o desenvolvimento da esteato-hepatite, porém, esta última alteração não requer um grau particular de esteatose (LIU et al., 2010).

Quando além da obesidade, especialmente a central, alterações que incluem intolerância a glicose (diabetes tipo 2, prejuízo na tolerância a glicose ou na glicemia de jejum), resistência a insulina, dislipidemia e hipertensão arterial também estão presentes, é reconhecido o quadro de síndrome metabólica (ECKEL et al., 2005). Pessoas com essas características comumente manifestam um estado pró-trombótico e pró-inflamatório (ALBERTI et al., 2009).

Conhecida também como Síndrome X ou Síndrome da Resistência a insulina, a síndrome metabólica é um conjunto de anormalidades metabólicas que refletem os efeitos pleiotrópicos da insulina, e não está limitada apenas a alteração na homeostase da glicose (OLEFSKY & GLASS, 2010).

O aumento da prevalência da síndrome metabólica em mulheres pós-menopausadas pode, parcialmente explicar a aparente aceleração de doenças cardiovasculares depois da menopausa. Durante esse período, a redução brusca dos níveis de estrógeno pode determinar, senão a obesidade, uma alteração da disposição do tecido adiposo, resultando em formas mais andrógenas. Além deste efeito, a escassez de estrógeno também se reflete no aumento dos níveis pressóricos e no perfil lipídico. A emergência desses fatores de risco pode ser um resultado direto da falência ovariana ou um resultado indireto das conseqüências metabólicas da redistribuição da gordura com a deficiência de estrógeno (CARR, 2003).

A descoberta que o tecido adiposo de camundongos e humanos são infiltrados com um número aumentado de macrófagos fornece o maior avanço sobre o entendimento de como a obesidade propaga a inflamação e como a inflamação determina a resistência à insulina (WEISBERG et al., 2003). O conteúdo de macrófagos no tecido adiposo é paralelo ao grau de obesidade e estas células constituem a maior fonte de citocinas pró-inflamatórias que levam à diminuição da sensibilidade a insulina (GOLLISH et al., 2009).

A relação existente entre idade, obesidade e aumento da gordura visceral com síndrome metabólica, resistência a insulina e doenças associadas a essas

condições é complexa. Por isso, para entender como esses fatores estão relacionados e a fisiopatologia da obesidade, os modelos experimentais animais são de grande importância e alguns resultados obtidos a partir destes modelos podem explicar algumas observações em humanos (DAS et al., 2004).

Ratos usados em laboratório possuem espaço restrito para movimentação, o que associado ao livre acesso a dietas palatáveis, pode determinar ganho de peso com conseqüente aumento da massa adiposa. De uma maneira geral, as dietas ricas em gordura produzem um significativo aumento no conteúdo da massa adiposa que é dependente da quantidade de gordura na dieta e da duração do tratamento. Não está claro se a correlação entre a quantidade de gordura dietética consumida e o conteúdo da adiposidade corporal é atribuível a ingestão de maiores quantidades de energia ou a características metabólicas dessas dietas que promovam o estoque de lipídios independente da quantidade de energia consumida (WEST & YORK, 1998).

Modelos de roedores alimentados com dietas ricas em gordura resultam em maiores deposições de lipídios não sendo a hiperfagia necessariamente observada. Relatos de alterações metabólicas associadas ao consumo de dietas ricas em gorduras por roedores incluem a redução da atividade física e a modificação do metabolismo basal (WEST & YORK, 1998).

Entretanto, os modelos animais empregados nos estudos da obesidade variam muito, tornando difíceis as interpretações e comparações de dados experimentais. Os modelos animais de obesidade por modificações genéticas podem fornecer conhecimentos a cerca das mudanças fisiológicas desta condição, porém, os modelos animais de obesidade baseado em dieta revelam os mecanismos fundamentais da obesidade que podem ser aplicáveis na população humana. No entanto, até mesmo entre os estudos da obesidade baseados em dieta, há diferenças significativas na composição da dieta, duração do tratamento e desenho do estudo (LAUTERIO et al., 1994; WEST & YORK, 1998).

Os modelos animais utilizados para o estudo dos efeitos metabólicos da ausência do estrógeno, também incluem diferentes técnicas, tais como, animais transgênicos, antagonistas dos receptores do estrógeno e ovariectomia.

Apesar da ovariectomia não retratar o processo da pós-menopausa tal como ocorre naturalmente, pois este é um processo longo e gradual em que a secreção de estrógeno não cessa abruptamente, este procedimento permite a avaliação indireta dos efeitos do estrógeno na ingestão de alimentos, peso corporal, pressão arterial, perfil metabólico, dentre outras variáveis (SHI & CLEGG, 2009).

Neste contexto, modelos experimentais de obesidade induzida pelo fornecimento de dietas hipercalóricas padronizadas a ratas ovariectomizadas podem fornecer informações importantes para a compreensão de alterações nos perfis metabólico e inflamatório associados à obesidade e à ausência de estrógeno.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo buscou avaliar o impacto da ovariectomia sobre alterações metabólicas e inflamatórias em modelos de obesidade induzidos por dietas hipercalóricas em ratas Wistar.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ratas ovariectomizadas e controles submetidas a dietas hipercalóricas buscou-se:

- 1) Avaliar o consumo alimentar, pressão arterial sistólica e o ganho de peso.
- 2) Determinar o perfil sérico de glicose, colesterol total e triglicerídeo.
- 3) Comparar os níveis plasmáticos de insulina, bem como o índice de resistência a insulina.
- 4) Avaliar a tolerância à glicose.
- 5) Comparar o perfil morfométrico e histológico do parênquima hepático.
- 6) Quantificar os marcadores para macrófagos (ED-1) e linfócito (CD4) nos depósitos de tecido adiposo mesentérico, parametrial e no parênquima hepático.
- 7) Avaliar os níveis plasmáticos de marcadores de inflamação sistêmica (TNF- $\alpha$ ).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E DIETAS EXPERIMENTAIS

Ratas Wistar (n=30) pesando 150 a 200g foram obtidas do Biotério Setorial do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia em Salvador/BA, e mantidas no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde/UFBA em ambiente com controle de luz (12 horas luz, das 7 às 19:00 h) e temperatura ( $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração.

As ratas foram ovariectomizadas com 10 semanas de idade e receberam, após este procedimento, ração semipurificada controle (Pragsoluções Biociências, SP) por um período de adaptação de uma semana e em seguida foram distribuídas aleatoriamente entre os três tratamentos dietéticos descritos a seguir por um período de 26 semanas:

- Dieta hipercalórica hiperlipídica semipurificada (DL) (n=10)
- Dieta hipercalórica hipersacarídica semipurificada (DS) (n=10)
- Dieta controle semipurificada (DC) (n=10)

As dietas experimentais foram calculadas utilizando-se como base a recomendação para dietas de roedores de laboratórios elaborada pelo American Institute of Nutrition e reportada por Reeves et al (1993). As proporções dos ingredientes nas dietas experimentais foram calculadas visando mantê-las isoprotéicas e com diferentes densidades energéticas. A composição de ingredientes expressa na base da matéria seca e a composição bromatológica das dietas encontram-se descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1:** Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais controle (DC), hiperlipídicas (DL) e hipersacarídica (DS)

Ingredientes	DC	DL	DS
	% Matéria seca		
Amido de milho	37,38	13,88	3,87
Farelo de soja	30,50	30,50	30,50
Sacarose	6,50	6,00	30,00
Sebo bovino	0,0	24,00	15,00
Maltodextrina	10,00	10,00	5,00
Gordura Protegida de soja	7,5	7,50	7,50
Celulose Microcristalizada	3,17	3,17	3,17
L-cistina	0,30	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15
Mistura mineral (AIN-93M-MX) <sup>1</sup>	3,50	3,50	3,50
Mistura Vitamínica (AIN-93-VX) <sup>2</sup>	1,00	1,00	1,00
Tert-butil-hidroquinona (BHT)	0,001	0,003	0,003
Total	100,00	100,00	100,00

<sup>1</sup>Mistura mineral AIN-93G-MX: 35,7% de carbonato de cálcio; 25% de fosfato monabásico de potássio; 7,4% de cloreto de sódio; 4,66% de sulfato de potássio; 2,8% de citrato de potássio; 2,4% de óxido de magnésio; 0,606% de citrato férrico; 0,165% de carbonato de zinco; 0,063% carbonato de manganês; 0,03% de carbonato de cobre; 0,001% de iodato de potássio; 0,001% de selenito de sódio; 0,0008% de paramobdato de amônia; 0,145% de metasilicato de sódio; 0,0275% de sulfato de potássio e cromo; 0,0082% de ácido bórico; 0,00635% de fluoreto de sódio; 0,00318% de carbonato de níquel; 0,00174% de cloreto de lítio; 0,00066% vanadato de amônio; 20,98% de sacarose em pó.

<sup>2</sup>Mistura vitamínica AIN-93-VX- Composição de vitaminas por kg de dieta: 30mg de ácido nicotínico; 15mg de ácido pantotênico; 6mg de piridoxina; 5mg de tiamina; 6mg de riboflavina; 2mg de ácido fólico; 750µg de vitamina K; 200µg de D-biotina; 25µg de vitamina B-12; 4000UI de vitamina A; 1000UI de vitamina D3; 75UI vitamina E.

A composição bromatológica das dietas experimentais, calculada com base nos valores das análises laboratoriais dos alimentos e da proporção dos ingredientes, encontra-se descrita na tabela 2.

**Tabela 2:** Composição bromatológica das dietas experimentais controle (DC), hiperlipídicas (DL) e hipersacarídica (DS)

Item	Dietas Experimentais		
	DC	DL	DS
Matéria seca (g.kg <sup>-1</sup> )	82,93	85,25	86,89
Cinzas (g.kg <sup>-1</sup> )	2,78	2,74	2,74
Proteína Bruta (g.kg <sup>-1</sup> )	15,1	15,0	14,9
Extrato etéreo (g.kg <sup>-1</sup> )	6,97	30,85	21,85
Carboidratos totais (g.kg <sup>-1</sup> )	66,76	42,97	52,10
Valores estimados de energia metabolizável			
Energia Metabolizável (Mcal.kg <sup>-1</sup> )	3,99	5,19	4,73

As contribuições das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total de energia metabolizável das dietas experimentais encontram-se descrito na tabela 3.

**Tabela 3:** Contribuição das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total da energia metabolizável nas dietas experimentais

Item	Dietas experimentais		
	DC	DL	DS
Energia Metabolizável (Mcal/kg <sup>-1</sup> )	3,99	5,19	4,73
% de contribuição das frações dietéticas na Energia Metabolizável			
Proteína	32,36	24,89	27,32
Carboidratos	54,25	23,24	32,85
Gorduras	12,39	51,1	38,98
Vitaminas	1,00	0,77	0,85

Os carboidratos totais dietéticos diferiram quanto as fontes entre as dietas experimentais conforme descrito na tabela 4.

**Tabela 4:** Contribuição das frações de amido de milho, farelo de soja, sacarose e maltodextrina na composição dos carboidratos totais nas dietas experimentais

Item	Dietas experimentais		
	DC	DL	DS
Carboidratos totais (g.kg <sup>-1</sup> )	66,76	42,97	52,10
Contribuição das fontes de carboidratos na dieta (g.kg <sup>-1</sup> )			
Amido de milho	37,06	13,76	3,86
Farelo de soja	13,42	13,42	13,42
Sacarose	6,49	5,99	29,95
Maltodextrina	9,8	9,8	4,9

Todo o protocolo experimental descrito neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS/BA).

#### 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, onde foram comparados os efeitos dos diferentes tratamentos dietéticos sobre ganho de peso, perfil de distribuição de gordura corporal, perfil bioquímico plasmático, tolerância a glicose, perfil inflamatório sistêmico e dos depósitos de tecido adiposo abdominais e do parênquima hepático de ratas ovariectomizadas.

Os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia (O) para simular a falta de estrógeno ou sham (S) para simular o estresse cirúrgico sem a retirada dos ovários. Todas as ratas se encontravam com dez semanas de idade e receberam injeção intraperitoneal de solução anestésica composta por xilazina (5mg/kg) e quetamina (50mg/kg) e antibioticoterapia profilática com enrofloxacino - Flotril® 2,5% (5mg/kg). Foram feitas incisões em ambos os flancos

para a remoção dos ovários, ou não, e por fim a pele e o músculo foram suturados, de acordo com a técnica corrente em endocrinologia.

Após o procedimento cirúrgico e o período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre seis grupos experimentais com 5 (cinco) animais cada, e permaneceram nestes tratamentos dietéticos durante 26 (vinte e seis) semanas:

- Ratas sham alimentadas com dieta controle (DCS)
- Ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta controle (DCO)
- Ratas sham alimentadas com dieta hiperlipídica (DLS)
- Ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica (DLO)
- Ratas sham alimentadas com dieta hipersacarídica (DSS)
- Ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hipersacarídica (DSO)

Todos os animais foram acondicionados em caixas próprias e tiveram livre acesso à água e a sua respectiva dieta.

Foram realizadas medidas de peso corporal e pressão arterial semanalmente durante todo o período de tratamento dietético.

Ao final deste período todos os animais foram sacrificados, em jejum, por decapitação e o sangue torácico coletado em tubos contendo anticoagulante heparina para obtenção de plasma para a análise do hormônio insulina e de TNF- $\alpha$  e em tubos de vidro simples para obtenção do soro para as análises bioquímicas.

Os depósitos de tecido adiposo mesentérico, parametrial e retroperitoneal, bem como o fígado foram submetidos a pesagem e fixados para a realização das técnicas histológicas e de imuno-histoquímica.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E DA PRESSÃO ARTERIAL

O peso corporal e a pressão arterial foram avaliados semanalmente. Medidas do peso corporal foram realizadas através da balança digital Acculab®. A pressão arterial foi avaliada pelo método de pletismografia de cauda utilizando o equipamento digital LE 5001 – Panlab .

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Mensalmente os animais foram acondicionados por 4 dias em gaiolas metabólicas, com livre acesso à água e à respectiva dieta. O primeiro dia do ensaio metabólico tinha o objetivo de adaptar as ratas neste novo ambiente, sendo os 3 dias posteriores usados para a avaliação da ingestão alimentar diária através da diferença entre a quantidade de ração fornecida ao animal e as sobras de ração ao final de 24 horas. Essa diferença revelava a quantidade de ração ingerida (g)/dia e a ingestão calórica diária era calculada a partir da densidade energética das dietas (Tabela 2).

#### 4.5 PERFIL BIOQUÍMICO PLASMÁTICO

As amostras de sangue obtidas após o sacrifício dos animais foram centrifugadas (centrífuga HT MCD-2000) durante 10 minutos a 4000 x g e o soro e o plasma foram separados. Os soros foram utilizados para as análises bioquímicas de glicose, colesterol total e triglicérideo por meio de kits comerciais enzimáticos colorimétricos, da marca Bioclin®, de acordo com as especificações do fabricante. As leituras das absorbâncias dos testes foram realizadas em espectrofotômetro SP-220-Biospectro®.

#### 4.6 TOLERÂNCIA À GLICOSE

Após as 26 semanas de dieta, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas para avaliar a tolerância à glicose. Ainda em jejum, correspondendo ao tempo 0 (zero), as ratas foram submetidas a uma pequena secção na extremidade distal da cauda por onde as gotas de sangue foram coletadas para a dosagem da glicemia. Em seguida, foi administrada uma injeção intraperitoneal de solução de 50% de glicose na dose de 1g/kg ou 0,2 mL/100g de peso do animal, e recoletado o

sangue da cauda nos tempos 30, 60 e 90 minutos após a injeção. As dosagens de glicose foram feitas em glicosímetro digital manual (Accu-check Performa®) utilizando as tiras reagentes apropriadas.

Foi construído o gráfico da Tolerância a glicose destes animais a partir da relação tempo e concentração da glicemia sanguínea e feita a comparação da área sob a curva destes gráficos obtidos.

#### 4.7 DOSAGEM DE INSULINA / DETERMINAÇÃO DO HOMA-IR

A dosagem de insulina sérica foi realizada no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por meio da técnica de radioimunoensaio (RIA) utilizando kit comercial específico Linco Research®, St Charles, MO – USA.

As dosagens de insulina foram realizadas adicionando-se 100µL de plasma à um tubo contendo o tampão do kit, a insulina marcada I<sup>125</sup> e o anticorpo anti-insulina de rato. As amostras foram incubadas “overnight” a 4°C. Neste ambiente, a insulina não marcada (da amostra) e a marcada competem pelos sítios de ligação do anticorpo específico. No segundo dia, o reagente precipitante foi adicionado aos tubos das reações e estes foram centrifugados a 4°C por 20 minutos para a separação e obtenção de um “pellet” firme cuja radiação emitida foi lida em contador gama após a remoção do sobrenadante. A concentração da insulina foi dada em ng/mL por meio da construção de curva de calibração com os reagentes calibradores próprios do kit.

A resistência a insulina foi estimada por meio do cálculo do HOMA-IR (Homeostatic model assessment), a partir da concentração da insulina plasmática de jejum (µUI/mL) e da concentração da glicose de jejum (mmol/L) dos animais (WALLACE et al, 2004). Conforme a fórmula descrita a seguir:

$$\text{HOMA1-IR} = (\text{FPI} \times \text{FPG})/22.5$$

Onde, FPI é a concentração plasmática de insulina basal (jejum) (µUI/mL) e FPG, a concentração plasmática de glicose basal (jejum) (mmol/L). Para a conversão da glicose de mg/dL para mmol/L, multiplicou-se o valor em mg/dL por 0,0555.

#### 4.8 ENZIMAIMUNOENSAIO (ELISA) / DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ PLASMÁTICO

Para a dosagem de TNF- $\alpha$  plasmático foi utilizado o kit comercial de ELISA (Abcam®) tipo sanduíche em fase sólida específico para esta citocina de ratos e o procedimento foi realizado conforme as orientações do fabricante.

A técnica consistiu na utilização de uma placa de 96 poços sensibilizados com os anticorpos policlonais anti-TNF- $\alpha$  específicos para ratos que podem se ligar aos antígenos presentes nas amostras (TNF- $\alpha$ ) as quais são adicionadas em cada poço simultaneamente ao anticorpo policlonal biotilado específico para o TNF- $\alpha$  de rato (anticorpo secundário). Esta primeira incubação ocorreu por 3 horas em temperatura ambiente. Na etapa seguinte, realizou-se a lavagem dos poços com tampão PBS por 3 vezes e a pipetagem da enzima peroxidase (HRP - *Horse radish peroxidase*) conjugada à estreptavidina. Após a incubação e lavagem dos poços com tampão PBS por 3 vezes para a remoção de toda enzima não ligada, a solução substrato da enzima (peróxido de hidrogênio) foi adicionada reagindo com a enzima ligada, o que induziu a produção de uma reação de cor pela presença do cromógeno TMB (tetrametilbenzidina), cuja intensidade é proporcional a concentração de TNF- $\alpha$  na amostra. A leitura da reação de ELISA foi realizada em equipamento próprio a 450nm.

#### 4.9 HISTOLOGIA / AVALIAÇÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA

Amostras de tecido hepático e dos depósitos de tecido adiposo retirados após o sacrifício dos animais foram imediatamente fixados em “Metacarn” preparado a partir da seguinte proporção:

Metanol -----	60mL
Clorofórmio -----	30mL
Ácido acético glacial -----	10mL

Os tecidos permaneceram nesta solução de fixação por 24 horas, e a seguir foram mantidos em solução de álcool 70°.

O tecido hepático foi embebido em parafina para formação de um bloco posteriormente cortado em secções de 4µm no micrótomo. Foram confeccionadas lâminas de microscopia para cada animal, contendo dois cortes, que foram desparafinizados, corados em HE (hematoxilina-eoxina) e montados com bálsamo e lamínula para avaliação da morfologia dos hepatócitos.

Em cada lâmina, um dos cortes foi selecionado para a avaliação histológica, que consistiu na leitura de 20 campos microscópios em aumento de 100X. Em cada um dos 20 campos analisados foram contados o número total de hepatócitos, o número de hepatócitos com microvesículas e o número de hepatócitos com macrovesículas. A partir destes dados foi possível construir gráficos da porcentagem de hepatócitos acometidos com macro ou microvesículas de gordura.

O grau de esteatose foi determinado a partir do escore de Brunt (KLEINER et al., 2005):

grau 0: quando <5% dos hepatócitos apresentam macrovesículas

grau 1: quando 5-33% dos hepatócitos apresentam macrovesículas

grau 2: quando 33-66% dos hepatócitos apresentam macrovesículas

grau 3: quando >66% dos hepatócitos apresentam macrovesículas

#### 4.10 IMUNO-HISTOQUÍMICA / AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Os cortes do tecido hepático e dos depósitos de tecido adiposo destinados a avaliação imuno-histoquímica, foram preparados conforme descrito para a técnica da histologia. No entanto, os cortes obtidos foram acomodados em lâminas de microscopia tratadas com lisina para a realização da técnica de imuno-histoquímica para marcação de células inflamatórias (macrófago/monócito e linfócito).

Os cortes foram desparafinizados por meio de um sequência de 3 “banhos” em xilol, de 5 minutos cada, e hidratados em álcool de concentração decrescente (Álcool 100% por 5 minutos, álcool 95% por 4 minutos e álcool 75% por 1 minuto). Com a finalidade de melhorar as reações, foi realizada uma fase de tratamento das lâminas com tampão citrato em microondas (1 minuto em potência alta e 4 minutos em potência média, sem deixar ferver) e resfriamento por 20 minutos em gelo. A

peroxidase endógena foi bloqueada utilizando-se uma solução preparada com peróxido de hidrogênio 30% (196mL de água destilada, 2mL de azida sódica 10% e 2mL de peróxido de hidrogênio 30%), onde as lâminas foram mergulhadas durante 10 minutos com posterior lavagem em tampão PBS com Tween.

Para a avaliação da infiltração de macrófagos/monócitos, os cortes dos tecidos hepático e adiposo mesentérico e parametrial foram incubados por 60 minutos a temperatura ambiente com 50µL de anticorpo anti-ED-1 (AbD serotec®), diluído 1/1000 (Dijkstra et al., 1985). A seguir foram realizadas duas lavagens com tampão PBS com Tween de 5 minutos cada para remoção do excesso de anticorpo não ligado e posteriormente realizou-se uma incubação com 50µL anticorpo secundário monoclonal biotilado (IgG anti-mouse – Bethyl Laboratories®) diluído 1/200 por 30 minutos a temperatura ambiente. Novamente as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão PBS e, após a adição de 50µL do complexo Avidina-Biotina sobre os cortes, foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. O desenvolvimento da cor deveu-se a adição de 50µL do cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB - 3,3-Diaminobenzidina - Easypath®) sobre os cortes pela reação deste com o complexo avidina-biotina-peroxidase. Realizou-se a contracoloração dos cortes em banho de hematoxilina de Harris, por 10 minutos para as lâminas de fígado e 5 minutos, para as de tecido adiposo mesentérico e parametrial. A montagem das lâminas foi realizada com “PermOUNT”

Para a avaliação da infiltração de linfócitos no tecido hepático e nos depósitos de tecido adiposo parametrial e mesentérico, foi realizada imunohistoquímica com anticorpos anti-linfócitos (Mc Ab anti-rat T-lymphocyte purified IgG, Harlan Sera-Lab, MAS 010 P. Human CD43 Equivalent). O procedimento seguiu a técnica anteriormente descrita para a marcação de macrófagos/monócitos. No entanto, os anticorpos primários anti-linfócitos foram diluídos 1/200 e a incubação dos cortes foi em geladeira “overnight”.

Em cada corte de tecido hepático foram analisados 25 campos microscópicos com aumento de 40X, onde foram contadas as células marcadas em castanho (macrófagos/monócitos ou linfócitos). Foi calculada a média do número de células/campo microscópico de cada corte para comparação da infiltração de macrófagos/monócitos ou de linfócitos entre os grupos experimentais.

Para os cortes dos depósitos de tecido adiposo de cada animal foram analisados de 15 a 20 campos microscópicos com aumento de 40X, onde foram

contadas as células marcadas em castanho (macrófagos/monócitos ou linfócitos) e nas lâminas com marcação para ED-1 também foi analisada a presença de estruturas tipo “crown-like” definidas por Kolak et al (2007).

Foi calculada a média do número de células/campo microscópico e de estruturas “crown-like”/campo de cada corte para comparação da infiltração de macrófagos/monócitos ou de linfócitos em cada um dos diferentes depósitos de tecido adiposo dos grupos experimentais.

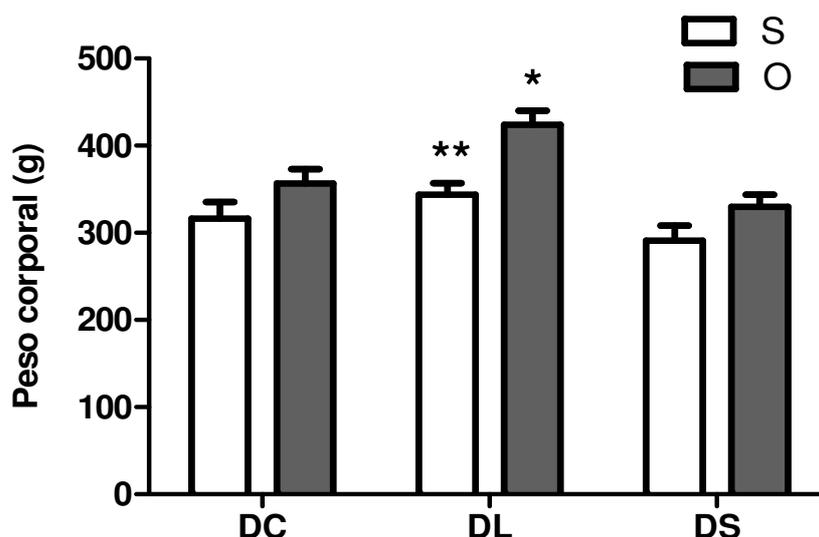
#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os animais foram distribuídos de maneira aleatória entre os grupos, mantidos em ambiente com condições controladas e uniformes, e submetidos aos procedimentos cirúrgicos (sham ou ovariectomia) e aos tratamentos dietéticos (dieta controle, hiperlipídica e hipersacarídica). Para comparar as médias entre os grupos estudados foi determinada a variação individual ou variação do erro ( $s^2$ ), através de análise de variância Anova two way pelo programa estatístico GraphPad Prisma 5. Foi empregado o teste estatístico Bonferroni para a avaliação dos efeitos das dietas e da ovariectomia e comparação das médias entre os grupos experimentais. Os resultados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média. Como critério para significância, foi considerado  $p < 0,05$ . Análises de correlação de Pearson foram realizadas entre parâmetros inflamatórios nos tecidos hepáticos e adiposos e a resistência a insulina, medida pela área sob a curva do teste de tolerância a glicose, utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prisma 5 e considerando os valores das médias mais ou menos o erro padrão da média e o número de amostras em cada grupo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PESO CORPORAL E DISTRIBUIÇÃO DE GORDURA

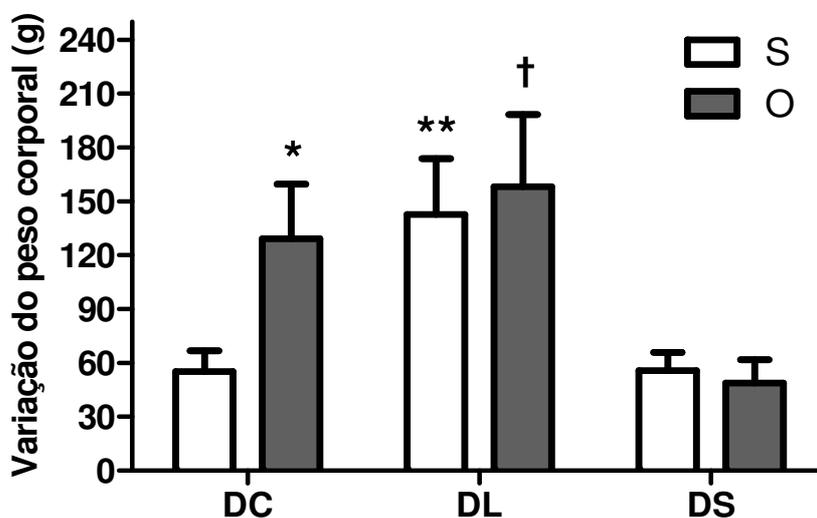
A análise do peso corporal médio dos grupos experimentais revelou que o grupo DLO apresentou o maior peso em relação aos grupos DCO, DLS e DSO demonstrando o efeito combinado da dieta hiperlipídica com a ovariectomia no peso ao fim das 26 semanas de tratamento dietético, conforme apresentado na figura 2. O efeito da dieta hiperlipídica isoladamente foi maior que da dieta hipersacarídica, demonstrado pelo maior peso corporal final do grupo DLS em relação ao grupo DSS.



**Figura 2:** Peso corporal médio de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas controle (DCO e DCS), hiperlipídica (DLO e DLS) e hipersacarídica (DSO e DSS) após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 7 a 11. \*DLO vs DCO ( $p < 0,05$ ), DLS ( $p < 0,01$ ) e DSO ( $p < 0,001$ ); \*\*DLS vs DSS ( $p < 0,05$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 2,17% do total da variância.

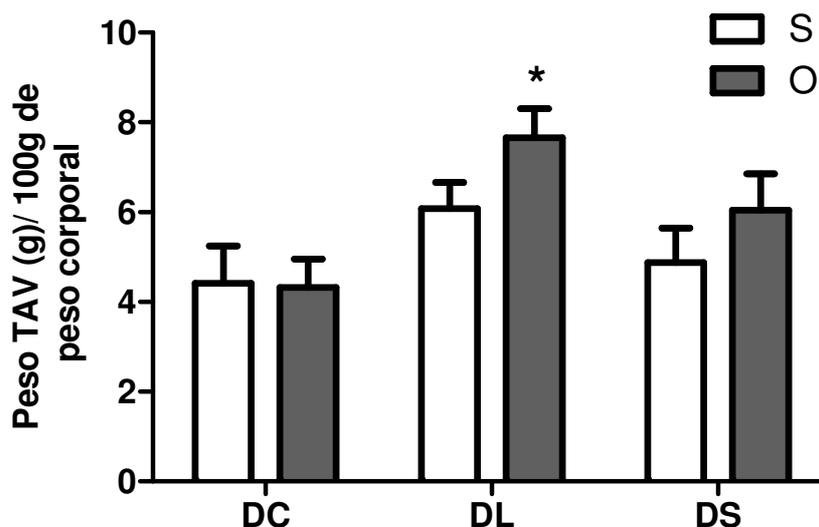
O ganho de peso corporal ao longo das 26 semanas experimentais (Figura 3) foi significativamente maior nos grupos DLO, DLS e DCO, demonstrando efeito da ovariectomia isoladamente ou associada a dieta hiperlipídica sobre o ganho de peso. Por outro lado, a dieta hiperlipídica isoladamente também apresentou efeito importante sobre este parâmetro analisado. A dieta hipercalórica hipersacarídica

isoladamente ou associada a ovariectomia (grupos DSS e DSO) não determinou ganho de peso significativo.



**Figura 3:** Variação do peso corporal médio de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas controle (DCO e DCS), hiperlipídica (DLO e DLS) e hipersacarídica (DSO e DSS) ao final de 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 6 a 9. \*DCO vs DSO; \*\*DLS vs DCS e DSS; †DLO vs DSO, teste de Bonferroni ( $p < 0,001$ ). A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 4,12% do total da variância.

A soma do peso dos depósitos de tecido adiposo visceral (mesentérico, parametrial e retroperitoneal) apresentou-se significativamente maior nos animais do grupo DLO (Figura 4) quando corrigidos pelo peso do animal.



**Figura 4:** Peso do tecido adiposo visceral (mesentérico, parametrial e retroperitoneal) corrigido pelo peso corporal após 26 semanas de dieta experimental. O número de animais por grupo variou entre 5 a 8. \*DLO vs DCO, teste de Bonferroni ( $p < 0,01$ ). A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 2,78% do total da variância.

A tabela 5 fornece os dados de pesos dos diferentes depósitos de tecido adiposo visceral entre os diferentes grupos experimentais. Os grupos DLS e DLO apresentam maior depósito de tecido adiposo mesentérico. Já o tecido adiposo parametrial é maior nos grupos DLS e DSS em relação ao seu controle (DCS).

O tecido adiposo retroperitoneal do grupo DLO apresentou a maior peso após o tratamento dietético em relação aos outros grupos experimentais.

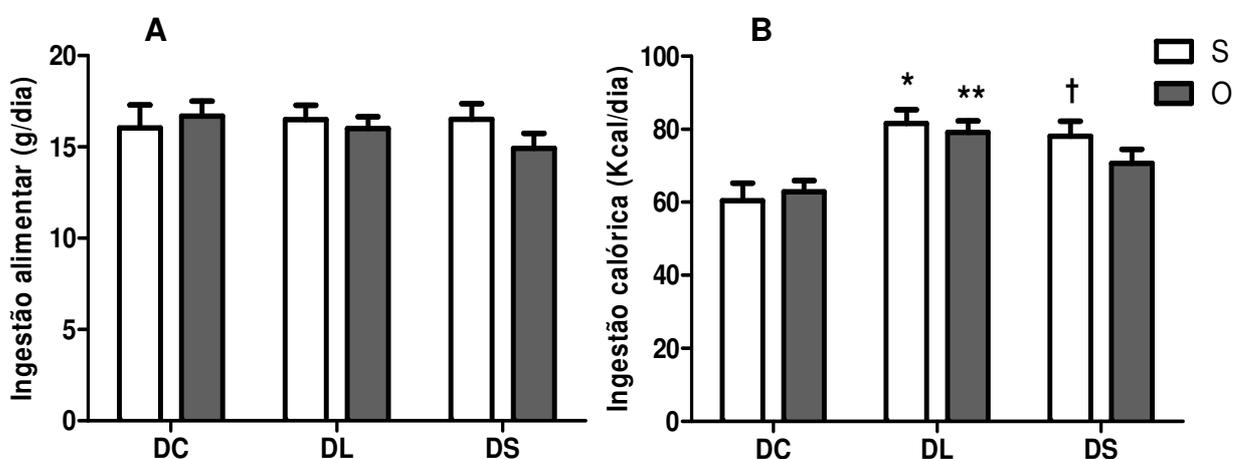
**Tabela 5:** Peso corrigido dos depósitos de tecido adiposo(g)/100g de peso corporal dos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético

Tecido adiposo	DCS	DCO	DLS	DLO	DSS	DSO
Mesentérico	0,82±0,13	0,91±0,14	1,28±0,22*	1,39±0,1**	0,87±0,11	0,90±0,06
Parametrial	1,29±0,33	2,36±0,21	2,61±0,25*	3,17±0,35	2,81±0,25 <sup>†</sup>	2,39±0,13
Retroperitoneal	1,61±0,31	1,14±0,20	2,18±0,27	3,25±0,35 <sup>‡</sup> *	1,52±0,20	1,90±0,23

\*DLS vs DCS ( $p < 0,05$ ); \*\*DLO vs DCO e DSO ( $p < 0,05$ ), <sup>†</sup>DSS vs DCS ( $p < 0,01$ ); <sup>‡</sup>DLO vs DLS ( $p < 0,05$ ). O número de animais por grupo variou entre 5 a 9.

## 5.2 INGESTÃO ALIMENTAR:

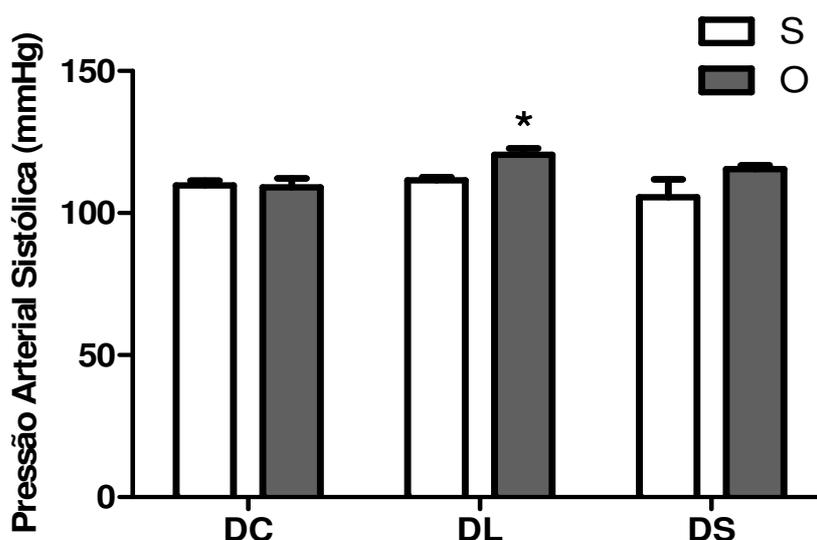
Após 26 semanas de tratamento dietético, a ingestão calórica diária diferiu entre os grupos experimentais apesar de não terem sido observadas diferenças com relação a ingestão alimentar diária em gramas (Figura 5A), devido às diferenças de densidade energética das dietas experimentais. Os grupos DLS, DLO e DSS apresentaram maior ingestão calórica diária, quando comparadas aos grupos DCO e DCS, como demonstrado na figura 5B.



**Figura 5:** Ingestão alimentar (g) diário (A) e ingestão calórica (Kcal) diária (B) baseado no consumo alimentar (g) nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 11 a 27. \*DLS vs DCS; \*\*DLO vs DCO e †DSS vs DCS, teste de Bonferroni ( $p < 0,01$ ). A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 1,69% e 1,33%, respectivamente, do total da variância.

## 5.3 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Após 26 semanas de tratamento dietético não foi observada hipertensão arterial sistólica em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, foi possível observar uma elevação da pressão sistólica no grupo DLO, em relação ao grupo DCO, conforme mostrado na figura 6. A associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia foi determinante no aumento da pressão, visto que não foram observados efeitos isolados da ovariectomia e das dietas hipercalóricas hiperlipídicas e hipersacarídicas.



**Figura 6:** Pressão Arterial Sistólica nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 5 a 9. \*DLO vs DCO ( $p < 0,01$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 8,20% do total da variância.

#### 5.4 PERFIL BIOQUÍMICO PLASMÁTICO

O perfil bioquímico plasmático dos grupos experimentais está descrito na tabela 6. As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicérides não apresentaram valores acima dos valores de referência.

**Tabela 6:** Perfil bioquímico plasmático dos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético

Parâmetro Bioquímico (mg/dL)	DCS	DCO	DLS	DLO	DSS	DSO
Glicose	89,8±4,6*	77±0,0	99±1,9**	86,4±1,9	92,2±2,4 <sup>†</sup>	78,4±1,0
Colesterol	72,2±11,5	196,7±19,9 <sup>‡</sup>	176,2±58,9	161,0±36,9	61,2±2,7	65,3±3,0
Triglicérides	91,6±11,9	148,9±22,2	135,4±8,0	139,3±6,1	137,5±0,9	115,8±30,2

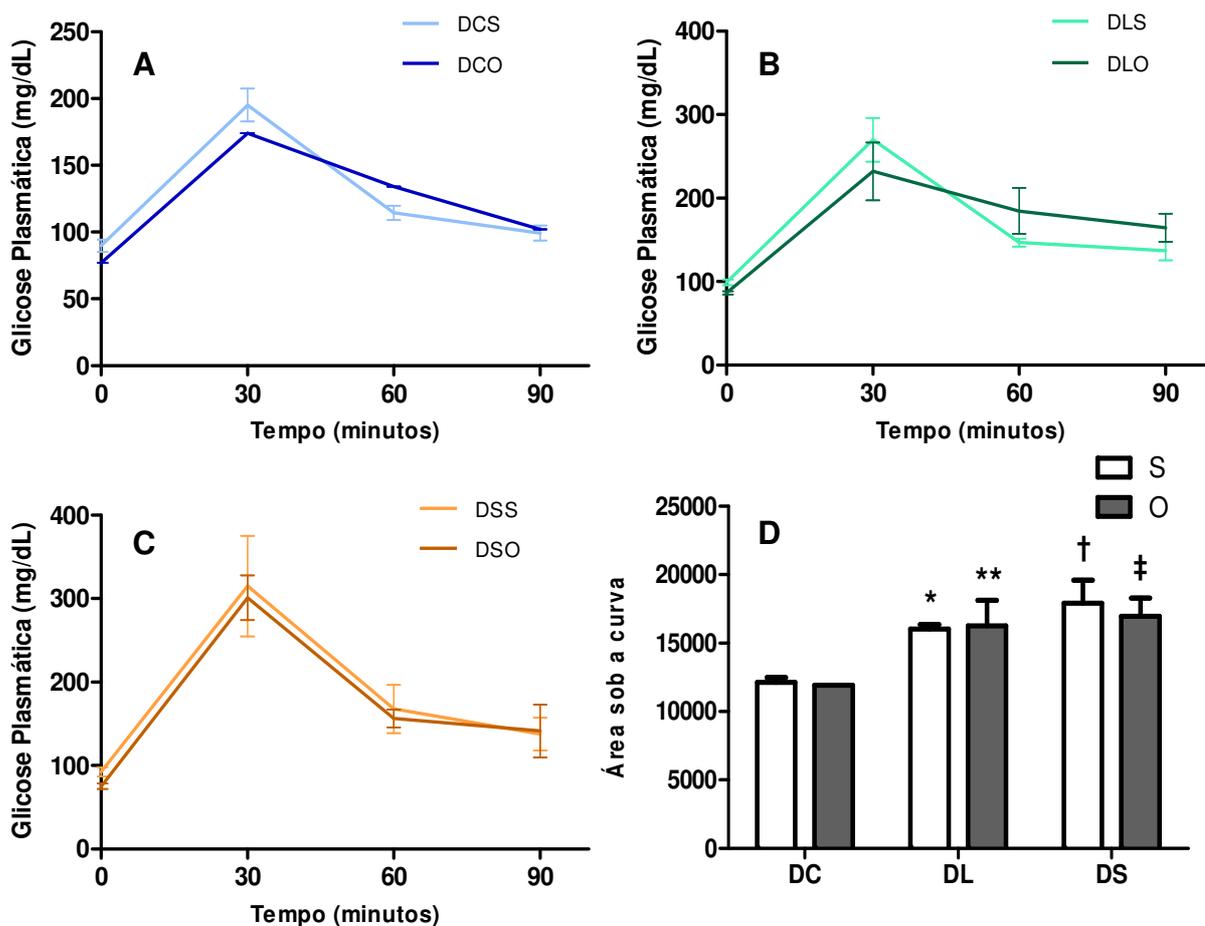
\*DCS vs DCO ( $p < 0,01$ ); \*\*DLS vs DCS e DLO ( $p < 0,05$ ); <sup>†</sup>DSS vs DSO ( $p < 0,01$ ); <sup>‡</sup>DCO vs DSO ( $p < 0,05$ ). O número de animais por grupo variou entre 3 a 9.

## 5.5 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE

A curva dos valores glicêmicos obtidos durante o teste de tolerância a glicose, assim como os valores calculados das áreas sob as curvas dos grupos experimentais encontram-se representados na figura 7. A glicemia basal de jejum apresentou-se dentro dos valores de referência em todos os grupos experimentais. Não foram observadas diferenças entre os valores glicêmicos médios dos grupos, nos tempos 30' 60' e 90' após a sobrecarga de glicose (Figuras 7A, 7B e 7C). Na análise das áreas sob as curvas de tolerância a glicose observou-se que a área sob a curva dos grupos DLO e DSO foram maiores que a do grupo DCO e a dos grupos DLS e DSS maiores que DCS (Figura 7D).

Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os grupos experimentais nas curvas glicêmicas do teste de tolerância à glicose pode-se constatar que os animais submetidos às dietas hipercalóricas hiperlipídica e hipersacarídica apresentaram um aumento acentuado nos níveis glicêmicos após a injeção intraperitoneal (tempo 30') da solução de glicose e uma tendência de persistência dos níveis glicêmicos aumentados nos tempos de 60' e 90'.

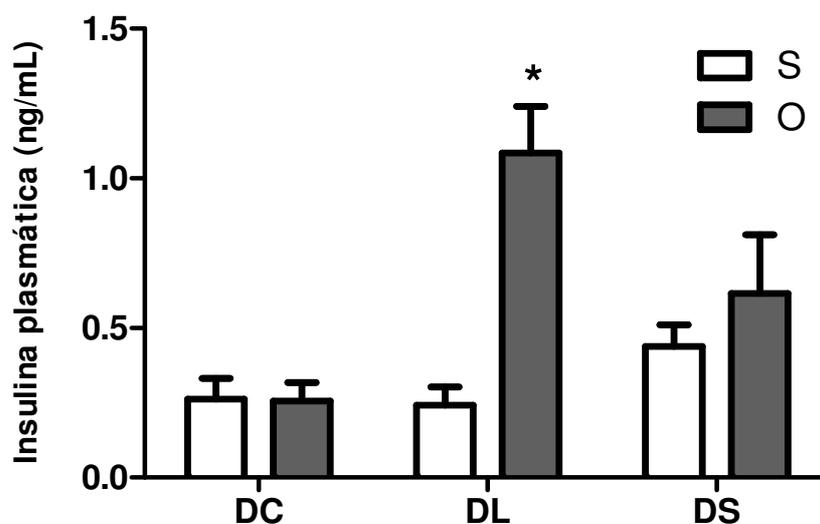
A dieta hipersacarídica isoladamente ou associada à ovariectomia determinou alterações significativas de tolerância a glicose apesar de não ter promovido aumento do peso corporal (Figura 2) e do peso dos depósitos de tecido adiposo visceral (Figura 4).



**Figura 7:** Gráficos representando as curvas do teste de tolerância a glicose nos tempos de 0', 30', 60', 90' após a injeção intraperitoneal de glicose nos grupos DCS e DCO (A), DLS e DLO (B) e DSS e DSO (C) e as áreas sob as curvas (D) nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético O número de animais por grupo variou entre 3 a 6. \*DLS vs DCS ( $p < 0,05$ ); \*\*DLO vs DCO ( $p < 0,05$ ); †DSS vs DCS ( $p < 0,01$ ); ‡DSO vs DCO ( $p < 0,01$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 0,56% do total da variância.

## 5.6 INSULINA PLASMÁTICA / HOMA-IR

A dosagem plasmática dos níveis de insulina após as 26 semanas de tratamento dietético mostrou um aumento deste hormônio no grupo DLO em relação aos grupos DCO, DLS e DSO, como demonstrado na figura 8.



**Figura 8:** Insulina plasmática nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 4 a 5. \*DLO vs DCO, DLS ( $p < 0,001$ ) e DSO ( $p < 0,05$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 22,37% do total da variância.

Considerando-se o valor de “cut-off” de 2,7, proposto por Geloneze et al (2009), para avaliação da resistência a insulina a partir do cálculo do HOMA-IR, os grupos DLO, DSS e DSO apresentaram valores de HOMA-IR compatíveis com resistência a insulina. O valor médio de HOMA-IR dos grupos experimentais são descritos na tabela 7.

**Tabela 7:** Valores médios do índice de resistência a insulina (HOMA-IR) dos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético

	DCS	DCO	DLS	DLO	DSS	DSO
HOMA-IR	2,19±0,74	2,03±0,17	2,23±0,37	6,78±1,8	4,36±0,14	5,12±1,86

O número de animais por grupo variou entre 4 a 5. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 11,31% do total da variância.

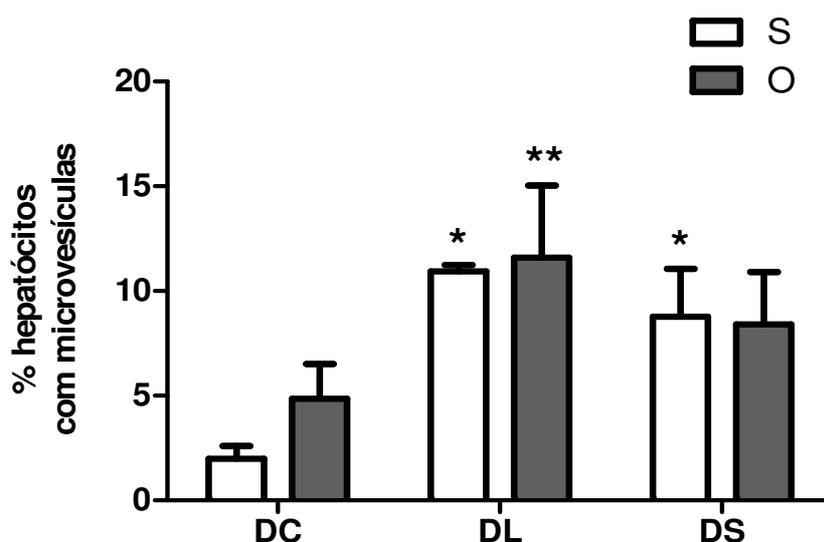
## 5.7 NÍVEIS DE TNF- $\alpha$ PLASMÁTICO

Os níveis de TNF- $\alpha$  plasmático foram praticamente indetectáveis pela metodologia ELISA e não apresentaram diferenças significativas entre os grupos

analisados, portanto, considerando este marcador inflamatório, não foi constatada uma alteração do perfil inflamatório sistêmico influenciado pelas dietas hipercalóricas e/ou pela ovariectomia.

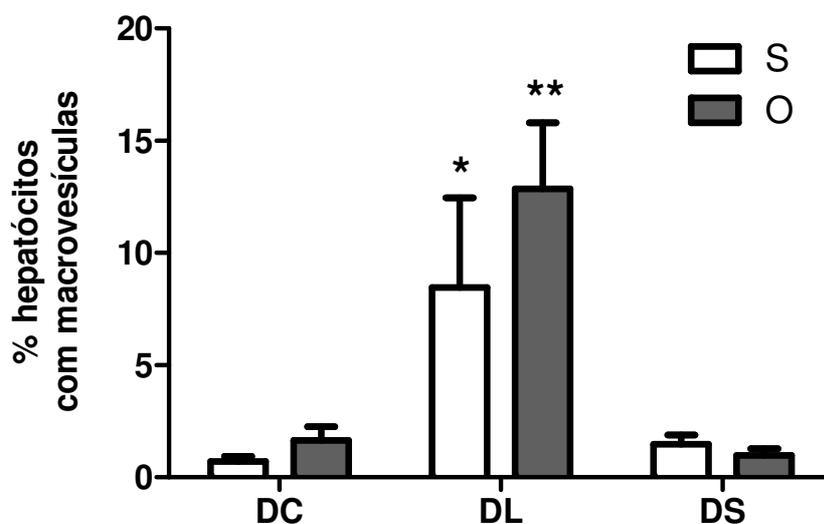
## 5.8 ESTEATOSE HEPÁTICA

A porcentagem de hepatócitos que apresentaram a infiltração gordurosa com padrão microvesicular foi maior no grupo DLS quando comparado com o controle DCS e nos grupos DLO e DSO quando comparados com o grupo DCO (Figura 9).



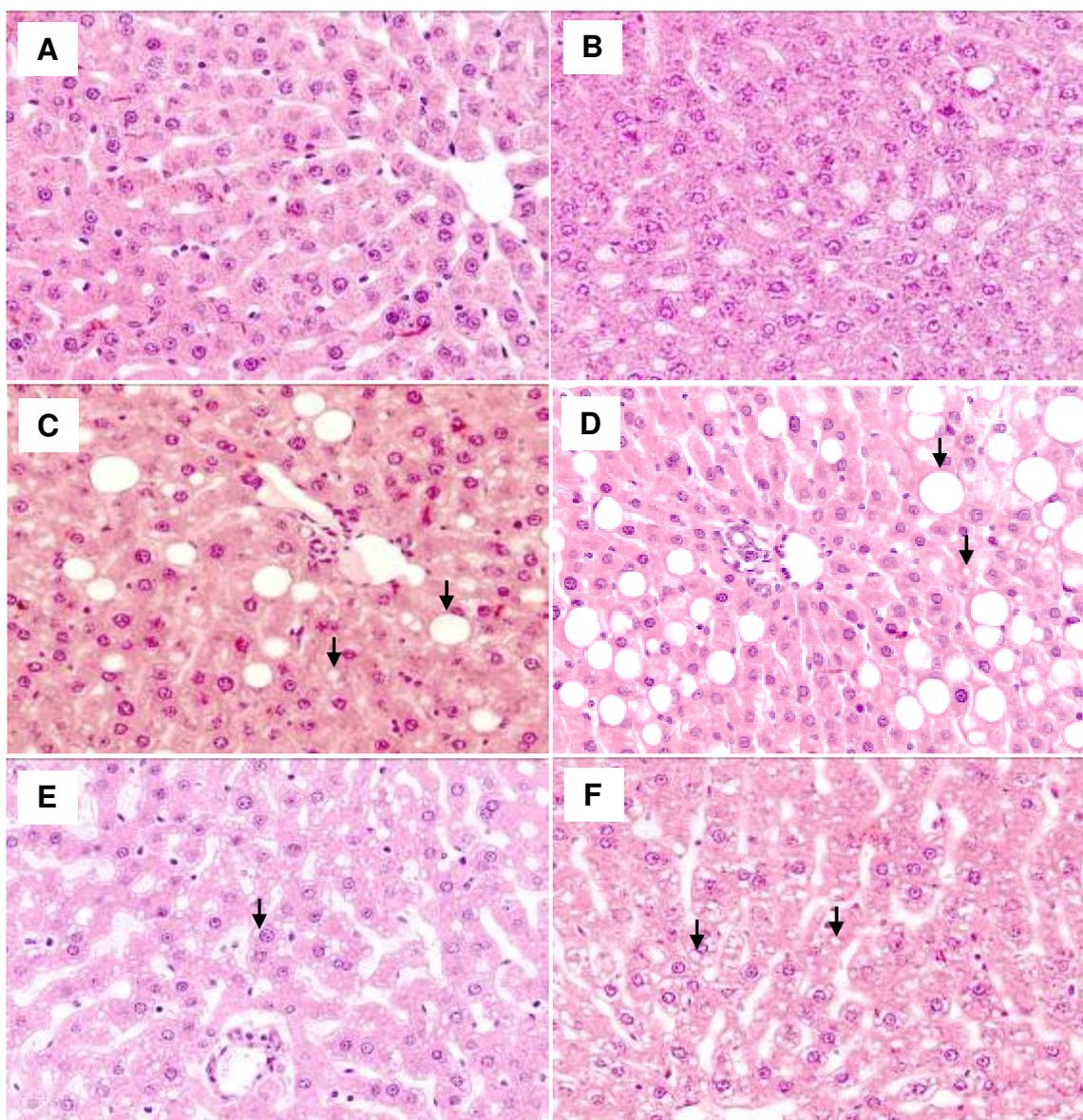
**Figura 9:** Porcentagem de hepatócitos com presença de microvesículas nos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 5 a 6. \*DLS e DSS vs DCS ( $p < 0,05$ ); \*\*DLO e DSO vs DCO ( $p < 0,05$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 1,56% do total da variância.

Considerando-se a infiltração gordurosa com padrão macrovesicular, observou-se que a porcentagem de hepatócitos afetados foi maior no grupo DLO em relação aos grupos controle e sham das dietas controle e hipersacarídica (Figura 10).



**Figura 10:** Porcentagem de hepatócitos com presença de macrovesículas nos grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 5 a 6. \*DLS vs DCS e DSS ( $p < 0,05$ ) e \*\*DLO vs DCO e DSO ( $p < 0,001$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 2,79% do total da variância.

Para a determinação do grau de esteatose hepática, de acordo com os escores de Brunt, é preciso utilizar a presença de macrovesículas nos hepatócitos. Por ele, portanto, os animais DCS, DCO, DSS e DSO apresentam grau 0 (zero) de esteatose, enquanto os grupos DLS, DLO apresentam esteatose de grau 1, representados pela figura 11.

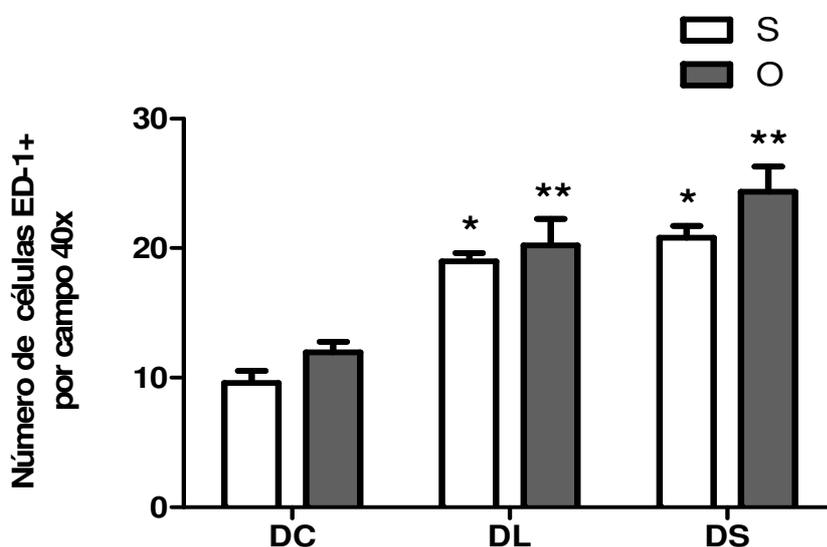


**Figura 11:** Perfil histológico do parênquima hepático em cortes corados com HE, campos de 20x. Hepatócitos normais dos grupos DCS (A) e DCO (B), sem infiltração de gordura; esteatose hepática grau 1 dos grupos DLS (C) e DLO (D) com presença de micro e macrovesículas; hepatócitos com presença de microvesículas dos grupos DSS (E) e DSO (F). Exemplos de micro e macrovesículas são indicadas com as setas.

A ovariectomia isoladamente não demonstrou impacto sobre o a infiltração de gordura hepática, de acordo com os dados do grupo DCO. Mas as dietas hipercalóricas foram determinantes para esta infiltração, sendo que os efeitos apareceram de forma isolada ou associada a falta de estrógeno.

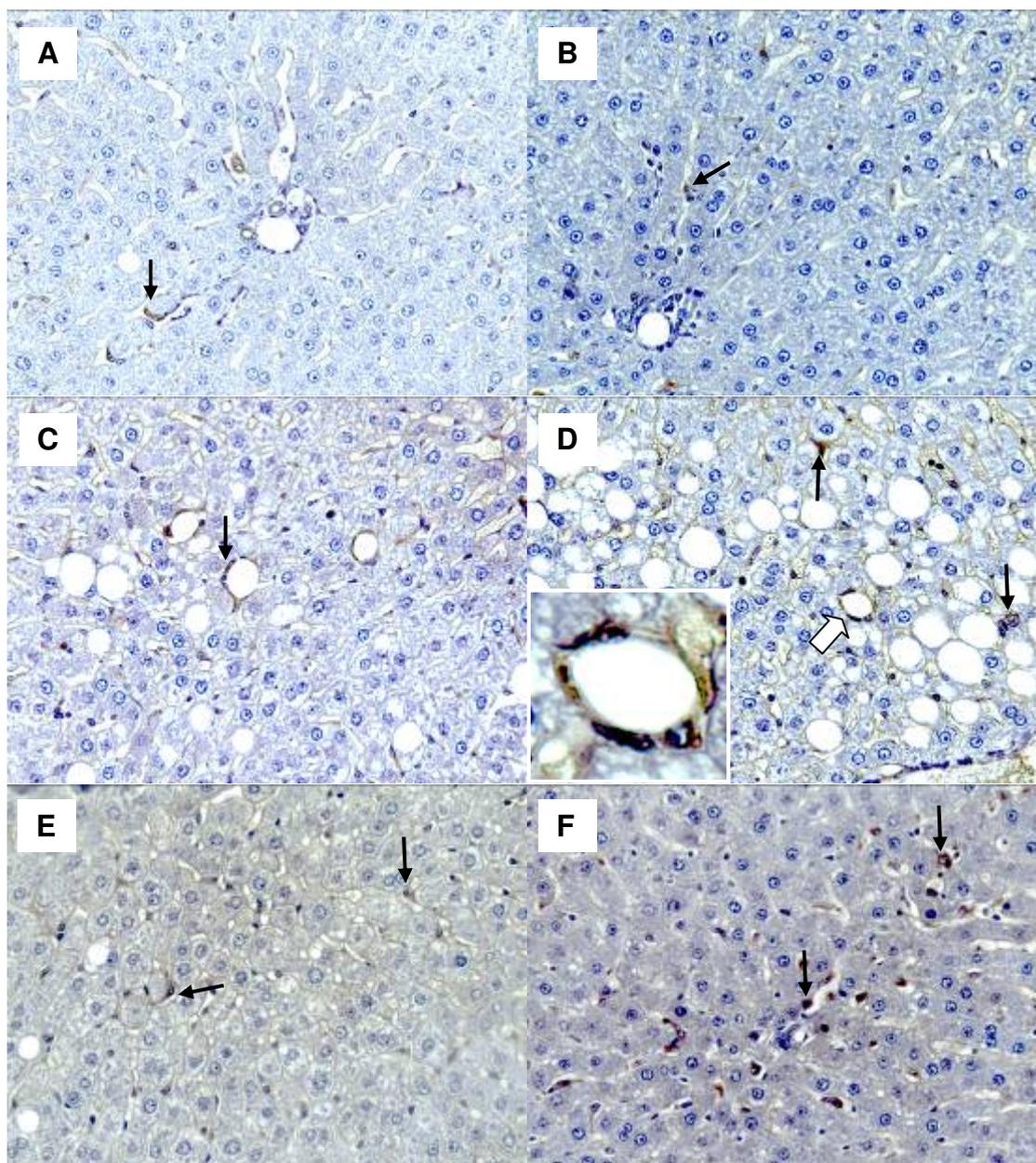
## 5.9 INFLAMAÇÃO HEPÁTICA

A análise do número de macrófagos/monócitos (células ED-1+) no tecido hepático demonstrou uma maior infiltração destas células inflamatórias nos grupos submetidos às dietas hipercalóricas do que nos grupos submetidos à dieta controle (Figura 12). As dietas hipercalóricas foram determinantes para a infiltração de células inflamatórias no parênquima hepático, pois esta infiltração ocorreu tanto sob influência isolada destas quanto em associação com a ovariectomia (DLS, DLO, DSS e DSO).

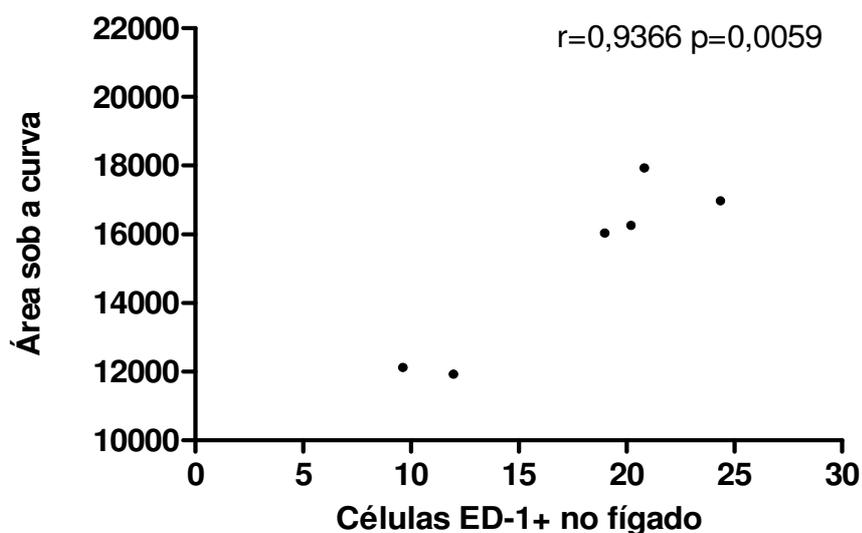


**Figura 12:** Número de células ED-1 positivas por campo microscópico (40x) no tecido hepático após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 5 a 8. \*DLS e DSS vs DCS ( $p < 0,001$ ); \*\*DLO e DSO vs DCO ( $p < 0,001$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 0,62% do total da variância.

Na figura 13 encontram-se representadas imagens da imuno-histoquímica para ED-1 no fígado nos diferentes grupos experimentais. É possível observar uma maior infiltração de macrófagos/monócitos no parênquima hepático dos grupos DLS, DLO, DSS e DSO, com a presença de mais de uma célula ED-1+ em torno de um hepatócito com macrovesícula nos grupos DLS e DLO.

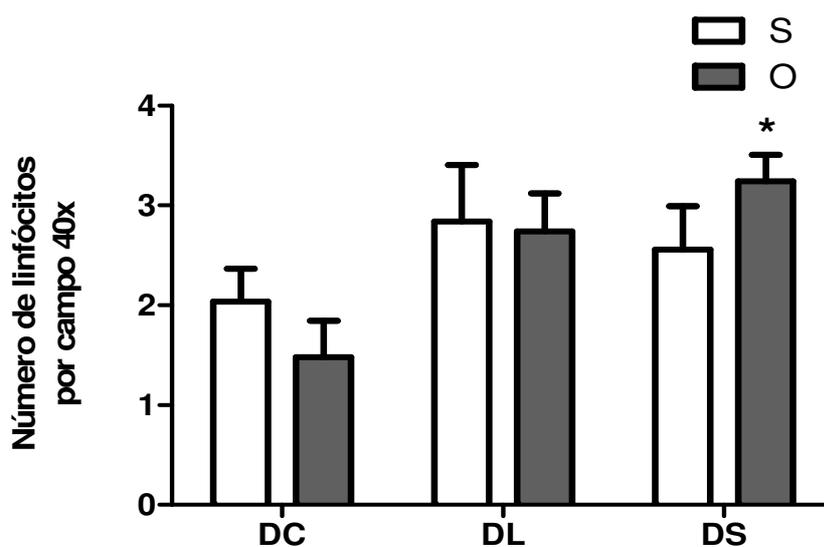


**Figura 13:** Infiltração de macrófagos/monócitos no parênquima hepático a partir da imuno-histoquímica para ED-1 nos grupos DCS (A), DCO (B), DLS (C), DLO (D), DSS (E) e DSO (F), campos de 20x. Exemplo da marcação de células ED-1 + indicadas com seta preenchida com preto e estrutura semelhante à “crown-like” indicada por seta preenchida de branco e em destaque no aumento de 40x em D.



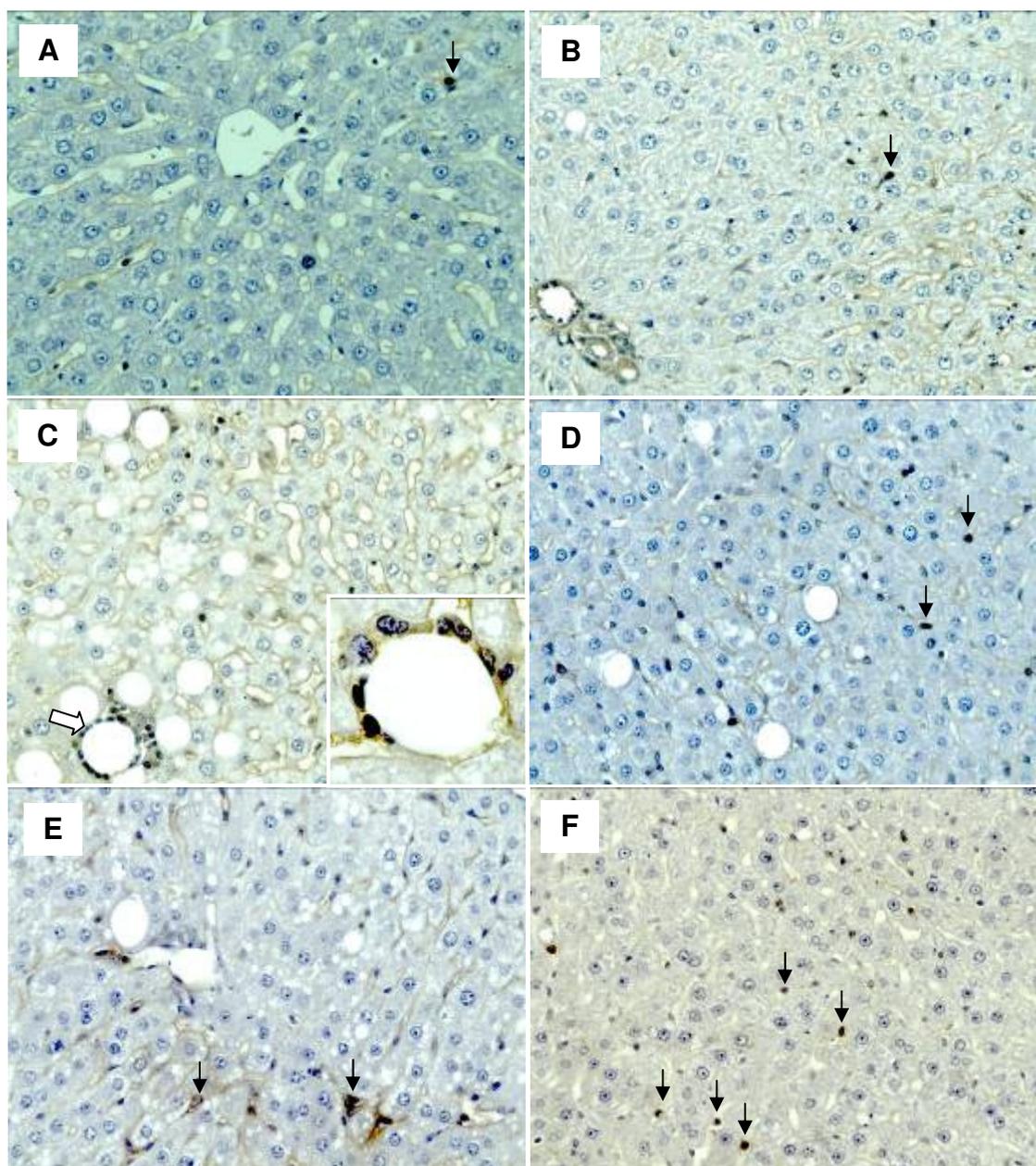
**Figura 14:** Correlação de Pearson calculada entre número de células ED-1+ (macrófagos/monócitos) no parênquima hepático e área sob a curva do teste de tolerância a glicose.  $r=0,9366$  e  $p=0,0059$ .

O resultado obtido na análise da presença de linfócitos infiltrados no parênquima hepático apontou um número maior desta célula no grupo DSO quando comparado ao grupo DCO. Os demais grupos não apresentaram significância estatística, provavelmente devido ao maior erro padrão apresentado, mas é possível observar uma tendência de um maior número de linfócitos infiltrados nos grupos tratados com dietas hipercalóricas (Figura 15).



**Figura 15:** Número de linfócitos (células CD4+) por campo microscópico (40x) no tecido hepático após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo foi 5. \*DSO vs DCO ( $p < 0,01$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 6,75% do total da variância.

Na figura 16 encontram-se dispostas imagens da imuno-histoquímica para linfócito (CD4) no parênquima hepático dos diferentes grupos experimentais.



**Figura 16:** Infiltração de linfócitos no parênquima hepático a partir da imuno-histoquímica para CD4 nos grupos DCS (A), DCO (B), DLS (C), DLO (D), DSS (E) e DSO (F), com contracoloração com HE campos de 20x. Exemplos de células CD-4 + indicadas por setas preenchidas de preto e estrutura semelhante à “crown-like” indicada por seta preenchida de branco e em destaque no aumento de 100x em C.

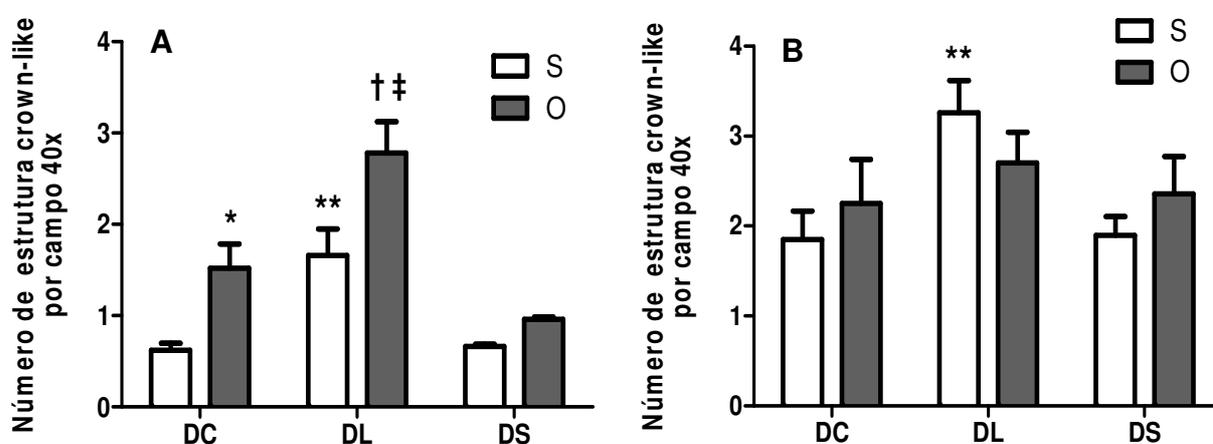
## 5.10 INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO

A partir da análise da figura 17A podem-se observar um aumento das estruturas tipo “crown-like” no tecido adiposo parametrial no grupo DLO em relação

aos grupos experimentais DLS, DCO e DSO e no grupo DCO em relação ao grupo DCS; e DLS em relação aos grupos DCS e DSS.

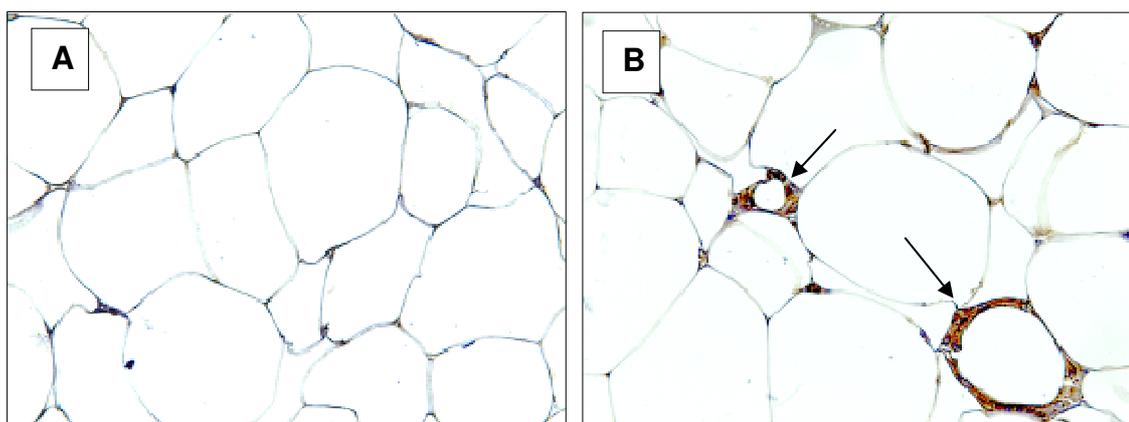
Já no tecido adiposo mesentérico, o grupo DLS apresentou um número de estruturas “crown-like” superior ao grupo DCS e DSS, como demonstrado na figura 17B.

A dieta hiperlipídica de forma isolada ou em associada à ovariectomia, bem como a ovariectomia isoladamente, foram mais determinantes para o aumento de estruturas do tipo “crown-like” nos depósitos de tecido adiposo analisados.



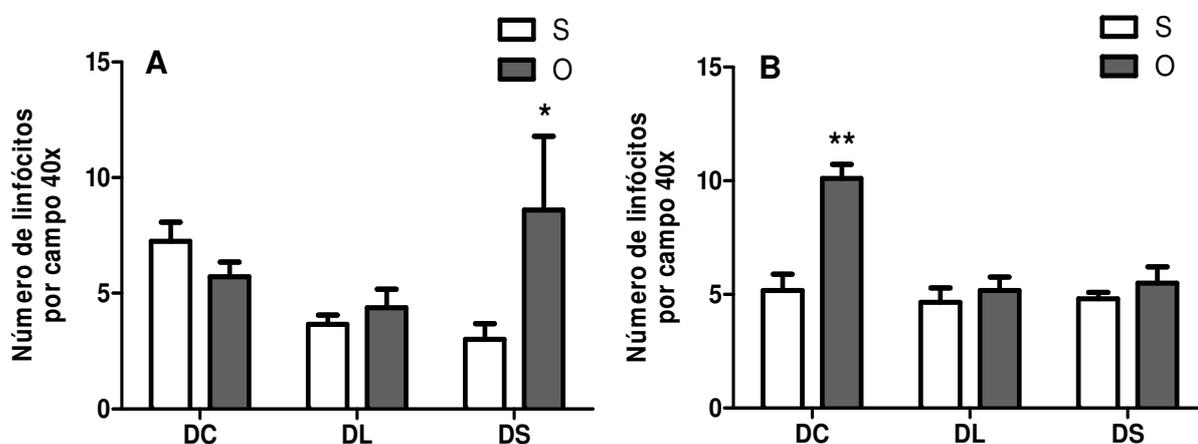
**Figura 17:** Número de estruturas “crown-like” no tecido adiposo parametrial (A) e no tecido adiposo mesentérico (B) por campo (40x) nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo variou entre 4 a 6. \*DCO vs DCS ( $p < 0,05$ ); \*\*DLS vs DCS e DSS ( $p < 0,05$ ); †DLO vs DCO e DSO ( $p < 0,001$ ); ‡DLO vs DLS ( $p < 0,01$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 3,92% e 7,64%, respectivamente, do total da variância.

Na figura 18 encontram-se representadas imagens da imuno-histoquímica para ED-1 no tecido adiposo parametrial, sendo possível observar as estruturas de “crown-like” presentes especialmente no grupo DLO.



**Figura 18:** Infiltração de macrófagos/monócitos no tecido adiposo parametrial com formação das estruturas “crown-like” (indicada pela seta) a partir da imuno-histoquímica para ED-1 nos grupos DCS (A) e DLO (B) aumento 20x.

A análise dos linfócitos marcados no depósito de tecido adiposo parametrial revelou um aumento dessas células no grupo DSO em relação ao grupo DSS (Figura 19A) e no grupo DCO em relação aos grupos DCS, DLO e DSO no tecido adiposo mesentérico (Figura 19B).



**Figura 19:** Número de linfócitos infiltrados no tecido adiposo parametrial (A) e no tecido adiposo mesentérico (B) por campo de 40x nos diferentes grupos experimentais após 26 semanas de tratamento dietético. O número de animais por grupo foi 5. \*DSO vs DSS ( $p < 0,05$ ); DCO vs DCS, DLO e DSO ( $p < 0,001$ ), teste de Bonferroni. A interação entre dietas e tratamento cirúrgico responde por aproximadamente 18,9% e 20,39%, respectivamente, do total da variância.

## 6 DISCUSSÃO

Os animais submetidos ao procedimento da ovariectomia e alimentados com a dieta hiperlipídica foram aqueles que apresentaram o maior ganho de peso e peso final dentre todos os grupos experimentais, demonstrando assim o efeito somado destas variáveis. A associação entre a falta do estrógeno e o aumento da adiposidade já é bem estabelecida. O estrógeno possui efeito central na ingestão alimentar e no gasto energético cujo balanço se reflete na deposição de gordura e conseqüente elevação do risco de doenças metabólicas (COOKE & NAZZ, 2004).

Apesar das dietas hiperlipídica e hipersacarídica serem ambas hipercalóricas, apenas a hiperlipídica determinou aumento do peso final e do ganho de peso nos animais, estando em acordo com os achados de Sweazea et al (2010).

O maior ganho de peso corporal apresentado pelos grupos DLS e DLO provavelmente deveu-se à maior ingestão energética destes grupos, já que o consumo alimentar em gramas não diferiu entre os grupos experimentais. Este resultado difere dos observados por Butera (2010) e West & York (1998) que associaram à hiperfagia os efeitos do estrógeno e de dietas hipercalóricas, respectivamente. Portanto, considerando-se que o balanço energético é a relação entre a quantidade de energia consumida e o gasto energético total (metabolismo basal, termogênese, atividade física), espera-se que na ausência de disfunções fisiológicas o maior ganho de peso nos grupos DLO e DLS seja o reflexo de um consumo de energia superior ao gasto energético (SPIEGELMAN & FLIER, 2001).

Apesar de o grupo DLO ter apresentado alteração significativa do peso corporal, também os grupos DLS e DSS demonstraram maiores consumos energéticos, porém com peso final inferior ao apresentado pelo grupo DLO. Isto provavelmente ocorreu devido a presença do estrógeno nestes grupos (DLS e DSS), pois ainda que a ingestão energética se apresentasse maior, a presença do estrógeno pode ter colaborado para manutenção do gasto energético nesses animais, resultando em peso final menor. Alterações no balanço energético associadas à ausência de estrógeno já foram relatadas em camundongos ovariectomizados e em mulheres na pós-menopausa (ROGERS et al., 2009).

A associação entre dieta hiperlipídica e ovariectomia também determinou aumento na deposição de gordura visceral no grupo DLO. Apesar da alta incidência de gordura abdominal ser comumente associada à síndrome metabólica, os mecanismos causais que determinam esta correlação não estão totalmente elucidados. Os mecanismos propostos para esta relação foram revisados por Després et al (2008) e envolvem a intensa atividade lipolítica observada na gordura visceral, que contribui para a resistência a insulina e para a deposição ectópica de gordura no parênquima hepático, devido ao maior fluxo de ácidos graxos pela circulação portal.

O aumento da pressão arterial sistólica observado nos animais do grupo DLO, ao final do experimento, pode estar associado aos efeitos da falta do estrógeno neste grupo experimental, pois este atua sobre células do tecido vascular promovendo a vasodilatação mediada por sua ação nos canais iônicos e sobre a síntese do NO (SUDHIR et al., 1996; HUANG et al., 1997). Sabe-se que os estrógenos também possuem efeito negativo sobre a densidade de receptores AT1 (Receptores tipo 1 da angiotensina) nas células de alguns tecidos (LABORDE et al., 2004), e que a ativação deste tipo de receptor exerce um papel chave na regulação da pressão arterial e da homeostase vascular (NICKENIG et al., 1998).

A elevação nos níveis pressóricos observado no grupo DLO, também pode estar associada aos efeitos da obesidade (DOBRIAN et al., 2001) e da falta do estrógeno sobre a vasodilatação mediada pelo NO, visto que, estas condições, podem determinar aumento na geração de ROS e consequente redução na biodisponibilidade deste vasodilatador. Strehlow et al (2003) relacionaram os efeitos vasoprotetores do estrógeno às suas propriedades antioxidantes.

A obesidade também pode contribuir para um estado pró-hipertensivo devido à capacidade de expressão pelos adipócitos do peptídeo vasoativo, angiotensina II, que contribui localmente para a regulação da diferenciação dos adipócitos, bem como do metabolismo lipídico (CAMPBELL, 1987; KARLSSON et al., 1998).

Ademais, estudos paralelos realizados com os mesmos animais experimentais revelaram alteração do sistema de peptídeos natriuréticos, com a redução dos níveis de ANP e o aumento da expressão de NPr-C no grupo DLO, sendo este fator importante para justificar a elevação pressórica observada neste

grupo. A dieta hiperlipídica e a ovariectomia podem promover mudanças cardiovasculares similares aquelas observadas em humanos e mostram um provável mecanismo que liga função cardíaca endócrina e obesidade, que podem contribuir para hipertensão. O estrógeno afeta o sistema de peptídeo natriurético por aumentar a expressão gênica e estimular a produção de ANP (ANDRADE et al., 2011).

Por outro lado, o aumento da expressão de NPr-C no tecido adiposo de ratas ovariectomizadas alimentadas com dietas hiperlipídicas também pode neutralizar os efeitos natriuréticos e vasodilatadores dos peptídeos natriuréticos e então promover o desenvolvimento da hipertensão (ANDRADE et al., 2011).

O monitoramento da homeostase da glicose foi realizado por meio da avaliação conjunta da glicemia de jejum, teste de tolerância a glicose, dosagens plasmáticas de insulina e cálculo do índice HOMA-IR.

Apesar de não terem sido observadas alterações na glicemia de jejum decorrentes do consumo de dietas hipercalóricas e da ovariectomia, a curva de tolerância a glicose, bem como a área sob a curva, indicaram um quadro de resistência a insulina nos grupos DLS, DLO, DSS e DSO. As maiores áreas sob a curva de tolerância a glicose nestes grupos, provavelmente decorreram dos elevados picos glicêmicos observados 30' após a sobrecarga de glicose e a incapacidade de retorno da glicemia aos valores basais após 90'.

De acordo com Schianca et al (2003), os valores de glicemia de jejum e de glicemia após sobrecarga de glicose (teste de tolerância a glicose) têm interpretações diferentes. É possível observar alterações na glicemia de jejum e na tolerância a glicose isoladas ou associadas. As elevações na glicemia de jejum dependem primariamente de um defeito na secreção de insulina, enquanto as alterações na glicemia após sobrecarga de glicose revelam um quadro de resistência à insulina. Exatamente porque esses valores mensuram diferentes alterações, eles devem ser avaliados em combinação.

A hiperinsulinemia observada no grupo DLO também pode indicar um estado de redução da sensibilidade a insulina nestes animais. Nesta situação, as células  $\beta$  pancreáticas aumentam a secreção deste hormônio, de forma compensatória, para superar a resistência e manter a euglicemia (OLEFSKY & GLASS, 2010). Apesar da elevação dos níveis plasmáticos de insulina, observou-se no grupo DLO a

incapacidade retorno da glicemia aos valores basais 90' após a sobrecarga de glicose, reforçando a hipótese de diminuição da tolerância a glicose devido a resistência aos efeitos da insulina.

Não foram observadas alterações no perfil bioquímico plasmático (glicose, colesterol total e triglicerídeos) nos animais dos grupos DSS, DSO e DLO apesar dos indícios de resistência a insulina nestes grupos fornecidos pelos testes de tolerância a glicose ou pela hiperinsulinemia. Sabendo-se que a ação da insulina sobre os tecidos muscular esquelético, adiposo e hepático estabelece respostas determinantes para os níveis de glicose, lipídios e outros metabólitos na circulação, devido a regulação da oxidação e da estocagem dessas moléculas (TAUBES, 2009), acredita-se que a resistência a insulina observada nestes grupos encontrava-se em estágios iniciais ou ainda de baixa intensidade ou sob a ação de mecanismos compensatórios.

Ademais, além da ação no metabolismo intermediário, a insulina exerce efeitos sobre os sistemas nervoso, renal e cardiovascular. A hiperinsulinemia observada no grupo DLO também pode, em parte, explicar o aumento da pressão arterial deste grupo, devido a elevação da resistência vascular periférica, aumento da retenção de sódio e estímulo sobre o sistema nervoso simpático (COLUSSI et al., 2007).

A avaliação da homeostase da glicose pelo cálculo do índice HOMA-IR, considerando-se o valor de "cut-off" de 2,7 (GELONEZE et al.,2009), ratificou o quadro de resistência a insulina grupos DSS e DSO, inicialmente apontado pelo teste de tolerância a glicose, ainda que na ausência de um aumento significativo da insulina plasmática. Para o grupo DLO, o índice HOMA-IR, a hiperinsulinemia, a área sob a curva e a resposta glicêmica nos tempos 60' e 90' do teste de tolerância a glicose podem, em conjunto, indicar o desenvolvimento do quadro de resistência a insulina. Nesses animais, o aumento do peso e da adiposidade visceral (GRILL & QVIGSTAD, 2000; GABRIELY et al.,2002; MOOK et al., 2004;) bem como, a ausência do estrógeno (CARR, 2003; LOBO, 2008) podem ter resultado em um conseqüente prejuízo na resposta periférica a insulina.

Os efeitos isolados da dieta hiperlipídica sobre a resistência a insulina não foram observados a partir da análise do valor do HOMA-IR do grupo DLS, ao

contrário da dieta hipersacarídica que determinou aumento na resistência a insulina tanto nos animais sham (DSS), quanto nos ovariectomizados (DSO). No grupo DLS, a presença do estrógeno pode ter determinado melhora na sensibilidade a insulina.

A esteatose hepática de grau 1 foi observada apenas nos grupos DLS e DLO, demonstrando o impacto da dieta hiperlipídica, isolada ou associada a ovariectomia, sobre o tecido hepático. O desbalanço entre a recaptação, síntese, oxidação e secreção de lipídeos pelo fígado contribuem para o desenvolvimento da esteatose e anormalidades metabólicas como a resistência a insulina, conforme revisado por Almeda-Valdés et al (2009). No grupo DLO, os níveis aumentados de insulina também podem contribuir para a esteatose observada, pois a exposição do fígado a altos níveis deste hormônio é descrita por Gauthier et al (2006) como determinante para o rápido desenvolvimento da esteatose hepática.

A deposição ectópica de gordura verificada neste modelo de obesidade pode justificar a resistência a insulina desenvolvida pelos grupos DLS e DLO, conforme a teoria da lipotoxicidade, que indica a sobrecarga de lipídeos como evento precipitante para a resistência a insulina já que na obesidade, o tecido adiposo passa a apresentar limitações para sua contínua expansão e os lipídios são então acumulados em outros tecidos.

Ademais a deposição ectópica de gordura pode causar resistência à insulina, complicações cardiovasculares e outros efeitos lipotóxicos, como a apoptose (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2010), pois o aumento de ácidos graxos livres liberados do tecido adiposo leva ao acúmulo de gordura, principalmente no fígado e no músculo esquelético sob a forma de DAG. A molécula de DAG trabalha tanto como um intermediário de estoque de gordura como uma molécula sinalizadora, que inibe a sinalização da insulina por meio da ativação de algumas isoformas da PKC e serinas quinases (ERION & SHULMAN, 2010).

No grupo DCO, a ovariectomia isoladamente não determinou esteatose hepática, diferentemente do observado por Paquete et al (2009), quando a remoção do estrógeno diminuiu a taxa de oxidação de ácidos graxos em, cerca de, 34% no fígado de ratas ovariectomizadas, contribuindo para o aumento do conteúdo hepático de TAG e esteatose.

A infiltração gordurosa predominantemente microvesicular apresentada pelos grupos DSS e DSO diferiu do padrão macrovesicular predominante dos grupos

DLO e DLS. Apesar de o escore de Brunt para esteatose considerar apenas a contagem de macrovesículas, a presença aumentada de microvesículas nos animais recebendo dietas hipersacarídicas também pode indicar indiretamente, aumento da deposição lipídica no parênquima hepático (BHATHENA et al., 2003).

A presença da esteatose vista nos grupos DLS e DLO está em acordo com o estudo de Gauthier et al (2006) que demonstra que o desenvolvimento da esteatose hepática está mais associado a modelos de obesidade induzida por dietas do que com a idade, e que as dietas hiperlipídicas podem determinar esteatose hepática por um mecanismo diferente daqueles induzidos por dietas ricas em sacarose. Também é sugerido por esses mesmo autores que o conteúdo de gordura hepática está mais relacionado à quantidade de gordura na dieta e com os níveis de AGLs circulantes do que com o ganho de peso.

O número de macrófagos/monócitos infiltrados no parênquima hepático revelou um status inflamatório local nos grupos submetidos às dietas hipercalóricas. O maior número destas células inflamatórias no fígado apareceu exatamente naqueles grupos com as maiores infiltrações lipídicas, seja pelo padrão micro ou macrovesicular. A associação da inflamação local com a resistência a insulina, que aparece também nos grupos DSS, DSO, DLS e DLO, pode também ser justificada pela teoria da inflamação, onde as citocinas liberadas pelos macrófagos/monócitos (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) podem ativar enzimas quinases (JNK, IKK $\beta$ , serinas quinases) que ativam fatores de transcrição de genes pró-inflamatórios e podem atuar diretamente sobre a fosforilação dos IRS, interferindo com a ação normal da insulina, criando um estado de resistência celular (HOTAMISLIGIL et al, 1994; ZEYDA & STULNIG, 2007; GOLLISCH et al., 2009; OLEFSKY & GLASS, 2010).

Ademais, os grupos DLS e DLO parecem desenvolver um quadro de esteato-hepatite, em função da presença da esteatose concomitante a infiltração de macrófagos/monócitos no parênquima hepático, sendo esta a forma mais séria de dano hepático que pode levar progressivamente a fibrose até a cirrose (LIU et al., 2010). A concentração de microvesículas hepáticas apresentou correlação positiva e elevada com a infiltração de macrófagos/monócitos no parênquima hepático ( $r=0,81$ ,  $p=0,0507$ ). Apesar das microvesículas não serem consideradas pelo escore de Brunt para esteatose hepática, a correlação destas com a infiltração inflamatória observada sugere que este parâmetro seja um importante fator no desenvolvimento da esteato-hepatite.

A infiltração macrófagos/monócitos e linfócitos apresentada nos animais recebendo dieta hipersacarídica, mesmo na ausência da esteatose e de obesidade, pode ter contribuído para a resistência a insulina observada. A correlação de Pearson calculada entre infiltração de macrófagos e área sob a curva do teste de tolerância a glicose mostrou correlação positiva elevada (figura 14), confirmando esta hipótese ( $r=0,9366$ ,  $p=0,0059$ ).

O papel crítico das células inflamatórias infiltradas no parênquima hepático, células de Kupffer, na patogênese da esteatose e da resistência a insulina foi comprovado em modelos experimentais onde redução da atividade destas células, no parênquima hepático, melhora o perfil metabólico e a sensibilidade a insulina (HUANG et al., 2010).

Neste modelo de obesidade induzida por dieta em ratas ovariectomizadas ou não, os níveis de TNF- $\alpha$  determinados no soro de todos os animais foram quase indetectáveis e não significativos. Estes resultados são semelhante aos obtidos por Hotamisligil et al (1995) e de Gollisch et al (2009). Isto pode descrever um modelo cuja inflamação sistêmica não se desenvolveu, pelo menos no período analisado. O aumento dos níveis sanguíneos de TNF- $\alpha$  tem sido registrado na obesidade e em estados de resistência a insulina, aumentando a possibilidade desta citocina, alterar a sensibilidade à insulina em outros tecidos através de um efeito endócrino, por alterarem a sua sinalização e interferirem na recaptação da glicose (HOTAMISLIGIL et al., 1994; OLEFSKY & GLASS, 2010).

Embora alguns órgãos metabolicamente ativos, como o fígado e o músculo, exerçam papéis importantes, o tecido adiposo aparece como o central e primária fonte e sítio da inflamação (BOULOUMIÉ et al., 2008).

O padrão de infiltração de macrófagos/monócitos apresentado pelo tecido adiposo no grupo DLO foi caracterizado pela presença aumentada de estruturas do tipo “crown-like” ao redor dos adipócitos. Cinti et al (2005) demonstraram que cerca de 90% dos macrófagos infiltrados no tecido adiposo em humanos ou camundongos obesos encontravam-se organizados em estruturas do tipo “crown-like” ao redor de adipócitos mortos sendo considerado um marcador de inflamação crônica. A presença de estruturas “crown-like” tem sido observada principalmente nos depósitos de gordura visceral quando comparados com os depósitos subcutâneos (MURANO et al., 2008).

Também nos grupos DCO e DLS observou-se aumento no número destas estruturas quando comparados ao grupo controle (DCS), representando um efeito isolado da ovariectomia e da dieta hiperlipídica sobre a inflamação no tecido adiposo visceral. A dieta hiperlipídica demonstrou maior impacto sobre a inflamação do tecido adiposo que a dieta hipersacarídica, já que o grupo DLS apresentou maior formação de estruturas do tipo “crown-like” que o grupo DSS, tanto no tecido adiposo parametrial quanto no mesentérico.

O número de linfócitos que infiltram o tecido adiposo é menor que o de macrófagos/monócitos. Isso pode ser explicado pela duração do tratamento dietético. No estudo de Kintscher et al (2008), os animais eram analisados quanto a resistência a insulina com 5 semanas de tratamento dietético, e o tecido adiposo deste animais apresentava infiltração de linfócitos, mas não de monócitos. No presente estudo a análise foi feita após 26 semanas de tratamento dietético, e talvez por isso, a fase precoce da infiltração de células inflamatórias pode não ter sido avaliada, aparecendo somente os resultados da fase mais tardia, revelando que, neste período, os macrófagos/monócitos parecem ser as principais células inflamatórias responsáveis pela resistência a insulina.

Apenas o grupo DCO apresentou aumento na infiltração de linfócitos no tecido adiposo mesentérico em relação aos grupos DCS, DLO e DSO possivelmente indicando uma fase mais precoce da infiltração inflamatória. De acordo com o estudo de Kintscher et al (2008), os linfócitos são as primeiras células inflamatórias a infiltrarem o tecido adiposo visceral de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, antes mesmo do aparecimento dos macrófagos. Os linfócitos, uma vez atraídos para dentro do tecido adiposo, passam a sintetizar e liberar  $INF\gamma$  (Interferon gama) que pode estimular os pré-adipócitos a secretar MCP-1, facilitando a atração de monócitos que ocorre em estágios mais tardios da resistência à insulina induzida pela obesidade.

## 7 CONCLUSÃO

No modelo experimental estudado a associação da dieta hiperlipídica com a ovariectomia determinou aumentos significativos no peso corporal, no depósito de gordura visceral, pressão arterial sistólica, resistência à insulina, esteatose hepática e padrão inflamatório nos tecidos adiposo visceral e hepático, portanto reproduz as principais alterações metabólicas e inflamatórias associadas à obesidade e à redução dos níveis plasmáticos de estrógeno.

A dieta hipersacarídica determinou alteração na sensibilidade a insulina, na deposição ectópica de gordura no fígado e no padrão inflamatório hepático sem associação com aumento de peso corporal ou de gordura visceral, sendo um modelo útil para estudo destas alterações de forma independente da obesidade.

## REFERÊNCIAS

- AKAHOSHI, M.; SODA, M.; NAKASHIMA, E.; et al. Effects of menopause on trends of serum cholesterol, blood pressure, and body mass index. **Circulation**, v. 94, p. 61-66, 1996.
- ALBERTI, K.G.M.M.; ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. **Circulation**, v. 120, p. 1640-1645, 2009.
- ALMEDA-VALDÉS; P.; CUEVAS-RAMOS; D.; AGUILAR-SALINAS, C.A. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. **Annals of Hepatology**, v. 8, i. 1, p. S18-S24, 2009.
- ANDRADE, E.N.de; GONÇALVES, G.K.N.; OLIVEIRA, T.H.C. Natriuretic peptide system: a link between fat mass and cardiac hypertrophy and hypertension in fat-fed female rats. **Regulatory Peptides**, v. 167, p. 149-155, 2011.
- ANUBHUTI, ARORA S., Leptin and its metabolic interactions – an update. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, i. 11, p. 973-993, 2008.
- ARAYA, J.; RODRIGO, R.; VIDELA, L.A. et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid *n*-6/*n*-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Science**, v. 106, p. 635–643, 2004.
- BASTARD, J. P.; JARDEL, C.; BRUCKERT, E. et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 3338-3342, 2000.
- BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C. et al. Recent advances in relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine News**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.
- BELO, N. O.; SILVA-BARRA, J.; CARNIO, E.C. et al. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. **Regulatory Peptides**, v. 117, p. 53-60, 2004.
- BELO, N.O.; SAIRAM, M.R.; REIS, A.M. Impairment of the natriuretic peptide system in follitropin receptor knockout mice and reversal by estradiol: implications for obesity-associated hypertension in menopause. **Endocrinology**, v. 149, p. 1399–1406, 2008.
- BERAZA, N.; MALATO, Y.; BORGHT, S.V. et al. Pharmacological IKK2 inhibition blocks liver steatosis and initiation of non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**, v. 57, p. 655–663, 2008.

- BHATHENA, S.J.; ALI, A.A.; HAUDENSCHILD, C. et al. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 157–164, 2003.
- BITTNER, V. Perspectives on dyslipidemia and coronary heart disease in women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, n. 9, p. 1628–1635, 2005.
- BODEN, G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. **Current Diabetes Reports**, v. 6, n. 3, p. 177-81, 2006.
- BOULOUMIE´, A.; CASTEILLA, L.; LAFONTAN, M. Adipose tissue lymphocytes and macrophages in obesity and insulin resistance - makers or markers, and which comes first? **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.28, p. 1211-1213, 2008.
- BUTERA, P.C. Estradiol and the control of food intake. **Physiology & Behavior**, v.99, p. 175-180, 2010.
- CAMPBELL, D.J. Tissue rennin – angiotensin system: sites of angiotensin formation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 10, i. 7, p. S1-S8, 1987.
- CARR, M.C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n.6, p.2404–2411, 2003.
- CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, p. 419-425, 2002.
- CAVE, M.; DEACIUC, I.; MENDEZ, C. et. al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 184– 195, 2007.
- CHEN H.; MONTAGNANI M.; FUNAHASHI, T. et al. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 45021-45026, 2003.
- CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 2347–2355, 2005.
- COGGINS, C.H.; BREYER, L.J.; CAGGIULA, A.W.; et al. Differences between women and men with chronic renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p. 1430-1437, 1998.
- COLUSSI, G.; CATENA, C.; LAPENNA, R. et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are related to plasma aldosterone levels in hypertensive patients. **Diabetes Care**, v. 30, p. 2349–2354, 2007.

- COOKE, P. S.; NAAZ, A. Role of estrogens in adipocyte development and function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, p. 1127-1135, 2004.
- DANIELS, I.B.; MAISEL, A.S. Natriuretic peptides. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 25, p. 50:2357–2368, 2007.
- DAS, M.; GABRIELY, I.; BARZILAI, N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. **Obesity Reviews**, v. 5, p. 13-19, 2004.
- DESPRÉS, J.P.; LEMIEUX, I.; BERGERON, J. et al. Cardiometabolic risk abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28; p. 1039-1049, 2008.
- DIJKSTRA, C.D.; DOPP, E.A.; JOLING, P. et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. **Immunology**, v. 54, p. 589-599, 1985.
- DOBRIAN, A.D.; DAVIES, M.J.; SCHRIVER, S.D. et al. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. **Hypertension**, v. 37, p.554-560, 2001.
- DORFFEL, Y.; LATSCH, C.; STUHMULLER, B. et al. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. **Hypertension**, v. 34, p. 113-117, 1999.
- EL-HASCHIMI, K.; PIERROZ, D.D.; HILEMAN, S.M. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1827-1832, 2000.
- ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **The Lancet**, v. 365, p. 1415-1428, 2005.
- ERION, D.M.; SHULMAN, G.I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 16, n. 4, p. 400-403, 2010.
- FERNANDEZ-REAL, J.M.; VAYREDA, M.; RICHART, C. et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 86, p. 1154–1159, 2001.
- FULLER, F.; PORTER, J.G.; ARFSTEN, A.E. et al. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 19, p. 9395-9401, 1988.
- GABRIELY, I.; MA, X.H.; YANG, S.M. et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging an adipokine-mediated process? **Diabetes**, v. 51, p. 2951–2958, 2002.

- GARG, A.; MISRA, A. Hepatic Steatosis, Insulin resistance, and adipose tissue disorders. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 87, p. 3019-3022, 2002.
- GAUTHIER, M.S.; FAVIER, R.; LAVOIE, J.M. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 95, p. 273–281, 2006.
- GELONEZE, B.; VASQUES, A.C.J.; STABE, C.F.C. et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome – Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n.2. p. 281-287, 2009.
- GOLLISCH, K.S.C.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, p. E495–E504, 2009.
- GRILL, V.; QVIGSTAD, E. Fatty acids and insulin secretion. **British Journal of Nutrition**, v.83, i.1, p.79-84, 2000.
- GRUNDY, S.M. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. **The Journal of the American Medical Association**, v. 290, p. 3000–3002, 2003.
- HAVEL, P. J. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, 359–371, 2000.
- HIGASHI, Y., SANADA, M.; SASAKI, S. et al. Effect of estrogen replacement therapy of endothelial function in peripheral resistance arteries in normotensive and hypertensive postmenopausal women. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 651-657, 2001.
- HIJONA, E.; HIJONA, L.; ARENAS, J. I. et al. Inflammatory mediators of hepatic steatosis. **Mediators of Inflammation**, Article ID 837419, p. 1-7, 2010. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/837419.html>. Acesso em: 15 dez. 2010
- HOTAMISLIGIL, G.S.; MURRAY, D.L.; CHOY, L.N. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. **Biochemistry**, v. 91, p. 4854-4858, 1994.
- HOTAMISLIGIL, G.S.; ARNER, P.; CARO, J.F. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2409-2415, 1995.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 923-934, 2008.

- HUANG, A.; SUN, D.; KALEY, G. et al. Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, p. 1351-1356, 1997.
- HUANG, W.; METLAKUNTA, A.; DEDOUSIS, N. et al. Depletion of liver kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 347-357, 2010.
- JAMES, P.T.; LEACH, R.; KALAMARA, E. et al. The worldwide obesity epidemic. **Obesity research**, v. 9, i. 4, p. 228-233, 2001.
- JEANRENUAD, B. Insulin and obesity. **Diabetologia**, v.17, p. 133-138, 1979
- JENSEN, M.D. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, i. 11, p. 57-63, 2008.
- KADOWAKI T., YAMAUCHI T., KUBOTA N., HARA K., UEKI K., TOBE K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p.1784-1792, 2006.
- KARLSSON, D.; LINDELL, K.; OTTOSSON, M. et al Conversion to angiotensin ii human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 3925-3929, 1998.
- KERSHAW E.E., FLIER J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2555, 2004.
- KHALIL, R.A. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 249-254, 2005.
- KINTSCHER,U.; HARTGE, M.; HESS, K. et al.T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue - a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, p.1304-1310, 2008.
- KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; NATTA, M.V. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, p. 1313-1321, 2005.
- KOLAK, M.; WESTERBACKA, J.; VELAGAPUDI, V.R. et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. **Diabetes**, v. 56, p. 1960–1968, 2007.
- KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; HIROSHI, M. et al. PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Molecular Cell**, v. 4, p. 597-609, 1999.

- LABORDE, C.H.; CRAIG, T.; ZHENG, W.; JI, H. et al. Ovariectomy augments hypertension in aging female dahl salt-sensitive rats. **Hypertension**, v. 44, p. 405-409, 2004.
- LAUTERIO, T. J.; BOND, J. P.; ULMAN, E. A. Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations. **The Journal of Nutrition**, v. 124, p. 2172-2178, 1994.
- LI, Z.Z.; BERK, M.; MCINTYRE, T.M. et al. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease role of stearyl-coa desaturase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5637–5644, 2009.
- LIU, Q.; BENGMARK, S.; QU, S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Lipids in Health and Disease**, v. 9, i. 42, p. 1-9, 2010.
- LOBO, R.A. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. **Maturitas**, v. 60, p. 10–18, 2008.
- MAHER, J.J.; LEON, P.; RYAN, J.C. Beyond insulin resistance: innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 48, p. 670-678, 2008.
- MARIC, C.; XU, Q.; SANDBERG, K. et al. Age-related renal disease in female Dahl salt-sensitive rats is attenuated with 17 $\beta$ -estradiol supplementation by modulating nitric oxide synthase expression. **Gender medicine**, v. 5, i. 2, p. 147-159, 2008.
- MATSUZAWA Y.; FUNAHASHI T.; KIHARA S. et al. Adiponectin and metabolic syndrome. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 29-33, 2004.
- MEERSMAN, R.E.; ZION, A.S.; GIARDINA, E.G.V. et al. Estrogen replacement, vascular distensibility, and blood pressures in postmenopausal women. **American Journal Physiology**, v. 274, n. 43, p. H1539-H1544, 1998.
- MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Mechanisms of disease: the protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801-1811, 1999.
- MIQUEL, J.; RAMÍREZ-BOSCA, A.; RAMÍREZ-BOSCA, J. V. et al. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 42, p. 289-306, 2006.
- MONTANI, J.P.; ANTIC, V.; YANG, Z. et al. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Internacional Journal of Obesity**, v. 26, i. 2, p. 28-38, 2002.
- MOOK, S.; HALKES, C.J.M.; BILECEN, S. et al. In vivo regulation of plasma free fatty acids in insulin resistance. **Metabolism**, v. 53, i. 9, p. 1197-1201, 2004.

- MORA, S.; PESSIN, J. E. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 18, p. 345–356, 2002.
- MURANO, I.; BARBATELLI, G.; PARISANI, V. et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p. 1562–1568, 2008.
- MURPHY, S. J.; MCCULLOUGH, L. D.; SMITH, J. M. Stroke in the female: role of biological sex and estrogen. **ILAR Journal**, v. 45, n. 2, p. 147-159, 2004.
- NICKENIG, G.; BA"UMER, A.T.; GROHE`, C. et al. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. **Circulation**, v. 97, p. 2197-2201, 1998.
- OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K. Macrophages, inflammation and insulin resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 219-246, 2010.
- PAQUETTE, A.; SHINODA, M.; LHORET, R.R. et al. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: Impact of a high-fat diet. **Maturitas**, v. 58, p. 182–190, 2007.
- PAUSOVA, Z.; DESLAURIERS, B.; GAUDET, D. et al.. Role of tumor necrosis factor-alpha gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. **Hypertension**, v. 36, p. 14–19, 2000.
- PAUSOVA, Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 15, n. 2, p. 173-178, 2006.
- PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K.; SHULMAN, G.I. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 6-11, 2003.
- POEHLMAN, E.T. Menopause, energy expenditure, and body composition. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 81, p. 603–611, 2002.
- POEHLMAN, E.T.; TOTH, M. J.; GARDNER, A. W. Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. **Annals of Internal Medicine**, v. 123, p. 673-675, 1995.
- POYNARD, T.; RATZIU, V.; NAVEAU, S. et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. **Comparative Hepatology**, v. 4, i. 10, p. 1-14, 2005.
- QATANI, M., LAZAR; M.A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes & Development**, v. 21, p. 1443-1455, 2007.
- RANDLE, P.J.; HALES, C.N.; GARLAND, P.B. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin resistance and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 13, p. 785-789, 1963.

- RASOULI N., KERN P.A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 11, p. 64-73, 2008.
- REAVEN, E.P.; GOLD, G.; REAVEN, G.M. Effect of age on glucose-stimulated insulin release by the  $\beta$ -cell of the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, p. 591-599, 1979.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratories rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- RISTOW, M.; MÜLLER-WIELAND, D., PFEIFFER, A. et al. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 953-959, 1998.
- ROEMMINCH, J. N.; CLARK, P. A.; STUART, S. et al. Gender differences in leptin levels during puberty are related to the subcutaneous fat depot and sex steroids. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 275, p. 543-551, 1998.
- ROGERS, N.H.; PERFIELD II, J.W.; STRISSEL, K.J. et al. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. **Endocrinology**, v. 150, l. 5, p. 2161-2168, 2009.
- ROSENSON, R. S.; KOENIG, W. Utility of inflammatory markers in the management of coronary artery disease. **American Journal of Cardiology**, v. 92, p. 10i-18i, 2003.
- RUIZ-LARREA, M. B.; MARTIN, C.; MARTINEZ, R. et al. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, p. 179-188, 2000.
- RYO M.; NAKAMURA T.; KIHARA S. et al. Adiponectin as a biomarker of the Metabolic Syndrome. **Japanese Circulation Society**, v. 68, p. 975-981, 2006.
- SAMUEL, V.T.; LIU, Z.X.; QU, X. et al. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32345-32353, 2004.
- SCHIANCA, G.P.C.; ROSSI, A.; SAINAGHI, P.P. et al. The significance of impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance - importance of insulin secretion and resistance. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1333-1337, 2003.

- SEPPÄLÄ-LINDROOS, A.; VEHKAVAARA, S.; HÄKKINEN, A. M. et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3023-3028, 2002.
- SHARMA, S.; SHARMA, N.; KHINCHI, M.P. et al.. Consequences of menopause—"the change of life": a survey in Hadoti Rajasthan. **International Journal Of Community Pharmacy**, v. 3, n. 2, 2010.
- SHI, H. CLEGG, D. J. Sex differences in the regulation of body weight. **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 199-204, 2009.
- SKURK T., ALBERTI-HUBER C., HERDER C. et al Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 1023-1033, 2007.
- SPIEGELMAN, B. M. PPAR $\gamma$ : ;Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, p. 507-514, 1998.
- SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, p. 531-543, 2001.
- STEARNS, A. J.; BYRNE D.B. Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 3, p. 129-142, 2001.
- STEPHAN, C. M.; LAZAR, M. A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.13, n.1, p. 18-23, 2002.
- STREHLOW, K.; ROTTER, S.; WASSMANN, S. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation Research**, v. 93, p. 170-177, 2003.
- SUDHIR, K.; JENNINGS, G.L.; FUNDER; J.W. et al. Estrogen enhances basal nitric oxide release in the forearm vasculature in perimenopausal women. **Hypertension**, v. 28, p. 330-334, 1996.
- TARANTINO, G.; SAVASTANO, S.; COLAO, A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, i. 38, p. 4773-4783, 2010.
- TAUBES, G. Prosperity's plague. (Editorial). **Science**, v. 325, p. 257-260, 2009.
- TOTH, M. J.; TCHERNOF, A.; SITES, C. K. et al. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. 226-231, 2000.
- TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive oxygen stress in vascular biology: implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, p. 339-352, 2004.

- TRAYHUN, P.; DUNCAN, J.S; HOGGARD, N. et al. Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 413-419, 1998.
- TRAYHURN, P.; BING, C. Appetite and energy balance signal from adipocytes. **Philosophical Transactions of Royal Society B**, v. 361, n. 1471, p. 1237-1249, 2006.
- VIRTURE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, p. 338–349, 2010.
- VAZIRI, N.D.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, p. 582-593, 2006.
- WADE, G. N.; GRAY, J. M.; BARTNESS, T. J. Gonadal influences on adiposity **International Journal of Obesity**, v. 9, suppl. 1, p. 83-92, 1985.
- WANG, T.J.; LARSON, M.G.; LEVY, D. et al. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. **Circulation**, v.109. p. 594-600, 2004.
- WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.
- WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 503S-512S, 1998.
- WIESENTHAL, S.R.; SANDHU, H.; MCCALL, R.H. et al. Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. **Diabetes**, v. 48, p. 766-774, 1999.
- WILKINS, M.R.; REDONDO, J.; BROWN, L.A. The natriuretic-peptide family. **The Lancet**, v.349, p. 1307-1310, 1997.
- WILLIAMS, L.; BRADLEY, L.; SMITH, A. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 567-576, 2004.
- WOODS, C. S.; SEELEY, R. J.; RUSHING, P. A. et al. Controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1081-1087, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. Global Infobase. NCD Indicators. BMI / overweight / obesity prevalence, Brazil. Disponível em: <https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx>. Acesso em 31 de janeiro de 2011.
- ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunology Letters**, v. 112, p. 61-67, 2007.