



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mariana Catta-Preta

**Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas,  
tecido adiposo e fígado em camundongos**

Rio de Janeiro

2011

Mariana Catta-Preta

**Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Mendes Ribeiro

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C368 Catta-Preta, Mariana

Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos / Mariana Catta-Preta. – 2011  
97f.

Orientadora : Márcia Barbosa Águila.  
Coorientador: Antonio Cláudio Mendes Ribeiro.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Lipídios - Metabolismo - Teses. 2. Gorduras na dieta – metabolismo. 3. Gorduras na dieta – Administração e dosagem. 4. Óleos vegetais 5. Fígado – Metabolismo - Teses I.Mandarim-de-Lacerda, Márcia Barbosa Águila. II. Ribeiro, Antonio Cláudio Mendes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 612.397

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Mariana Catta-Preta

**Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2011.

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Mendes Ribeiro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>.Dra. Lucia Marques Vianna  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>.Dra. Sílvia Maria Custódio das Dôres  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a minha mãe Margarida, ao meu pai Miracy, a minha “step mother” Carmen, aos meus avós Miracy, Wanda, Zeferino (*in memoriam*), Cléria, a minha tia Maria, a minha irmã Fernanda e aos meus sobrinhos e os grandes amores da minha vida: Davi, Daniel e Érica.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha mãe! A pessoa que mais me encoraja, me estimula, me ensina, me cobra, me ama e é o meu maior exemplo de que “apenas no dicionário o sucesso vem antes do trabalho” (Albert Einstein). Mãe muito obrigada é pouco para tudo o que você representa! Te amo!

Agradeço ao meu pai e a minha “step mother” por todo amor, carinho, apoio e compreensão nos momentos de ausência. Se cheguei até aqui, vocês tiveram muita responsabilidade sobre isso!

A minha orientadora e amiga Profa Dra Márcia Águila! Foram anos de orientação, aprendizagem e amizade. Ainda me lembro meu primeiro dia de laboratório, há 8 anos atrás. Muito obrigada por todos esses anos de orientação e conselhos. Termino o doutorado, mas a nossa amizade será para sempre!

Ao meu “orientador” Prof Dr Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda. Orientador de coração! Meu maior exemplo de dedicação, competência, inteligência, responsabilidade e seriedade. Agradeço por ter me acolhido como “orientada”, por toda ajuda e conhecimento nesses anos. Será sempre o meu professor Mandarin.

Ao meu coorientador Prof Dr Antonio Claudio Mendes-Ribeiro e a Profa Dra Tatiane Brunini por terem me acolhido e por todo ensinamento.

A minha irmã pelo amor incondicional, por toda ajuda e por ter me mostrado que existe um amor maior do que tudo – meus sobrinhos! Irmã muito obrigada por tudo! Te amo e tenho muito orgulho de ser sua irmã!

A minha tia Maria pelo amor e apoio incondicional e todos os meus familiares que entenderam minha ausência nesses anos todos e que sempre me incentivaram a continuar a minha caminhada.

A minha amiga e marida Carol! Você me mostrou que a distancia não afasta as pessoas, que a amizade quando é verdadeira é para sempre e nada consegue abalar. Muito obrigada por todos os conselhos e toda a ajuda “científica” durante esses anos. Sentirei muita saudade da convivência diária.

Ao meu amigo Leonaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaardo! Por me mostrar que existe amizade entre pessoas do sexo oposto e que existem amigos mais chegados do que irmãos. Foram anos de convivência e muito obrigada por toda ajuda “científica”, por

tantos sábados no laboratório fechando protocolo e por tantas eutanásias em carnaval.

Aos amigos que o laboratório me deu: Ana Maria Volpato (Volps ou gagota), Fernanda Amorim (Morim), Sandra Barbosa (Amante) e Rodrigo Neto (Magrelo). Vocês vieram como “brindes” durante o mestrado e doutorado e sem vocês a caminhada teria sido bem mais difícil. Sentirei saudades! Adoro vocês!

Aos amigos do laboratório Alini Schultz (Schultz), Isabele Bringhenti (Bele), Bianca Gregório (Bibs), Vanessa Mello (Vaness), Thiago Torres (Thi), Julio Fraulob (Cabeção) e Fernanda Ornellas (Fefe). Muito obrigada por todos os momentos científicos ou não. A trajetória foi mais leve com vocês por perto...

A doutoranda Marcela Anjos e graduanda Camila Rodrigues por toda ajuda durante o projeto, cuidado com os animais, elaboração de resumo e apresentação de trabalhos.

As técnicas Thatiany Marinho e Angélica Figueiredo pelo apoio técnico e a todos do LMMC que me ajudaram a crescer e caminhar...

Aos amigos de fora do laboratório: Gisele Souza, Patricia Aires, Marcelle Villar, Claudia Netto, Paula Netto, Aline Bighi, Camila Bighi, Roberta Motta, Antonio Kemper, Odlan Farias, Jeferson Souza, Fabricio Gordo e Carlos Henrique Kemper por todos os momentos de distração, divertimento e nada científicos. Vocês são indispensáveis.

Aos amigos e nutricionistas Giselle Oliveira, Fábio Maia, Fernando Lamarca, Natália Cantero, Adriana Leal e Maria Aparecida Magalhães. Muito obrigada por todos os momentos de diversão, tensão, risadas, estudos e tenho certeza que muitos ainda estão por vir. Tenho muito orgulho de conhecer e ser amiga dos MELHORES NUTRICIONISTAS DO RIO!

Aos meus “chefes” antigos e atuais do Centro Universitário Augusto Motta Adriana Bacelo, Luis Felipe Reis e Túlio Ventura. Muito obrigada por todo apoio e compreensão nas minhas ausências por causa do doutorado. E o melhor de tudo é ter a certeza que acima de qualquer hierarquia, vocês são meus amigos e sei que posso contar sempre.

Aos amigos e chefs Marco Aurelio Piccoli por tornar os meus dias mais doces e a querida Alejandra Faúndez pelo seu jeito único que tanto nos diverte.

Aos amigos Bernardo Pascarelli, por toda consultoria no protocolo de oil red e criostato, José Renato Crepaldi por todo companheirismo aos sábados de

coordenação de pós graduação, Antonio Palermo e Halyne Limeira pelo carinho diário e a todos os professores e amigos da Unisuam.

Ao magnífico Reitor do Centro Universitário Augusto Motta Prof Arapuan Motta e a Chanceler Profa Ana Cristina Motta pela oportunidade que me deram de transmitir meus conhecimentos aos meus alunos. Sou completamente apaixonada pela minha profissão.

Aos meus alunos por todos os anos de convívio e aprendizagem. Tenham certeza que aprendi e aprendo muito com vocês a cada dia.

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.



A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.

*Platão*

## RESUMO

CATTA-PRETA, Mariana. *Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos*. 2011. 97f. Tese. (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

As dietas ricas em lipídios saturados provocam efeitos deletérios no metabolismo de glicose, secreção de adipocinas e inflamação, entretanto, outros tipos de lipídios podem modular de forma diferenciada tais efeitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de diferentes dietas hiperlipídicas no metabolismo de carboidratos, lipídios, no tecido adiposo e no fígado. Camundongos machos C57BL/6 foram divididos em 5 grupos (n=10/grupo): animais que receberam dieta controle (standart chow, SC, 10% de lipídios, grupo controle) e animais que receberam diferentes dietas hiperlipídicas (High-fat, HF, 60% de lipídios): à base de banha de porco (lard, grupo HF-L), à base de óleo de oliva (olive oil, grupo HF-O), à base de óleo de girassol (sunflower oil, grupo HF-S) e à base de óleo de canola (canola oil, grupo HF-Ca). Os animais foram alimentados com as dietas experimentais por 10 semanas. Diariamente a ingestão alimentar era verificada e semanalmente a massa corporal foi aferida. A glicose de jejum e o teste intraperitoneal de tolerância a insulina (TITI) foram realizados uma semana antes da eutanásia. No dia da eutanásia o sangue foi coletado, o tecido adiposo e o fígado dissecados e pesados. A insulina, leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) foram dosadas por ELISA. Com os dados de insulina e glicose foi calculado o índice HOMA-IR. Os animais dos grupos HF-L e HF-O apresentaram os maiores valores de insulina, resistina, leptina e HOMA-IR em comparação aos outros grupos ( $P < 0,0001$ ). No grupo HF-L, os níveis de IL-6 foram maiores quando comparados com os demais grupos ( $P < 0,0005$ ), enquanto os valores de adiponectina foram os menores ( $P < 0,0001$ ). A quantidade de gordura subcutânea e visceral foi maior no grupo HF-L e este grupo apresentou também um aumento no diâmetro dos adipócitos. Entretanto a relação:visceral:subcutânea foi maior nos grupos HF-L e HF-O quando comparado com os demais grupos. Além disso, houve aumento de triglicérides hepáticos e de esteatose hepática nos animais dos grupos HF-L e HF-O. Nossos achados nos permitem concluir que animais que são alimentados com dietas hiperlipídicas, a distribuição do tecido adiposo, o metabolismo de carboidratos, acúmulo de triglicérides hepáticos e esteatose hepática são mais influenciados pelo tipo de lipídios do que pela quantidade.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Óleo de canola. Óleo de oliva. Óleo de girassol.  
Banha de porco.

## ABSTRACT

Diets rich in saturated fat have a deleterious effect on glucose metabolism, adipokine release and inflammation. However, other lipid sources may modulate these parameters differently. Thus, the aim of the present work was to investigate the effect of high-fat diets from different sources on carbohydrate and lipid metabolism, adipose tissue and liver. Male C57BL/6 mice were allocated into 5 groups (n=10/group): standard chow fed mice (SC, 10% lipid, control group), and mice fed with high-fat diets (HF, 60% lipids) as follow: lard (HF-L), olive oil (HF-O), sunflower oil (HF-S), and canola oil (HF-C). Diets were offered for 10 weeks. Food intake was recorded daily and body mass weekly. One week before euthanasia, fasting glucose and intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) were assessed. At euthanasia, blood was collected, and the liver and adipose tissue were weighed. Insulin, leptin, adiponectin, resistin, tumoral necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were measured by an Elisa assay. The HOMA-IR index was calculated based on fasting glucose and insulin. Insulin, resistin, leptin and HOMA-IR were higher in HF-L and HF-O groups compared with the remainder groups ( $P < 0.0001$ ). IL-6 was higher in the HF-L group compared with the other groups ( $P < 0.0005$ ), whereas adiponectin levels were the lowest ( $P < 0.0001$ ). The amount of both subcutaneous and visceral fat depots was the highest in the HF-L group, and they also had increased adipocyte diameter. However, visceral to subcutaneous fat ratio was higher in HF-L and HF-O groups compared with the remainder groups. Additionally, HF-L and HF-O groups showed increased hepatic triglyceride content and steatosis. Our data allow us to conclude that the type of lipid instead of its amount is important for determining adipose tissue distribution, carbohydrate metabolism, hepatic triglyceride accumulation and steatosis in mice fed a high-fat diet.

Keywords: High-fat diet. Canola oil. Olive oil. Sunflower oil. Lard.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Obesidade central e suas alterações metabólicas e inflamatórias..	23
Figura 2 -	Tecido adiposo, adipocinas e resistência a insulina .....	32
Figura 3 -	Possíveis causas e mecanismos de acúmulo de triglicerídeo no fígado .....	35
Figura 4 -	Evolução da massa corporal dos animais estudados .....	50
Figura 5 -	Efeito dos diferentes tipos de lipídios nos níveis séricos de resistina .....	52
Figura 6 -	Efeito dos diferentes tipos de lipídios nos níveis séricos de leptina.	53
Figura 7 -	Efeito dos diferentes tipos de lipídios nos níveis séricos de adiponectina .....	54
Figura 8 -	Diâmetro dos adipócitos epididimais .....	57
Figura 9 -	Percentual de esteatose hepática nos grupos estudados .....	59
Figura 10 -	Triglicérides hepáticos nos grupos estudados .....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos metabólicos descritos de diferentes formulações de dietas hiperlipídicas .....	40
Tabela 2 - Composição da dieta experimental .....	44
Tabela 3 - Parâmetros dietéticos dos grupos estudados .....	49
Tabela 4 - Metabolismo de carboidratos durante o experimento .....	51
Tabela 5 - Valores séricos das citocinas inflamatórias .....	55
Tabela 6 - Morfologia do tecido adiposo .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
ADSF	Adipocyte-specific secretory factor, Fator Secretor Específico do Adipócito
AGL	Ácidos Graxos Livres
AMPK	Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase, Proteína Quinase ativada por Adenosina Monofosfato
CC	Circunferência da Cintura
CEA	Comitê de Experimentação Animal
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
EA	Eficiência Alimentar
FIRI	Fasting Insulin Resistance Index, Índice de Resistência a Insulina em Jejum
FIZZ3	Found in Inflammatory Zone, Encontrado em zona inflamatória
GLUT	Glucose Transporter, Transportador de Glicose
HDL	High-Density Lipoprotein, Lipoproteína de Alta Densidade
HF	High Fat
HOMA	Homeostasis Model Assessment, Avaliação Modelo da Homeostase
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance, Avaliação Modelo da Homeostase – Resistência a Insulina
HOMA $\beta$	Homeostasis Model Assessment Beta, Avaliação Modelo da Homeostase Beta
IA	Índice de Adiposidade
IDF	International Diabetes Federation, Federação Internacional de Diabetes
IL-6	Interleucina-6, Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
IPITT	Intraperitoneal Insulin Tolerance Test, Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina
RI	Receptor de Insulina
m-RNA	Messenger Ribonucleic Acid, Ácido Ribonucléico Mensageiro
IRS-1	Insulin Receptor Substrate 1, Substratos do Receptor de Insulina 1

IRS-2	Insulin Receptor Substrate 2, Substratos do Receptor de Insulina 2
kJ	Kilojoule
LDL	Low-Density Lipoprotein, Lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1, Proteína Quimiotática de Monócitos – 1
RM	Ressonância Magnética
ob	Gene da Obesidade
OCT	Optimal Cutting Tissue
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1, Inibidor do Ativador de Plasminogenio-1
PCR	Proteína C Reativa
PI3q	Phosphatidylinositol 3'-kinase, Fosfatidilinositol 3-quinase
PKB	Protein Kinases B, Proteína Quinase B
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo Gama
PTP1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1B, Proteína Tirosina Fosfatase 1B
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index, Índice Quantitativo de Sensibilidade à Insulina
RCQ	Relação Cintura Quadril
RE	Reticulo Endoplasmático
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3, Supressor de sinalização de citocinas 3
TC	Tomografia Computadorizada
TITI	Teste Intraperitoneal de Tolerancia a Insulina
TNF $\alpha$	Tumoral Necrosis Factor Alpha, Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
US	Ultrassonografia
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Vis:Sub      Relação entre tecido adiposo visceral sob o tecido adiposo subcutâneo



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
1.1	<b>Epidemiologia da obesidade</b> .....	20
1.2	<b>Tecido adiposo como órgão endócrino</b> .....	23
1.2.1	<u>Leptina</u> .....	24
1.2.2	<u>Adiponectina</u> .....	26
1.2.3	<u>Resistina</u> .....	27
1.2.4	<u>Visfatina</u> .....	28
1.2.5	<u>Vaspina</u> .....	28
1.2.6	<u>Omentina</u> .....	29
1.2.7	<u>Fator de necrose tumoral alfa.(TNF<math>\alpha</math>)</u> .....	29
1.2.8	<u>Interleucina-6 (IL-6)</u> .....	30
1.2.9	<u>Inibidor ativador do plasminogenio 1 (PAI-1)</u> .....	31
1.3	<b>Resistência a insulina e obesidade</b> .....	32
1.4	<b>Fígado e obesidade</b> .....	34
1.5	<b>Lipídios e obesidade</b> .....	37
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	43
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	43
3	<b>MATERIAIS E METODOS</b> .....	44
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	44
3.2	<b>Massa corporal, ingestão alimentar e eficiência alimentar</b> .....	46
3.3	<b>Análise sérica</b> .....	46
3.4	<b>Tecido adiposo</b> .....	47
3.5	<b>Tecido hepático</b> .....	48
3.5.1	<u>Dosagem dos triglicérides hepático</u> .....	49
3.6	<b>Análise dos dados</b> .....	49
4	<b>RESULTADOS</b> .....	51
4.1	<b>Ingestão alimentar e eficiência alimentar</b> .....	51
4.2	<b>Massa corporal</b> .....	51
4.3	<b>Metabolismo de carboidratos</b> .....	53

4.4	<b>Adipocinas</b> .....	54
4.5	<b>Citocinas inflamatórias</b> .....	57
4.6	<b>Tecido adiposo</b> .....	57
4.7	<b>Correlação entre adipocinas, tecido adiposo e índice de adiposidade</b> .....	61
4.8	<b>Tecido hepático</b> .....	61
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70
	<b>REFERENCIAS</b> .....	71
	<b>APÊNDICE - Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets</b> .....	92

## INTRODUÇÃO

A obesidade não é uma condição homogênea, e a distribuição regional do tecido adiposo é importante para compreender a relação entre obesidade, metabolismo da glicose e metabolismo lipídico (Bouchard *et al.*, 1993). Esta distribuição determina a nomenclatura do tecido adiposo, como subcutâneo ou visceral.

Em humanos, o tecido adiposo subcutâneo é aquele que compreende os depósitos de gordura situados abaixo da pele, nas regiões abdominal, glútea e femural. Já o tecido adiposo visceral compreende o depósito gorduroso encontrado próximo ou no interior dos órgãos da cavidade abdominal (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007).

Em roedores, é considerada gordura subcutânea ou gordura inguinal, o depósito localizado entre a parte inferior da caixa torácica e do meio da coxa. Já o depósito de gordura localizado na região abdome até a região do epidídimo é considerado gordura epididimal ou gordura visceral (Fernandes-Santos *et al.*, 2009).

Considerando que o aumento da adiposidade total promove um maior risco de doenças metabólicas, o tecido adiposo visceral está mais relacionado com doenças associadas à obesidade e suas complicações, do que a adiposidade total ou a quantidade de tecido adiposo subcutâneo (Fox *et al.*, 2007; Pou *et al.*, 2007).

O principal papel do tecido adiposo era de armazenamento de energia na forma de triglicérides, mas hoje ele é reconhecido como o maior órgão endócrino do corpo humano (Bulcao *et al.*, 2006). O tecido adiposo expressa e secreta uma variedade de proteínas conhecidos como “adipocinas”, que inclui a leptina, adiponectina, resistina, visfatina (Hida *et al.*, 2005; Bastard *et al.*, 2006), vaspina (Kloting *et al.*, 2006) e omentina (Yang *et al.*, 2006; de Souza Batista *et al.*, 2007) além de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (Antuna-Puente *et al.*, 2008).

Outro importante órgão alvo no caso de excesso alimentar é o fígado, que desempenha um papel central no controle da homeostase glicêmica e está sujeito a uma regulação complexa por substratos, insulina e outros hormônios. Em roedores este órgão parece ser particularmente importante para a sensibilidade à insulina, uma vez que esses animais estocam quantidade proporcionalmente superior de glicogênio quando comparados aos humanos (Nandi *et al.*, 2004; Diehl, 2005).

A obesidade está correlacionada positivamente com quantidade de lipídios na dieta e o tipo de lipídio da dieta também está envolvido no desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade (Bueno *et al.*, 2008). Ademais a ingestão de gordura saturada está intimamente associada com enrijecimento da membrana plasmática, levando a menor capacidade de interação dos receptores localizados nas membranas e diminuição da taxa metabólica basal (Matsuo *et al.*, 1995b, a).

Ao contrário dos efeitos da gordura saturada, a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados de origem vegetal, como óleo de girassol, milho, canola e soja, não está ou está muito pouco associada com a obesidade ou com mudanças na taxa metabólica basal (Storlien *et al.*, 1998). No entanto, os ácidos graxos monoinsaturados estão correlacionados negativamente com doenças cardiovasculares.

Os ácidos graxos monoinsaturados mais comuns na nossa dieta é o ácido oleico, o ácido graxo predominante no óleo de oliva (Perona *et al.*, 2006). Estudos mostram que há melhora do padrão das lipoproteínas plasmáticas em humanos após ingestão de dieta rica em ácido oleico, com subsequente diminuição do colesterol total, da LDL-C e de triglicérides, assim como aumento da HDL-C (Mattson e Grundy, 1985; Mensink *et al.*, 1988). A vantagem dos ácidos graxos monoinsaturados é que eles podem ser sintetizados no organismo e são menos susceptíveis à oxidação química em comparação com os ácidos graxos poli-insaturados (Gorinstein *et al.*, 2003). O óleo de oliva inibe a peroxidação em ratos devido a sua composição de ácidos graxos e do seu conteúdo de polifenóis antioxidantes (Visioli *et al.*, 1995), o que poderia contribuir para os efeitos benéficos do óleo de oliva.

Em nosso laboratório, desde 1994 investigamos o efeito da ingestão em longo prazo de dietas hiperlipídicas com diferentes tipos de lipídios dietéticos (como por exemplo, banha de porco, óleo de soja, óleo de canola, óleo de palma, óleo de oliva, óleo de peixe) (Aguila *et al.*, 1998; Aguila e Mandarim-de-Lacerda, 1999, 2000, 2001b; Aguila e Mandarim-de-Lacerda, 2001a; Aguila *et al.*, 2002; Aguila e Mandarim-de-Lacerda, 2003b, a; Aguila *et al.*, 2004; Aguila *et al.*, 2005; Gregorio *et al.*, 2008) e observamos que o tipo de lipídio da dieta é um fator crucial no desenvolvimento ou atenuação de diversas doenças.

A hipótese deste projeto é que dependendo do perfil lipídico da dieta (banha e porco, rica em ácido graxo saturado; óleo de oliva, rico em ácido graxo monoinsaturado n-9; óleo de girassol, rico em ácido graxo poli-insaturado n-6, óleo

de canola, rico em ácido graxo poli-insaturado n-3) o desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica em camundongos da linhagem C57BL/6 será diferenciado. Para testar tal hipótese, foram estudados os efeitos de diferentes dietas hiperlipídicas sobre o metabolismo de carboidratos, metabolismo dos lipídios sanguíneos, perfil secretor do tecido adiposo, biometria e parâmetros estruturais do tecido adiposo e fígado.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Epidemiologia da obesidade

O crescimento da taxa de obesidade na população é uma questão de extrema importância no mundo desenvolvido. Nos últimos 30 anos os países desenvolvidos lideraram esse aumento e infelizmente, os países em desenvolvimento estão seguindo o exemplo. Mais de 300 milhões de pessoas no mundo ultrapassam o índice de massa corporal (IMC) de 30 kg/m<sup>2</sup> (Kelly *et al.*, 2008; Dixon, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o IMC calculado a partir da divisão do peso em quilogramas pela altura ao quadrado em metros, é considerado normal para ambos os sexos quando se encontra na faixa de 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>. É classificado como sobrepeso, o indivíduo que apresentar o IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>. E por fim, é classificado como obeso, aquele que apresentar o IMC acima de 30 kg/m<sup>2</sup> (WHO, 1998)

Quase um terço da população adulta dos Estados Unidos está obesa, e essa proporção deverá continuar a aumentar (Wang *et al.*, 2008). Na Austrália, as prevalências são 19% e 22% para homens e mulheres adultos, respectivamente (Thorburn, 2005).

No Brasil, os inquéritos populacionais têm mostrado um aumento expressivo da obesidade em todas as faixas etárias de ambos os sexos. (Estatística, 2004). Entre 1974 e 2009, o percentual de meninos brasileiros entre 5 e 9 anos com excesso de peso subiu de 10,9% para 34,8%. Já o percentual de obesidade era de 2,9% em 1974-1975, foi a 4,1% em 1989 e atingiu 16,6% em 2008-2009. Entre as meninas, o excesso de peso passou de 8,6% em 1974-1975 para 11,9% em 1989 e 32% em 2008-2009. Contudo o percentual de obesidade para as meninas subiu de 1,8% para 2,4% em 1989 e atingiu 11,8% em 2008-2009. Tendência semelhante foi observada entre os jovens de 10 a 19 anos. A qual o excesso de peso atingiu 3,7% do total em 1974-1975 e 21,7 em 2008-2009. E a obesidade pulou de 0,4% para 5,9%. Entre as meninas, o excesso de peso saltou de 7,6% para 19,4% e a obesidade de 0,7% para 4%. Entre os adultos - com 20 anos ou mais - o excesso de peso pulou de 18,5% para 50,1% entre os homens e de 28,7% para 48% entre as mulheres. A obesidade saltou de 2,8% para 12,4% entre os homens e de 8% para 16,9% entre as mulheres (IBGE, 2010).

Estima-se que existem mais de 300.000 mortes anuais atribuídas ao sobrepeso e obesidade nos Estados Unidos, sendo 80% destes indivíduos com IMC superior a 30 Kg/m<sup>2</sup> (Allison *et al.*, 1999). A relação entre o IMC e a mortalidade é uma curva ascendente (Gu *et al.*, 2006; Jee *et al.*, 2006) e este risco aumenta progressivamente com o aumento do IMC na faixa acima de 30 Kg/m<sup>2</sup> (Calle *et al.*, 1999). O risco real de morte associada com a obesidade aumenta não só com o IMC, mas também com a idade (Fontaine *et al.*, 2003; Byers, 2006), mas os anos estimados de vida perdidos em consequência da obesidade são maiores nos adultos que se tornaram obesos quando eram crianças (Fontaine *et al.*, 2003).

A análise de um seguimento do estudo de *Framingham* constatou que mulheres com 40 anos de idade não fumantes perderam 7,1 anos de vida e homens na mesma faixa etária e também não fumantes perderam 5,8 anos por causa da obesidade (Peeters *et al.*, 2003). As causas do aumento da mortalidade associada ao sobrepeso e obesidade incluem: doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças renais e câncer (Flegal *et al.*, 2007).

A classificação do peso corporal é geralmente baseada no IMC, que efetivamente, não avalia o conteúdo da gordura corporal. Embora o IMC forneça informações úteis para massa corporal, esse parâmetro precisa ser ajustado para a idade, o gênero e a etnia do indivíduo (WHO, 1999; Evans *et al.*, 2006; Rahman e Berenson, 2010).

A distribuição da gordura corporal constitui uma variável de grande importância na avaliação do risco para doenças crônicas associadas à obesidade. Existe um valor preditivo aumentado para doença cardiovascular pela presença de gordura visceral, predominantemente na região abdominal (Pouliot *et al.*, 1994). Por essa razão, a distribuição de gordura corporal teria maior valor preditivo para a doença cardiovascular do que a relação entre peso e altura (Rexrode *et al.*, 1998). Nesses casos os homens apresentaram maiores riscos, já que como característica masculina existe maior acúmulo de gordura visceral na região abdominal e nas mulheres tal acúmulo ocorre principalmente na região gluteofemoral (Martin e Jensen, 1991). Considerando este aspecto, homem e mulher de mesma idade e com o mesmo índice de massa corpórea têm seu risco cardiovascular aumentado na proporção do aumento de gordura visceral abdominal (Pouliot *et al.*, 1994).

A distribuição de gordura visceral está associada com alterações metabólicas e maior secreção dos componentes da cascata inflamatória proporcionando um ambiente “tóxico”. Em contrapartida, o acúmulo de gordura na metade inferior do

corpo, quadril, glúteo e coxa proximal pode ser protetora devido à influência dos estrógenos (Wajchenberg, 2000; Goodpaster *et al.*, 2003; Kanaya *et al.*, 2004; Klein, 2004).

Estudos de Hans e colaboradores (Han *et al.*, 1995) demonstraram que a medida da circunferência da cintura (CC) maior que 88 cm para mulheres e maior que 102 cm para homens é capaz de identificar paciente com maior risco de doenças cardiovasculares, já a OMS estabelece como ponto de corte da CC de 80 cm para mulheres e 94 cm para homens (WHO, 1998). Da mesma forma, a razão entre as medidas da relação da cintura e do quadril (RCQ) maior que 0,95 para homens e maior que 0,85 para mulheres, que caracterizam a distribuição central de gordura, são utilizadas para identificar indivíduos com maior risco cardiovascular (WHO, 2000).

Um estudo australiano com quase 10.000 pessoas, constatou que a RCQ é um parâmetro melhor do que CC e que o IMC na previsão do risco futuro de morte por doença cardiovascular (Welborn *et al.*, 2003). Outro estudo que avaliou 1779 mulheres e 1625 homens na Tailândia revelou que a RCQ também é a melhor previsão de riscos futuros para o diabetes mellitus especialmente para indivíduos com idade entre 45 e 64 anos (Chen *et al.*, 2009).

Entretanto, outros estudos evidenciaram que a relação CC é a melhor previsão de riscos cardiovasculares. Um estudo europeu realizado em 2008 com aproximadamente 360 mil participantes demonstrou que a CC possui uma correlação mais forte com morte cardiovascular do que a relação RCQ (Pischon *et al.*, 2008). Um terceiro estudo publicado mais recentemente propõe novos valores de IMC e CC para mulheres afro-americanas (Katzmarzyk *et al.*, 2011). Corroborando com esses dados, em 2005, a Federação Internacional de Diabetes propôs diferentes pontos de corte para cintura de acordo com a etnia do indivíduo e a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) também recomendou o uso desses pontos de corte (IDF, 2005; ABESO, 2009-2010).

As principais causas do aumento da obesidade são complexas, mas claramente envolvem a interação com o meio ambiente, como a oferta de alimentos, a cultura, o padrão socioeconômico, ocupação urbana e políticas públicas (Dixon, 2010).

Há também cada vez mais evidências de interações importantes entre o ambiente e nossos genes, possivelmente resultando de uma programação metabólica e alterações epigenéticas (Stevens *et al.*, 2011). Existem evidências muito claras de



que o consumo de dietas hipoproteicas e/ou hiperlipídicas durante a fase de desenvolvimento humano leva ao surgimento de inúmeras doenças crônicas, dentre elas a obesidade (Catta-Preta et al., 2006; Gregorio et al., 2010). E que esses efeitos são transmitidos a gerações futuras (Pinheiro et al., 2008).

A Figura 1 mostra de forma sucinta como a obesidade central influencia alguns mecanismos para o desenvolvimento de uma ampla gama de doenças crônicas.



**Figura 1.** Obesidade central e suas alterações metabólicas e inflamatórias (Figura original do autor).

## 1.2 Tecido adiposo como órgão endócrino

Os adipócitos sintetizam e liberam uma variedade de substâncias do tipo peptídeos e não peptídeos, bem como expressam outros fatores além de sua capacidade de depositar e mobilizar triglicérides, retinoides e colesterol. Estas propriedades permitem uma interação do tecido adiposo com outros órgãos, bem como com outras células adiposas (Galic *et al.*, 2010).

O tecido adiposo, enquanto órgão secretor apresenta peculiaridades distintas, uma vez que constitui um tecido que é distribuído amplamente e de forma variada no corpo. Além disso, a capacidade metabólica do tecido adiposo varia em função da sua localização (subcutânea ou visceral), podendo contribuir de forma mais ou menos intensa para a secreção de citocinas específicas (Hauner, 2004; Fox *et al.*,

2007; Gnacinska *et al.*, 2009). As proteínas sintetizadas pelo tecido adiposo são conhecidas como "adipocinas" ou "adipocitocinas" (Gnacinska *et al.*, 2009).

As adipocinas desempenham um papel importante na regulação dos processos metabólicos (função autócrina e parácrina). Eles também regulam os processos sistêmicos, exibindo propriedades típicas do sistema endócrino. Portanto, o tecido adiposo é uma parte importante do sistema endócrino (Trayhurn e Wood, 2004; Antuna-Puente *et al.*, 2008).

O adipócito é o local de síntese de muitas proteínas envolvidas na inflamação. Citocinas associadas com inflamação e secretadas pelos adipócitos incluem TNF $\alpha$ , interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10) e MCP-1. Os adipócitos também secretam proteínas da fase aguda do processo inflamatório, como amiloide A, haptoglobina e PAI-1. Adipocinas como leptina, resistina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também desempenham um papel importante na inflamação. Além disso, a concentração da maioria das citocinas pró-inflamatórias (que são produzidas por macrófagos e adipócitos) aumenta concomitante com o crescimento da massa de gordura corporal. Portanto, a obesidade pode ser caracterizada como um estado inflamatório crônico, e que desempenha um papel fundamental na gênese da resistência à insulina e síndrome metabólica (Bedoui *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2008; Gnacinska *et al.*, 2009).

### 1.2.1 Leptina

A leptina é um produto do gene da obesidade (*ob*), que foi descoberto em 1994, em camundongos obesos *ob/ob* por Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 1994). Quase ao mesmo tempo, o gene *ob* foi descoberto em humanos em 7q31 do cromossoma. O produto desse gene foi chamado leptina (palavra grega *leptos* que significa magro). A leptina regula a ingestão de alimentos diminuindo o apetite. Sua atuação é maior no sistema nervoso central, mas seu papel não é restrito à regulamentação do balanço de energia (Friedman, 1997; Friedman e Halaas, 1998).

A leptina é quase exclusivamente expressa e produzida pelo tecido adiposo branco, especificamente, pelos adipócitos diferenciados (Ahima e Flier, 2000). A gordura subcutânea é responsável por 80% do total da produção de leptina. Isto foi demonstrado em culturas *in vivo*, onde a produção de leptina foi maior nos

adipócitos subcutâneos do que naqueles de origem visceral. A concentração de leptina plasmática (Considine *et al.*, 1996) e a expressão do M-RNA do tecido adiposo (Vidal *et al.*, 1996) estão diretamente relacionados com o grau da obesidade, assim sendo, um aumento da massa adiposa está associada com aumento da quantidade de leptina, o que torna a leptina um indicador do total da massa adiposa (Antuna-Puente *et al.*, 2008).

Em média, a secreção de leptina por grama de tecido adiposo é duas vezes maior em obesos do que em magros. Isto acontece porque o adipócito do obeso está hipertrofiado duas a quatro vezes do normal, fazendo com que haja uma secreção até sete vezes maior de leptina (Fried *et al.*, 2000).

Embora o principal efeito biológico da leptina no sistema nervoso central seja o controle da ingestão alimentar e do gasto energético, há uma relação significativa entre leptinemia e o estado inflamatório crônico da obesidade, o que sugere outros possíveis efeitos biológicos associados às citocinas (Ahima e Flier, 2000). De fato, um aumento da resposta pró-inflamatória tem sido observado na presença de hiperleptinemia (Loffreda *et al.*, 1998; van Dielen *et al.*, 2001). A leptina é capaz de controlar a produção de TNF $\alpha$  e a ativação de macrófagos (Loffreda *et al.*, 1998) e, por outro lado, parece que o TNF $\alpha$  e a IL-6 são capazes de estimular a produção de leptina pelos adipócitos (van Dielen *et al.*, 2001; Simons *et al.*, 2005). Além disso, a leptina promove agregação plaquetária (Konstantinides *et al.*, 2001; Cooke e Oka, 2002) e aumento de colesterol nos macrófagos (O'Rourke *et al.*, 2002) e na angiogênese (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998).

Outro ponto importante a ser relatado é a relação da leptina com a resistência à insulina. Uma mutação no gene *ob/ob* da obesidade em ratos provoca a falta de leptina, levando a hiperfagia, obesidade e, posteriormente, desenvolvimento de resistência à insulina e doenças endócrinas. A administração de leptina recombinante nestes animais reduz a ingestão alimentar, aumenta o metabolismo basal e reduz de forma significativa a massa corporal (Friedman, 1997; Friedman e Halaas, 1998; Al-Daghri *et al.*, 2002). Embora a administração de leptina em camundongos *ob/ob* cause reversão da obesidade pela redução da ingestão alimentar e aumento da taxa metabólica basal, a relevância deste modelo genético para o tratamento da obesidade humana parece ser mínimo. Em contraste, obesos com hiperleptinemia parecem ser insensíveis ou resistentes à leptina (Westerterp-Plantenga *et al.*, 2001).

A resistência à leptina também pode ocorrer no músculo esquelético (Westerterp-Plantenga *et al.*, 2001). O desenvolvimento da resistência à leptina no músculo esquelético é caracterizada pela supressão da atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Steinberg *et al.*, 2006a; Steinberg *et al.*, 2006c).

### 1.2.2 Adiponectina

A adiponectina foi descoberta em 1990 por quatro grupos diferentes de pesquisadores. É produzida predominantemente pelo tecido adiposo e sua concentração, diferentes das demais adipocinas, é reduzida na presença de obesidade e resistência a insulina (Lihn *et al.*, 2005; Sharma e Tarnopolsky, 2005; Trujillo e Scherer, 2005).

A hipoadiponectinemia está associada com a ocorrência de síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, esteatose hepática e doença cardíaca isquêmica (Targher *et al.*, 2004; Kadowaki *et al.*, 2006; Frystyk *et al.*, 2007).

Nível elevado de leptina e nível diminuído de adiponectina são característicos da síndrome metabólica e correlacionados com alto risco de doenças cardiovasculares. Alguns autores sugerem que a adiponectina plasmática pode prever eventos cardiovasculares, em uma população sem diagnóstico de doença cardiovascular (Lindsay *et al.*, 2002). Além disso, há razões para crer que a adiponectina não pode ser apenas um marcador de risco cardiovascular, mas também um fator de risco causal. A adiponectina pode reduzir o risco de doença cardiovascular, melhorando a sensibilidade à insulina e os níveis séricos de colesterol e triacilglicerol, como sugerido por estudos experimentais e ensaios clínicos (Fagerberg *et al.*, 2010; Hecker *et al.*, 2010). Diante dos dados supracitados, entende-se que a adiponectina impede o desenvolvimento do diabetes mellitus e da doença cardíaca isquêmica. Em vista dos vantajosos efeitos metabólicos dessa proteína, é esperado que a adiponectina possa no futuro ser usada terapeuticamente (Lihn *et al.*, 2005; Gnacinska *et al.*, 2009).

### 1.2.3 Resistina

As primeiras informações sobre a resistina foram descritas em 2001. Ela deve seu nome ao seu papel na resistência à insulina. Esta proteína também é conhecida como FIZZ3 (found inflammatory zone, encontrado em zonas inflamatórias) e ADSF (adipocyte-specific secretory factor, fator secretor específico do adipócito) e foi inicialmente identificado como um novo fator de transcrição produzido exclusivamente pelos adipócitos (Steppan *et al.*, 2001).

A secreção de resistina ocorre nos adipócitos de roedores (Steppan *et al.*, 2001), e nos macrófagos de humanos (Patel *et al.*, 2003). A síntese da resistina está aumentada no estado pós-prandial e na obesidade e pode ser reduzida pelos ligantes dos receptores ativados por proliferador de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ) (Rajala *et al.*, 2004).

Estudos baseados em animais com hiperresistinemia demonstram que a resistina exerce papel na homeostase da glicose. A perfusão ou superexpressão de resistina leva à hiperglicemia, em grande parte, pelo aumento da produção de glicose hepática (Banerjee *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2006).

A importância da resistina em seres humanos ainda não está muito clara, visto que nem todos os estudos demonstram aumento da resistina sérica em pacientes obesos (Savage *et al.*, 2001; Sentinelli *et al.*, 2002).

Ainda não está totalmente elucidado sobre as vias de sinalização intracelular pelo qual a resistina induz seus efeitos metabólicos, embora a resistina tenha se mostrado importante na regulação de vias metabólicas em vários tecidos e órgãos incluindo o hipotálamo, adipócitos e fígado. Uma constatação "in vivo" é que a resistina suprime a ativação da AMPK no fígado e no músculo esquelético (Banerjee *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2006). No entanto, no músculo isolado de roedor isto não ocorre, sugerindo que os efeitos inibitórios de resistina na ativação da AMPK possa exigir a liberação de um fator desconhecido de outros tipos de células (Jorgensen *et al.*, 2009). Uma possibilidade para explicar esse fato pode ser o aumento da SOCS3 induzida pela resistina (Steppan *et al.*, 2005).

#### 1.2.4 Visfatina

A visfatina foi identificada por Shimomura e colaboradores. Ela é sintetizada e secretada principalmente pela gordura visceral - por isso o nome "visfatina". Este fator está presente no plasma de humanos e de camundongos (Fukuhara *et al.*, 2005). Assim sendo, níveis plasmáticos de visfatina estão correlacionados com a gordura visceral (Fukuhara *et al.*, 2005);

A infusão endovenosa de visfatina em ratos normais leva a uma queda aguda da glicemia, independente da secreção de insulina (Fukuhara *et al.*, 2005). Este efeito hipoglicemiante tem sido visto em modelos de resistência à insulina induzido por dieta ou hiperinsulinêmicos (induzidos por estreptozotocina).

Da mesma forma que a insulina, a visfatina *in vitro* aumenta a captação de glicose pelos miócitos e adipócitos e inibe a liberação de glicose pelo hepatócito. Os efeitos também são observados na via de sinalização da insulina e surpreendentemente, a visfatina e a insulina possuem a mesma afinidade para o receptor de insulina, com a visfatina interagindo fisicamente com o receptor, porém em um local diferente (Fukuhara *et al.*, 2005).

Apesar dessas semelhanças entre a visfatina e a insulina, há também diferenças importantes. Por exemplo, os níveis de visfatina não se alteram nos estados alimentados ou em jejum. Embora seja muito cedo para considerar esta adipocina no desenvolvimento de medicamentos hipoglicemiantes, uma pesquisa mostrou que ocorre um aumento da visfatina sérica com a deterioração progressiva das células beta em pacientes diabéticos do tipo 2 (Lopez-Bermejo *et al.*, 2006).

#### 1.2.5 Vaspina

Vaspina (*visceral adipose-tissue-derived serine protease inhibitor* - vaspin) é uma adipocina recentemente identificada como um membro da família de inibidor de protease-serina (Hida *et al.*, 2005). É expressa no tecido adiposo visceral e está presentes em roedores (Hida *et al.*, 2005) e humanos (Kloting *et al.*, 2006) concomitante com a obesidade. A expressão tecidual e os níveis plasmáticos da vaspina são normalizados pela ação da insulina ou sensibilizadores de insulina (como por exemplo, a pioglitazona) (Curat *et al.*, 2006). Além disso, injeções de

vaspina em ratos obesos melhorou a resistência à insulina e a tolerância aos carboidratos (Hida *et al.*, 2005).

#### 1.2.6 Omentina

Omentina foi identificada a partir de triagem de transcrições do DNA da gordura omental humana e está fortemente expressa no tecido adiposo visceral e fracamente expressa no tecido adiposo subcutâneo (Schaffler *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). A omentina é um peptídeo de 313 aminoácidos, está presente nas células do estroma vascular do tecido adiposo omental, mas não em células adiposas maduras. Curiosamente, ela aumenta a secreção de insulina, estimula a captação de glicose pelos adipócitos (omental e subcutâneo), e promove a fosforilação da proteína quinase B (PKB ou PKB) (Yang *et al.*, 2006).

Indivíduos magros possuem níveis plasmáticos mais elevados de omentina do que os indivíduos obesos ou com excesso de peso (de Souza Batista *et al.*, 2007). Os níveis plasmáticos de omentina estão inversamente correlacionados com o IMC, com a CC, com os níveis de leptina e com a resistência à insulina. Além disso, a omentina está positivamente correlacionada com a adiponectina e os níveis de HDL-colesterol. Assim, a expressão do gene omentina encontra-se diminuído na obesidade (de Souza Batista *et al.*, 2007).

#### 1.2.7 Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ )

Em seres humanos o TNF $\alpha$  é sintetizado e secretado pelas células do estroma vascular e frações da matriz, incluindo os macrófagos, apesar de ter seu m-RNA expresso no tecido adiposo. Entretanto, em condições fisiológicas, o tecido adiposo produz uma quantidade relativamente grande de TNF $\alpha$ , fato este que o inclui como uma adipocina. Apenas uma parte do TNF $\alpha$  derivado do tecido adiposo se origina do próprio adipócito; uma considerável parte pode ser secretada por macrófagos infiltrados no tecido adiposo, fato este particularmente importante na obesidade (Weisberg *et al.*, 2003).

O TNF $\alpha$  foi o primeiro fator derivado do tecido adiposo que correlacionou obesidade, inflamação e diabetes. Hotamisligil e colaboradores descreveram que o aumento da expressão de TNF $\alpha$  no tecido adiposo tem relação com a resistência à insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993). Além disso, Nicklas e colaboradores demonstraram que a expressão gênica do TNF $\alpha$  nos tecidos adiposos (subcutâneo e visceral) é maior em pessoas obesas do que em eutróficos (Nicklas *et al.*, 2005). Já se sabe que o TNF $\alpha$  prejudica a sinalização de insulina nos hepatócitos e no tecido adiposo (Stephens *et al.*, 1997; Ruan *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2005).

Em diabéticos obesos, a neutralização do TNF $\alpha$  não parece melhorar a tolerância à glicose ou a sensibilidade à insulina, no entanto, em indivíduos obesos sem diabetes, essa neutralização melhora a sensibilidade à insulina (Tam *et al.*, 2007). Além disso, o TNF $\alpha$  é capaz de reduzir a oxidação dos ácidos graxos tanto nos hepatócitos (Nachiappan *et al.*, 1994) como no músculo esquelético (Steinberg *et al.*, 2006b) fazendo com que haja maior acúmulo de gordura nesses tecidos e contribuindo ainda mais para a resistência a insulina.

#### 1.2.8 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina imunomoduladora com ação pró-inflamatória e endócrina. O tecido adiposo (preferencialmente a gordura visceral) é a principal fonte de IL-6 circulante nos estados não inflamatórios (Fantuzzi, 2005). A IL-6 possui ação sobre várias células e tecidos. É capaz de induzir a produção de proteína C reativa (PCR) pelos hepatócitos, ativar células do sistema imune e apresenta grande correlação com complicações cardiovasculares (Bastard *et al.*, 2006). O nível de IL-6 é três vezes maior em pacientes com obesidade e diabetes tipo 2 do que em pessoas eutróficas. Em adipócitos e hepatócitos, a IL-6 inibe a via de sinalização da insulina (Senn *et al.*, 2002; Rotter *et al.*, 2003).

Além disso, a IL-6 promove a oxidação dos ácidos graxos e captação de glicose no músculo esquelético, exigindo a ativação da AMPK (Carey *et al.*, 2006; Glund *et al.*, 2007). No entanto, esse mecanismo ainda é desconhecido. Supõe-se que a IL-6 influencia negativamente o metabolismo dos carboidratos através do impacto sobre a regulação da visfatina (Pittas *et al.*, 2004).



### 1.2.9 Inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1)

O PAI-1 é uma proteína antifibrinolítica produzida, sobretudo pelo fígado, mas também pelo tecido adiposo, que é a sua principal fonte na obesidade. A produção do PAI-1 é estimulada pela insulina e pelos corticoides e a sua expressão é regulada pelos PPAR (Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo), que desempenham um papel na adipogênese, no metabolismo da glicose e de lipídios (Fantuzzi, 2005).

Foi descrito que existe correlação da concentração de PAI-1 e o IMC em todas as faixas etárias, tanto em homens como em mulheres. Assim, obesos apresentam maior concentração de PAI-1 em comparação com eutróficos. Além disso, existe um aumento da expressão do mRNA de PAI-1 no tecido adiposo dos obesos. Alguns estudos demonstram que existe correlação direta entre expressão de PAI-1 nos adipócitos e sua concentração plasmática. Entretanto ainda há divergência sobre o local onde o PAI-1 é mais expresso. Alguns autores relatam que a expressão de PAI-1 é maior no tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo e com isso, a obesidade visceral está associada ao aumento da concentração do PAI-1. Entretanto, outros estudos relatam que não existe diferença na expressão de PAI-1 entre o tecido adiposo visceral e o subcutâneo (Mutch *et al.*, 2001; Mertens e Van Gaal, 2002; Trost *et al.*, 2006).

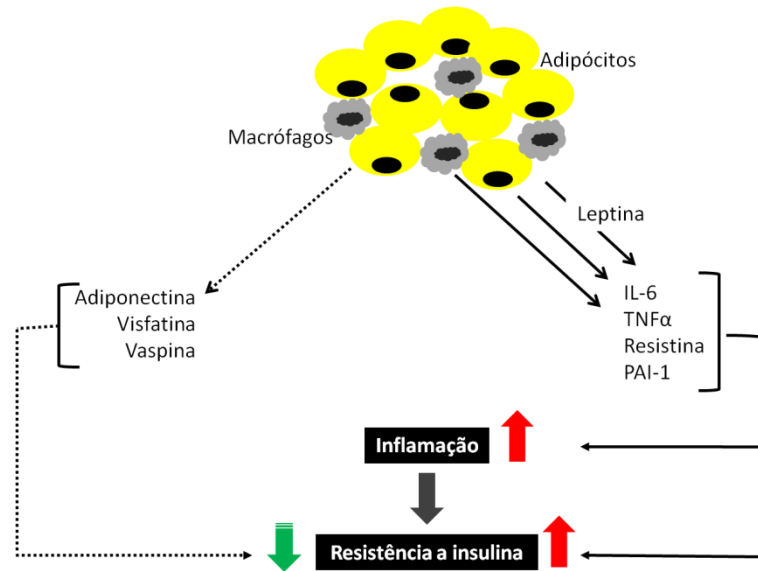
Níveis elevados de PAI-1 coexistem com quase todos os componentes da síndrome metabólica, incluindo hiperinsulinemia, hipertensão arterial sistêmica, obesidade visceral, hipertrigliceridemia, aumento da concentração dos AGL, aumento do LDL colesterol e diminuição do HDL colesterol. Níveis elevados de PAI-1 é um fator de risco independente para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, uma vez que diabéticos tipo 2 apresentam concentração de PAI-1 três vezes maiores do que indivíduos sem diabetes (Trost *et al.*, 2006).

Todavia, o estilo de vida também influencia a concentração de PAI-1. Por exemplo, a diminuição do peso, a prática regular de atividade física e a diminuição da resistência à insulina reduzem significativamente os níveis séricos de PAI-1 (Mavri *et al.*, 2004; Trost *et al.*, 2006).

Desta forma, as adipocinas leptina, resistina, TNF $\alpha$ , PAI-1, MCP-1 e IL-6 levam a um estado pró inflamatório com indução da resistência a insulina. Em contrapartida,

as adipocinas adiponectina, vaspina e visfatina possuem efeitos antiinflamatórios, melhorando a sensibilidade a insulina.

A ação de todas as adipocinas supracitadas e sua relação com a obesidade e inflamação está resumida na Figura 2.



**Figura 2.** Tecido adiposo, adipocinas e resistência a insulina (figura original do autor).

### 1.3 Resistência à insulina e obesidade

O mecanismo preciso na gênese da resistência a insulina ainda é desconhecido, porém alguns estudos têm demonstrado que as alterações moleculares na via de sinalização da insulina são determinantes na resistência à insulina que acontece nos tecidos periféricos, como o músculo esquelético e o tecido adiposo. Uma dessas alterações pode ser na translocação do transportador de glicose (GLUT), prejudicando a passagem de glicose para o meio intracelular. Entretanto, estas alterações na translocação do GLUT é mais específica no subtipo GLUT-4, não sendo tão marcada nos demais subtipos deste transportador (Hotamisligil *et al.*, 1996; Dandona *et al.*, 2004; Tsukumo *et al.*, 2007; Waki e Tontonoz, 2007).

principal responsável pela ativação da translocação do transportador de glicose (GLUT's) na membrana plasmática,

O GLUT-4 é o transportador insulina-dependente mais abundantemente encontrado nas membranas celulares de tecidos como músculo esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo. Entretanto, sem o estímulo hormonal da insulina, o GLUT-4 fica armazenado em vesículas citoplasmáticas e a sua concentração na membrana fica muito baixa. Após a estimulação pela insulina, esses transportadores são translocados para a membrana e o transporte de glicose acontece. No entanto, em algumas células, como nos hepatócitos, neurônios e hemácias, a glicose é capaz de se difundir para o interior da célula independente da presença de insulina (Olson e Pessin, 1996; Foster e Klip, 2000).

Na obesidade ocorre redução na concentração e na atividade do receptor de insulina (RI), redução na concentração e fosforilação dos substratos do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2), redução na atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), redução na translocação dos GLUT's e redução na atividade das enzimas intracelulares (Tuomilehto *et al.*, 2001; Knowler *et al.*, 2002; McPherson e Jones, 2003). Isso atenua a captação de glicose nos tecidos insulino-dependentes, como músculo esquelético e tecido adiposo.

Os ácidos graxos livres (AGL) foram implicados nos processos de fosforilação e ativação de via insulina e RI. Ao passo que a presença de elevados níveis de AGL circulantes está associada a uma menor fosforilação em sítios específicos e à menor ativação de proteínas-chave da via da insulina (IRSs/PI3q). Evidências científicas apontam uma relação direta entre AGL e resistência à insulina, que pode ser decorrente do acúmulo de triglicérides e metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-Coenzima A e ceramidas) no músculo e no fígado (Shulman, 2004; Savage *et al.*, 2007).

Existem formulas matemáticas para identificar a resistência à insulina. Em condições fisiológicas basais (após um jejum noturno, por exemplo) os níveis sanguíneos de insulina e da glicose podem ser correlacionados e permitem o cálculo de um índice da sensibilidade (ou resistência) à insulina. Destacam-se a razão glicose/insulina (Caro, 1991), o índice de resistência à insulina do HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) (Matthews *et al.*, 1985; Bonora *et al.*, 2000), o índice de resistência à insulina FIRI (*Fasting Insulin Resistance Index*) (Duncan *et*

*al.*, 1995; Katz *et al.*, 2000) e o índice de sensibilidade à insulina QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) (Katz *et al.*, 2000; Radziuk, 2000).

Dentre os índices supracitados, o HOMA apresenta dois tipos: o HOMA-IR e o HOMA-β. O HOMA-IR avalia a resistência insulínica, enquanto o HOMA-β avalia a função secretora da célula β pancreática. De todos os testes o mais utilizado é o HOMA-IR que pode ser calculado pela fórmula abaixo:

$$\text{HOMA IR} = \frac{\text{Insulina (mU/mL)} \times \text{glicemia (mMol/L)}}{22,5}$$

O HOMA-IR é considerado normal quando o valor encontra-se na faixa de: 0,97 a 1 (Matthews *et al.*, 1985; Bonora *et al.*, 2000)

#### 1.4 Fígado e obesidade

Uma das complicações mais frequentes da obesidade em adultos e crianças é a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Rector *et al.*, 2008), que possui correlação com o tecido adiposo visceral (van der Poorten *et al.*, 2008) e hoje é considerado o fator hepático da síndrome metabólica (Farrell e Larter, 2006).

DHGNA é uma das doenças hepáticas mais comuns e tem como definição, o acúmulo de triglicérides hepático maior de 5% do peso do órgão (Kleiner *et al.*, 2005). Sua prevalência varia de 10% a 30% em adultos saudáveis e na presença de obesidade e diabetes mellitus tipo 2, essa faixa aumenta para 75% a 100% (Angulo, 2002; Browning *et al.*, 2004).

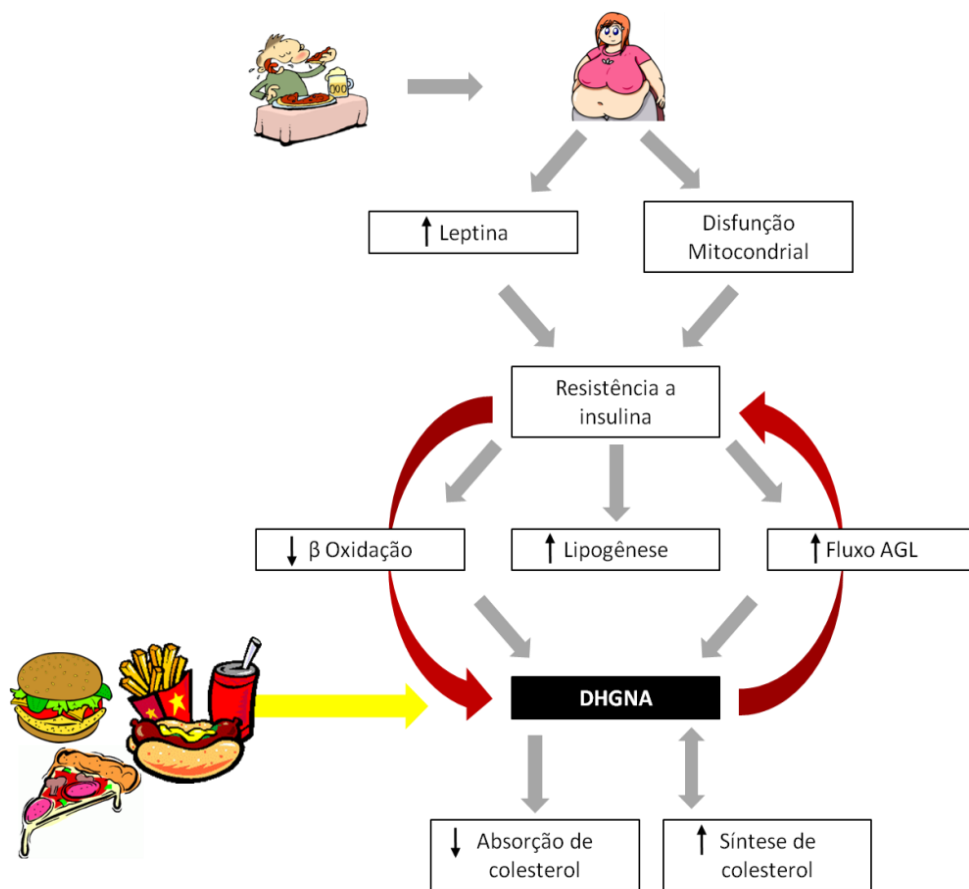
Embora a patogênese exata da DHGNA permaneça desconhecida, a hipótese mais aceita é que fatores agressores estão envolvidos nesta condição. Em primeiro lugar, como resultado da resistência à insulina, há maior síntese e acúmulo de triglicérides no hepatócito, levando à esteatose macrovesicular. Logo, é provável que uma menor oxidação de ácidos graxos, por uma alteração da função mitocondrial, possa contribuir para a esta situação. A segunda agressão é geralmente atribuída ao estresse oxidativo, que causa peroxidação de lipídeos na membrana do hepatócito,

produção de citocinas que são, em parte, responsáveis pela progressão da esteatose para esteatoepatite e cirrose (Liu *et al.*, 2010).

Um recente estudo demonstrou de forma convincente que a disfunção mitocondrial precede o desenvolvimento da DHGNA e resistência à insulina em ratos obesos e hiperfágicos (*Otsuka Long Evans Tokushima Fatty*, OLETF). Além disso, a perda progressiva da função mitocondrial em conjunto com a transição da resistência à insulina para diabetes tipo 2, provavelmente contribui para a progressão da esteatose hepática. Sendo assim, a manutenção da função mitocondrial representa um alvo terapêutico atraente para a prevenção e o tratamento da DHGNA (Rector *et al.*, 2010).

O papel da leptina na DHGNA é ainda controverso, mas estudos sugerem que este hormônio está envolvido no desenvolvimento da esteatose hepática e esteatoepatite, e que os níveis de leptina se correlacionam com a esteatose, mas não com inflamação ou fibrose (Uygun *et al.*, 2000; Chitturi *et al.*, 2002).

Outra observação importante é com relação à síntese e absorção de colesterol em pacientes portadores de DHGNA. Recentemente um grupo de pesquisadores da Finlândia avaliou a síntese e absorção de 114 pacientes portadores de DHGNA em comparação com 128 indivíduos saudáveis e foi constatado que a síntese de colesterol estava aumentada e a absorção diminuída nos pacientes portadores da DHGNA. O metabolismo do colesterol está associado ao teor de gordura no fígado independente da massa corporal, o que significa que quanto maior for o acúmulo de lipídio no fígado, maior será a síntese do colesterol, e menor a absorção do colesterol, contribuindo de forma significativa para o aumento do colesterol livre e agravando ainda mais os efeitos tóxicos no fígado (Simonen *et al.*, 2011). A Figura 3 resume a patogênese da DHGNA.



**Figura 3.** Diagrama das possíveis causas e mecanismos de acúmulo de Triglicérides no fígado (Figura original do autor).

Como em outras doenças hepáticas, muitos pacientes com DHGNA (50% a 100%) são assintomáticos. A doença hepática é muitas vezes descoberta acidentalmente, durante exames de rotina que revelam um aumento das transaminases hepáticas (Sass *et al.*, 2005). Os exames de imagens como ultrassonografia (US), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) podem identificar a esteatose hepática. Destes, a US é a mais barata. Os achados sonográficos de alterações gordurosas difusas são ecotextura hiperecótica difusa e aumento de ecotextura comparado ao rim. Por outro lado, na TC evidencia-se menor densidade do parênquima hepático. A comparação destes dois métodos mostra que o exame de US é o mais sensível na detecção das mudanças gordurosas difusas que ocorrem na esteatose. Entretanto, quando as alterações de infiltração gordurosa são localizadas, a TC e a RM são superiores a US (Fabbrini et

al., 2009; Guiu et al., 2009; Mennesson et al., 2009; Schwenzer et al., 2009; Lee et al., 2010b). Além disso, estudos recentes evidenciaram a necessidade de uma padronização dos exames diagnósticos não invasivos (Fabbrini et al., 2009; Guiu et al., 2009; Mennesson et al., 2009; Schwenzer et al., 2009; Lee et al., 2010b). Entretanto, deve ser destacado que nenhum dos métodos citados é capaz de distinguir a esteatose da esteatoepatite, nem estimar a gravidade dessas alterações. Assim, a biópsia hepática ainda é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da DHGNA (Fabbrini et al., 2009; Guiu et al., 2009; Mennesson et al., 2009; Schwenzer et al., 2009; Lee et al., 2010b).

O método utilizado para avaliar as lâminas de tecido hepático e classificar o grau da lesão é outro ponto em discussão na literatura. A coloração utilizada nas lâminas pode variar, porém alguns estudos indicam que para melhor preservação dos vacúolos de gordura e, conseqüentemente, uma avaliação mais fidedigna do tecido, seria mais indicado o método da coloração Oil Red O em cortes congelados (Ge et al., 2010; Levene et al., 2010; Rector et al., 2010). Por tanto para classificar o grau da lesão também não existe ainda um consenso. Diversos métodos quantitativos e qualitativos (Brunt et al., 1999; Turlin et al., 2001; Kleiner et al., 2005) foram descritos e sabe-se hoje que os métodos qualitativos acabam sendo dependentes da experiência do avaliador, não tendo uma boa acurácia. Em contrapartida, os métodos quantitativos, sejam através da análise digital da imagem ou através da contagem de pontos por estereologia, apresentam maior acurácia e com isso são os mais recomendados para o diagnóstico (Franzen et al., 2005; Turlin et al., 2009; Rawlins et al., 2010).

## 1.5 Lipídios e obesidade

A obesidade não é uma doença singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que, em última análise, refletem no fenótipo obeso (Dixon, 2010). O balanço energético positivo é importante contribuidor para o desenvolvimento da obesidade, promovendo aumento nos estoques de energia e no peso corporal. A manutenção do balanço energético positivo pode ser consequência tanto de aumento na ingestão alimentar, como redução no gasto energético, ou os dois fatores combinados (Hill et al., 2000).

As estatísticas populacionais da maioria dos países do mundo indicam que a industrialização e a informatização têm sido associadas com aumento do sedentarismo e, mais recentemente, com uma mudança significativa na população de peso saudável para sobrepeso/obesidade (Chaput e Tremblay, 2009). Além disso, este processo de modernização e transição econômica tem promovido alterações na industrialização da produção alimentícia, que colabora para o consumo de dietas ricas em proteína e gordura e com baixo teor de carboidratos complexos (Wildey *et al.*, 2000). Deste modo, o sedentarismo e os hábitos alimentares parecem representar o principal fator de risco no desenvolvimento da obesidade.

Não são apenas os totais de energia ingerida e energia gasta que regulam a quantidade do estoque de energia corporal (Flatt, 1987, 1995), mas também o balanço de cada macronutriente está envolvido no rigoroso controle para ajustar o consumo com o gasto (e vice-versa) e manter um estado de equilíbrio. Flatt (Flatt, 1987) afirma que o balanço de nitrogênio e de carboidratos é facilitado pela capacidade do organismo em ajustar as taxas de oxidação de aminoácidos e de glicose, respectivamente, em relação aos seus consumos alimentares. No caso das gorduras, esse ajuste é bem menos preciso e o aumento do seu consumo não estimula proporcionalmente o aumento de sua oxidação. Além disso, a eficiência com que o lipídio da dieta é estocado como gordura corporal é alta (por volta de 96%). O aumento da ingestão de lipídios induz ao balanço lipídico positivo e, conseqüentemente, ao acúmulo de tecido adiposo corporal (Flatt, 1987, 1995). Em animais, a primeira descrição que o aumento da ingestão de lipídios induzia obesidade ocorreu em 1959 com o trabalho de Masek e Fabry (Masek e Fabry, 1959). Posteriormente a isso, inúmeros estudos apontaram que a dieta hiperlipídica é um componente importante na etiologia da obesidade (Pinheiro *et al.*, 2007; Souza-Mello *et al.*, 2007; Fernandes-Santos *et al.*, 2009; Fraulob *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010).

No entanto, o tipo de lipídio ingerido na dieta também pode influenciar a adiposidade, visto que alguns trabalhos mostram correlação significativa entre o percentual de gordura corporal e o percentual de gordura saturada e monoinsaturada ingerida na alimentação (Romieu *et al.*, 1988). Matsuo e Suzuki (Matsuo e Suzuki, 1994) também encontraram alteração na afinidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no tecido adiposo marrom, no coração e no músculo soleo



decorrente de dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados. Awad e Zepp (Awad e Zepp, 1979) já haviam demonstrado, em 1979, que ratos alimentados com dieta rica em ácidos graxos saturados apresentavam menor taxa de lipólise do que animais alimentados com dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados, devido à menor atividade da lipase hormônio-sensível.

Awad e Chattopadhyay (Awad e Chattopadhyay, 1986) demonstraram que a dieta rica em ácidos graxos saturados altera a composição do triacilglicerol nos adipócitos, modificando a localização dos ácidos graxos encontrados nas posições 1 e 3. Uma possibilidade para a redução da atividade lipolítica resultante da dieta rica em ácidos graxos saturados é uma menor afinidade entre a lipase hormônio-sensível e o triacilglicerol modificado (Takeuchi *et al.*, 1995).

O ácido graxo saturado é oxidado mais lentamente devido, parcialmente, à reduzida taxa de absorção pelas células intestinais, e subsequente reduzida taxa de reesterificação. Estes ácidos graxos promovem alterações nas membranas celulares que, por fim, reduzem a taxa metabólica basal contribuindo para o aumento da adiposidade. Estas alterações nas membranas decorrem de redução nas atividades de enzimas que participam da biossíntese de ácidos graxos denominadas de desaturases, em adaptação à alta ingestão de ácidos graxos saturados. Esta redução resulta em maior disponibilidade de ácidos graxos saturados, que acabam compondo as membranas celulares em maior quantidade, aumentando sua saturação. O aumento da saturação das membranas celulares implica em alterações na funcionalidade na bomba de sódio e potássio, reduzindo o transporte de elétrons nas membranas mitocondriais. Sabe-se que o transporte de sódio no consumo energético celular contribui com 20% da taxa metabólica basal em humanos. Sendo assim, estas alterações na composição das membranas celulares, por fim, reduzem a taxa metabólica basal de animais e humanos que ingerem grande quantidade de ácidos graxos saturados, contribuindo para o aumento da adiposidade nestas situações (Pan *et al.*, 1994).

Um estudo recente avaliou o efeito metabólico e molecular de diferentes dietas hiperlipídicas (42% de lipídio dividido em banha de porco, óleo de oliva, óleo de coco e óleo de peixe). Este estudo constatou que a gordura saturada (ofertada na forma de banha de porco) é a mais indicada para provocar alterações metabólicas associadas à obesidade e que a gordura monoinsaturada (sob a forma de óleo de oliva) não protege o animal de alterações adiposas e metabólicas. Além disso, o alto

consumo de gordura de coco parece ser menos deletério, em termos promoção da obesidade e da resistência à insulina, mas este óleo está associado com esteatose hepática e hipertrigliceridemia. Entretanto, animais alimentados com dietas ricas em gordura à base de óleo de peixe permanecem magros e sensíveis à insulina (Buettner *et al.*, 2006).

Além disso, os efeitos induzidos pelas dietas hiperlipídicas são dependentes não só da quantidade de gordura utilizada, mas também da fonte do lipídio (Buettner *et al.*, 2007). A Tabela 1 resume alguns estudos sobre o tema.

**Tabela 1.** Efeitos metabólicos descritos de diferentes formulações de dietas hiperlipídicas.

Parâmetro	Referência	Animal	Fonte de lipídio	% Lipídio	Tempo de dieta (dias)	Efeito (%)
<b>Peso</b>	(Yaspelkis <i>et al.</i> , 2001)	Wistar	Banha de porco	60	120	+15
	(Briaud <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Banha de porco	58	42	+10
	(Fraulob <i>et al.</i> , 2010)	C57Bl/6	Banha de porco	60	112	+30
	(Buhman <i>et al.</i> , 2004)	Balb/cJ	Gordura do leite	42	136	+11
	(Woods <i>et al.</i> , 2003)	Long-Evans	Manteiga	43	75	+10
	(Yaqoob <i>et al.</i> , 1995)	Lewis	Gordura do coco	40	70	+16
	(Park <i>et al.</i> , 1997)	C57Bl/6	Gordura do coco	42	105	+8
	(Yaqoob <i>et al.</i> , 1995)	Lewis	Óleo de oliva	40	70	+8
	(Park <i>et al.</i> , 1997)	C57Bl/6	Óleo de milho	42	105	+11
	(Yaqoob <i>et al.</i> , 1995)	Lewis	Óleo de girassol	40	70	+19
	(Oakes <i>et al.</i> , 1997)	Wistar	Óleo de girassol	59	21	SA
	(Chalkley <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de girassol	60	300	+28
	(Yaqoob <i>et al.</i> , 1995)	Lewis	Óleo de peixe	40	70	+21
	(Holness <i>et al.</i> , 2003)	Wistar	Óleo de peixe	48*	28	SA
	(Levy <i>et al.</i> , 2004)	Fischer	Óleo de peixe	45	28	-8
<b>Glicose Sérica</b>	(Briaud <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Banha de porco	58	42	+11
	(Fraulob <i>et al.</i> , 2010)	C57Bl/6	Banha de porco	60	112	+18
	(Gregoire <i>et al.</i> , 2002)	C57Bl/6	Gordura do leite	42	50	+14
	(Oakes <i>et al.</i> , 1997)	Wistar	Óleo de girassol	59	21	+11
	(Song <i>et al.</i> , 2001)	Wistar	Óleo de girassol	45	14	+15
	(Chalkley <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de girassol	60	300	SA
	(Taouis <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de girassol	58	28	+26
	(Taouis <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de peixe	58	28	+24
	(Holness <i>et al.</i> , 2003)	Wistar	Óleo de peixe	48*	28	SA
	(Levy <i>et al.</i> , 2004)	Fischer	Óleo de peixe	45	28	-5

Tabela 1. (continuação).

Parâmetro	Referência	Animal	Fonte de lipídio	% Lipídio	Tempo de dieta (dias)	Efeito (%)
Insulina Sérica	(Gustafson <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Banha de porco	25	21	+81
	(Haluzik <i>et al.</i> , 2004)	129S1	Banha de porco	45	98	+100
	(Yaspelkis <i>et al.</i> , 2001)	Wistar	Banha de porco	60	120	-18
	(Briaud <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Banha de porco	58	42	SA
	(Fraulob <i>et al.</i> , 2010)	C57Bl/6	Banha de porco	60	112	+82
	(Woods <i>et al.</i> , 2003)	Long-Evans	Manteiga	43	75	+35
	(Gregoire <i>et al.</i> , 2002)	C57Bl/6	Gordura do leite	42	50	+510
	(Oakes <i>et al.</i> , 1997)	Wistar	Óleo de girassol	59	21	+20
	(Chalkley <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de girassol	60	300	+170
	(Song <i>et al.</i> , 2001)	Wistar	Óleo de girassol	45	14	+85
	(Taouis <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de girassol	58	28	+95
	(Taouis <i>et al.</i> , 2002)	Wistar	Óleo de peixe	58	28	+80
	(Holness <i>et al.</i> , 2003)	Wistar	Óleo de peixe	48*	28	-45
(Levy <i>et al.</i> , 2004)	Fischer	Óleo de peixe	45	28	-50	
<b>Resistina</b>	(Lee <i>et al.</i> , 2005)	C57Bl/6	Gordura do leite	42	136	+50
<b>Leptina</b>	(Woods <i>et al.</i> , 2003)	Long-Evans	Manteiga	43	75	+66
	(Gregoire <i>et al.</i> , 2002)	C57Bl/6	Gordura do leite	42	50	+1560
<b>Adiponectina</b>	(Haluzik <i>et al.</i> , 2004)	129S1	Banha de porco	45	98	-11
	(Harada <i>et al.</i> , 2003)	129Sv - C57Bl/6	Banha de porco	40	105	-5
<b>Triglicérides</b>	(Gustavsson <i>et al.</i> , 2009)	Sprague–Dawley	Manteiga de cacau	52	3	+52
<b>Hepático</b>	(Gustavsson <i>et al.</i> , 2009)	Sprague–Dawley	Óleo de girassol	52	3	+55
<b>Atividade da AMPK</b>	(Jelenik <i>et al.</i> , 2010)	C57Bl/6	Óleo de milho	NI	36	SA
	(Jelenik <i>et al.</i> , 2010)	C57Bl/6	Óleo de peixe	NI**	36	+50

Óleo de peixe representa \*7% ou \*\*15% do total; AS = Sem alteração; NI = Não informado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos de diferentes dietas hiperlipídicas na massa corporal, metabolismo de carboidratos, secreção de adipocinas e morfologia do tecido adiposo e fígado em camundongos C57Bl/6.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Induzir obesidade a partir de diferentes dietas hiperlipídicas;
- Avaliar metabolismo de glicose e insulina;
- Avaliar os níveis séricos das adipocinas e citocinas inflamatórias;
- Avaliar a morfometria dos adipócitos;
- Avaliar a presença de esteatose hepática e acúmulo de triglicérides hepático.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com o comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (número CEA 166/2006) e as recomendações dos procedimentos com experimentação animal (NIH Publication No. 85 - 23, revisada 1996). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $21\pm 2$  °C), umidade ( $60\pm 10\%$ ) e ciclo claro-escuro (12:12 h). Camundongos machos C57BL/6 ( $n=50$  total,  $n/\text{grupo}=10$ ) com 12 semanas de idade foram divididos em cinco grupos de acordo com o tipo de dieta que receberam: Controle (Standard chow, SC, 10% de lipídio na dieta, sendo a densidade energética de 3,8 kcal/g), ou High-Fat (60% de lipídio na dieta, sendo a densidade energética de 5,4 kcal/g) contendo banha de porco (lard, HF-L), óleo de oliva (olive oil, HF-O), óleo de girassol (sunflower oil, HF-S) ou óleo de canola (canola oil, HF-Ca). As dietas foram produzidas pela PragSolucoes (PragSolucoes, Jau, SP, Brasil, [www.prag solucoes.com.br](http://www.prag solucoes.com.br)), de acordo com as preconizações da AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993). As dietas experimentais foram oferecidas aos animais por 10 semanas. Uma descrição detalhada das dietas experimentais é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição das dietas experimentais.

Ingredientes (g/Kg)	Grupos				
	C	HF-L	HF-O	HF-S	HF-Ca
Caseína ( $\geq$ 85% proteína)	140,0	190,0	190,0	190,0	190,0
Amido de Milho	620,692	250,692	250,692	250,692	250,692
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Banha de porco	-	320,0	-	-	-
Óleo de oliva	-	-	320,0	-	-
Óleo de girassol	-	-	-	320,0	-
Óleo de canola	-	-	-	-	320,0
Fibra	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Mix vitamina*	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Mix mineral**	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
Total (g)	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Energia (kcal/g)	3807	5407	5407	5407	5407
Carboidrato (%)	76	26	26	26	26
Proteína (%)	14	14	14	14	14
Lipídio (%)	10	60	60	60	60

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola. \*Vitaminas e \*\*Minerais presentes no mix estão de acordo com a AIN93M.

### 3.2 Massa corporal, ingestão alimentar e eficiência alimentar

Os animais tiveram livre acesso à água e à comida durante todo o experimento. O consumo era controlado diariamente através da verificação do resto-ingestão, onde era mensurada a ração restante na gaiola e subtraído da ração oferecida no dia anterior. Essa ração era descartada e uma nova quantidade previamente mensurada era ofertada aos animais. Esse procedimento era realizado sempre no mesmo horário e pelo mesmo avaliador. Além disso, semanalmente, a massa corporal dos animais era aferida em balança de precisão. Calculamos a ingestão energética dos animais através da multiplicação do consumo em gramas pela densidade energética da dieta.

Em posse desses dados, pode-se determinar a eficiência alimentar (EA) dos animais. Essa relação foi calculada pela razão entre ganho de massa corporal e ingestão energética em kilojoule (kJ) multiplicado por 100; o resultado é fornecido em percentual (%).

### 3.3 Análise sérica

Dois testes foram realizados para avaliar o metabolismo de carboidratos dos animais. O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e o teste intraperitoneal de tolerância a insulina (TITI) foram realizados em dois momentos, antes do início do experimento, ou seja, antes dos animais receberem as dietas experimentais e nove semanas após o início da dieta.

Para o TOTG os animais foram mantidos em jejum por seis horas, feito uma pequena incisão na cauda do animal e medido a glicose sérica com auxílio de um glicosímetro (glicosímetro Accu-check performa, Roche, Mannheim, Alemanha). Após isso, os animais foram gavados com uma solução de glicose a 25% na dose de 1,0g/Kg através da introdução de uma cânula orogástrica e todo o volume introduzido na cavidade gástrica, sem que houvesse perda de líquido. Posterior a esse procedimento, transpassados 15, 30, 60 e 120 minutos, a cauda dos animais foi ordenhada para obtenção de novas amostras de sangue e medições de glicose.

Para o TITI os animais foram os mesmos que realizaram o TOTG, porém com um intervalo de dois dias para que houvesse a recuperação volêmica. Os animais foram



mantidos em jejum de quatro horas e depois a glicose sérica foi aferida através do procedimento supracitado. Posterior a medição, foi administrada insulina na dose de 1,0UI/Kg intraperitonealmente e foram realizadas medições subsequentes nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos.

Para ambos os testes os resultados geraram curvas glicêmicas que foram avaliadas posteriormente através de um gráfico com medição da área sob a curva.

Na véspera da eutanásia, os animais ficaram em jejum por seis horas e no dia, foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico na dose de 150mg/kg de peso. Uma incisão mediana na região torácica foi realizada e o coração exposto. O sangue foi coletado através de punção cardíaca no átrio direito, sendo cuidadosamente aspirado para não ocorrer hemólise. O sangue foi armazenado em tubos de ensaio para posterior centrifugação. O plasma foi obtido através da centrifugação (120 g/15 minutos) em temperatura ambiente e amostras foram imediatamente armazenadas a temperatura de -20° C.

Para determinação da leptina, resistina, IL-6, MCP-1, PAI-1, TNF $\alpha$  e insulina foi utilizado o kit MADPK-71K (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA), já para a determinação da adiponectina, foi utilizado o kit mouse, EZMADP-60K (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA)..

O índice HOMA-IR foi calculado através do produto da glicose sérica (mmol/L) pela insulina sérica ( $\mu$ U/mL) e dividida por 22,5 (Matthews *et al.*, 1985).

### **3.4 Tecido adiposo**

O tecido adiposo subcutâneo localizado entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da região femoral foi considerado como gordura inguinal, enquanto que a gordura relacionada com a parede abdominal posterior na proximidade dos rins e com a parte abdominal dos ureteres foi considerada a gordura retroperitoneal. A gordura abdominal, localizada na parte inferior do abdome e correlacionada com o epidídimo foi considerada a gordura epididimal. Portanto, após os animais serem sacrificados, o tecido adiposo inguinal (subcutânea), do epidídimo e retroperitoneal foram cuidadosamente dissecados (ambos os lados do animal) e pesados.

O tecido adiposo inguinal e epididimal foram posteriormente fixados em formalina 4% (pH=7,2) por 48 horas e subsequentemente impregnados com Paraplast plus

(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), cortados em fatias de 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina para posterior análise digital. De cada animal, foram obtidas 20 imagens e 500 adipócitos foram analisados. As imagens foram obtidas através do sistema digital (Microscópio BX51, x100 objetiva planacromática, câmera DP71, Olympus Co, Tokio, Japão). As imagens foram obtidas no formato TIFF, 36-bit e resolução de 1280x1024 pixels. O diâmetro dos adipócitos foi mensurado utilizando o software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA). Para cada adipócito, o maior e o menor diâmetro foram medidos considerando o ponto médio e as duas medidas foram analisadas.

Também foi calculado o índice de adiposidade (IA) dos animais, obtido pela soma da quantidade de tecido adiposo visceral e a quantidade de tecido adiposo subcutâneo, multiplicado por 100 e dividido pela massa corporal do animal conforme ilustrado na fórmula abaixo (Neyrinck *et al.*, 2009):

$$IA = \frac{[\text{Visceral (g) + Subcutâneo (g)}] \times 100}{\text{Massa corporal (g)}}$$

### 3.5 Tecido hepático

No dia do sacrifício, o fígado foi cuidadosamente dissecado e seu volume determinado através do deslocamento de líquido (*Princípio de Arquimedes*, método de Scherle) (Scherle, 1970).

Depois, o fígado foi seccionado e frações de 50mg de cada lobo do fígado foram armazenadas a -80°C para subseqüentes análises. Além disso, uma porção de aproximadamente um cm<sup>3</sup> foi incluída em OCT (Optimal Cutting Tissue) (Tóquio, Japão) utilizando um molde de alumínio e imediatamente armazenada a temperatura de -20°C. Após 24 horas os moldes foram transferidos para o freezer com temperatura -80°C. Cortes de 10µm foram obtidos com Criostato SLEE Mainz MEV (Alemanha), fixados em formalina 4% (pH 7,2) gelada, e mantidos em temperatura ambiente por 60 minutos. Uma solução de propileno glicol 100% foi colocada sobre os cortes por três minutos, posteriormente foram corados com Oil Red pré-aquecido

(60°C) e mantidos em estufa a 60°C por oito minutos. Após este período, os cortes foram diferenciados com propileno glicol 85% por dois minutos e posteriormente as laminas foram montadas com glicerina.

Após um período de 24 horas, 10 imagens não consecutivas por animal foram fotografadas com sistema digital (Microscópio BX51, x100 objetiva planacromática, câmera DP71, Olympus Co, Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas no formato TIFF, 36-bit e resolução de 1280x1024 pixels.

As imagens foram analisadas utilizando o software Image Pro Plus, versão 7,01 para Windows (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). As vesículas de lipídios foram identificadas, posteriormente a imagem foi segmentada em preto e branco, sendo as vesículas coradas em branco e o restante do fígado em preto. Foi calculado o percentual de área ocupado pela cor branca identificando assim a área da esteatose (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2010).

### 3.5.1 Dosagem dos triglicérides hepático

Um fragmento de 50mg foi separado no dia do sacrifício e armazenado a -80°C. Para análise, foi adicionado 1ml de álcool isopropílico ao fragmento, que foi macerado e homogeneizado e posteriormente, colocado no desruptor de células ultrassônico (modelo LB-130PB, Labometric, Miami, Flórida) por oito minutos. Depois foi centrifugado a 5980rpm por 10 minutos em uma centrifuga refrigerada (CT 15000R, Cientec, Piracicaba, Brasil) a 4°C. Após esse procedimento, 5µl do sobrenadante foram pipetados e quantificados no espectrofotômetro (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

## **3.6 Análise dos dados**

Os dados foram avaliados primeiramente para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias. Em seguida, foi feito o teste de análise de variância com um fator e pós-teste de Tukey. O teste de correlação de Pearson foi realizado para investigar correlações entre o índice de adiposidade e as adipocinas séricas (leptina, resistina e adiponectina). As diferenças intragrupos em função do tempo

foram analisadas utilizando o teste-*t* pareado. Para todas as análises utilizou-se o software GraphPad Prism versão 5,03 (La Jolla, CA, USA). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ingestão alimentar e eficiência alimentar

A ingestão alimentar não foi diferente entre os grupos. Entretanto a eficiência alimentar dos animais que receberam dieta HF com banha de porco (grupo HF-L) foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos (+64%,  $P<0,01$ ). Entre os demais grupos não houve diferença estatística. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros dietéticos dos grupos estudados.

Parâmetros	Grupos				
	C	HF-L	HF-O	HF-S	HF-Ca
Ingestão alimentar (g)	2,7±0,3	2,8±0,1	3,0±0,2	3,1±0,1	3,1±0,2
Eficiência alimentar g/Kcal ( $\times 10^3$ )	5,5±1,0	9,0±1,3 <sup>a</sup>	5,3±1,1 <sup>b</sup>	4,3±1,1 <sup>b</sup>	5,4±1,1 <sup>b</sup>

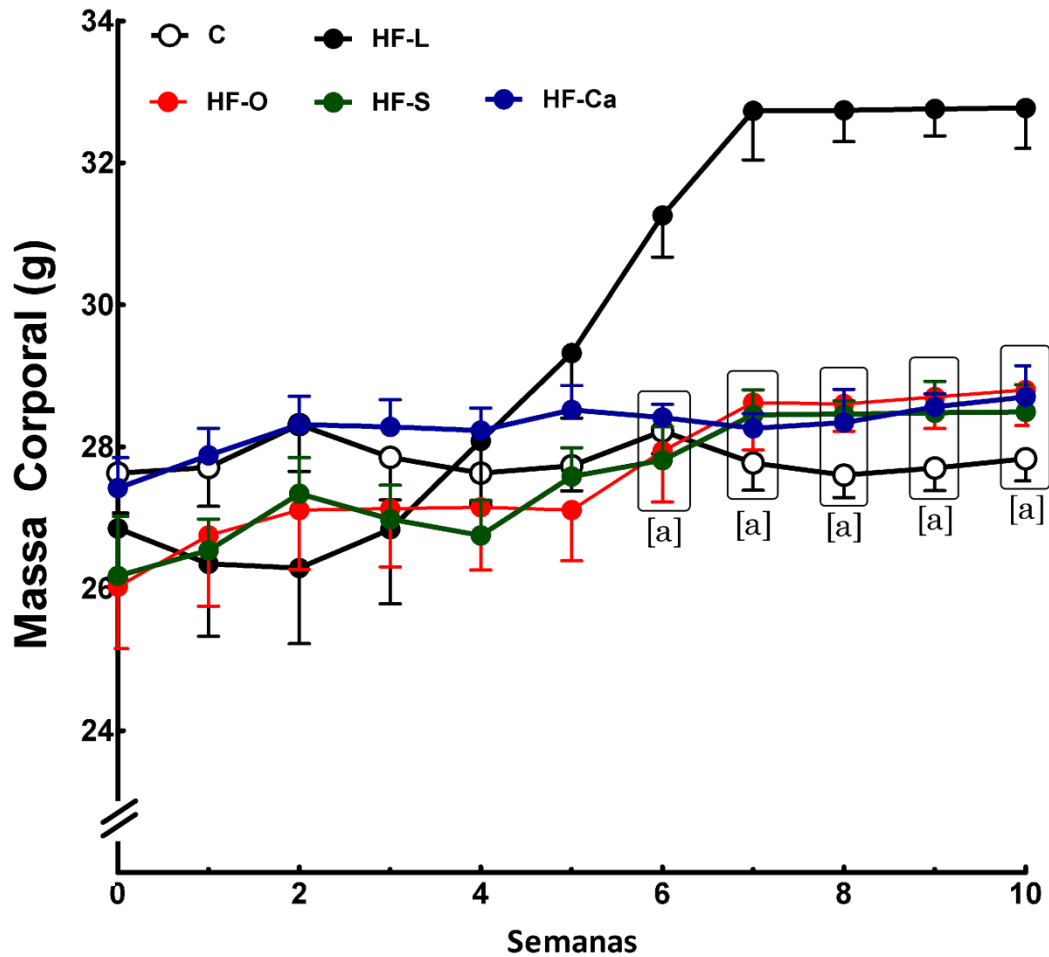
**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola. Os dados são apresentados em média±erro padrão.

Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L.

### 4.2 Massa corporal

Todos os animais iniciaram o experimento com a massa corporal similar. Os animais que receberam a dieta hiperlipídica com banha de porco (grupo HF-L) apresentaram maior ganho de peso a partir da 6<sup>a</sup> semana e, esta diferença manteve-se até o final do experimento. A massa corporal dos animais HF-L foi 18% maior do que o grupo C ( $P<0,001$ ) e 15% maior do que demais grupos (HF-O, HF-S e HF-Ca) ( $P<0,001$ ).

A Figura 4 ilustra a evolução da massa corporal dos animais estudados.



**Figura 4:** Evolução da massa corporal dos animais estudados.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola. Os dados são apresentados em média±erro padrão. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P < 0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo HF-L.

### 4.3 Metabolismo de carboidratos

Antes do fornecimento das dietas experimentais, tanto o TOTG quanto o TITI não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. No final do experimento, a glicose sérica e a curva do TITI não foram alteradas, mas a insulina sérica apresentou valores significativamente elevados nos grupos HF-L e HF-O quando comparados ao grupo C. O grupo HF-L apresentou aumento de 225% e o grupo HF-O aumento de 156% em comparação ao grupo C ( $P<0,0001$ ). Além disso, nos grupos HF-L e HF-O o índice HOMA-IR também estava aumentado, evidenciando um quadro de resistência à insulina. No grupo HF-L, o índice HOMA-IR teve um aumento de 309% e no grupo HF-O, houve um aumento de 209% em relação ao grupo C ( $P<0,0001$ ). Os grupos HF-S e HF-Ca apresentaram valores levemente alterados tanto para insulina sérica quanto para índice HOMA-IR, porém sem diferença estatística quando comparados com o grupo controle (Tabela 4).

**Tabela 4.** Metabolismo de carboidratos durante o experimento.

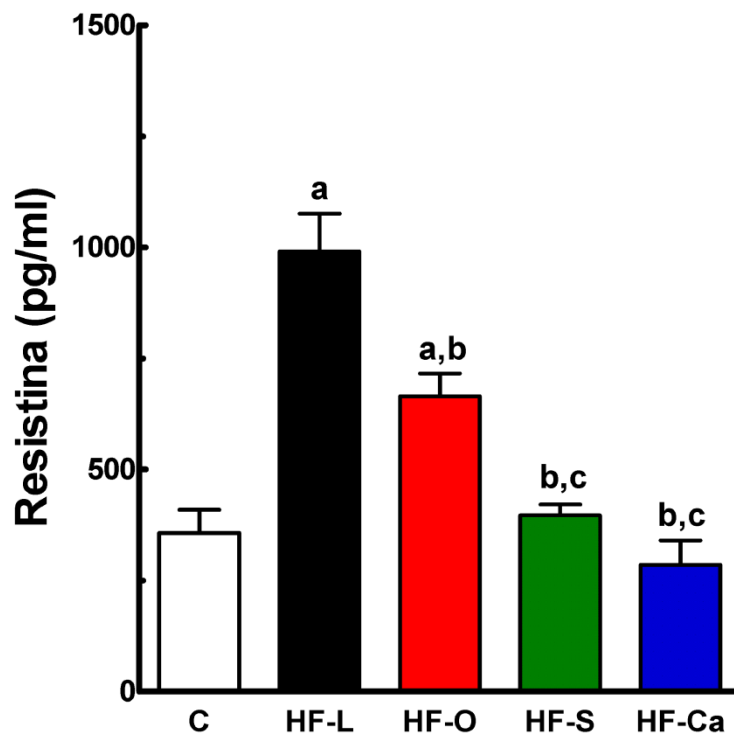
Parâmetros	Grupos				
	C	HF-L	HF-O	HF-S	HF-Ca
Glicose Basal, mg/dL	132,0±8,5	158,2±9,8	153,4±9,2	127,4±2,3	129,4±4,3
TITI, a.s	11,1±0,5	12,1±0,9	14,0±1,5	11,9±2,0	13,3±1,2
Insulina, pg/ml	423,1±92,3	1376,0±135,1 <sup>a</sup>	1082,0±69,2 <sup>a</sup>	809,6±51,7 <sup>b</sup>	725,3±71,5 <sup>b</sup>
HOMA IR	3,3±0,6	13,5±2,0 <sup>a</sup>	10,2±1,0 <sup>a</sup>	6,3±0,4 <sup>b,c</sup>	5,8±0,7 <sup>b,c</sup>

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol; HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola e a.s, área sob a curva. Os dados são apresentados em média±erro padrão.

Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L e <sup>c</sup> quando comparado ao grupo HF-O

#### 4.4 Adipocinas

Corroborando com os resultados do metabolismo de carboidratos, os níveis de resistina acompanharam os resultados do HOMA-IR. A resistina sérica foi 177% maior no grupo HF-L e 86% maior no grupo HF-O quando comparados ao grupo C ( $P<0,0001$ ). Os valores de resistina também foram maiores nos grupos HF-L e HF-O quando comparados com os grupos HF-S e HF-Ca: 150% maior no grupo HF-L e 68% maior no grupo HF-O em relação ao grupo HF-S ( $P<0,0001$ ); 247% maior no grupo HF-L e 133% maior no grupo HF-O em relação ao grupo HF-Ca ( $P<0,0001$ ). Não houve diferença nos níveis séricos de resistina entre os grupos C, HF-S e HF-Ca (Figura 5).



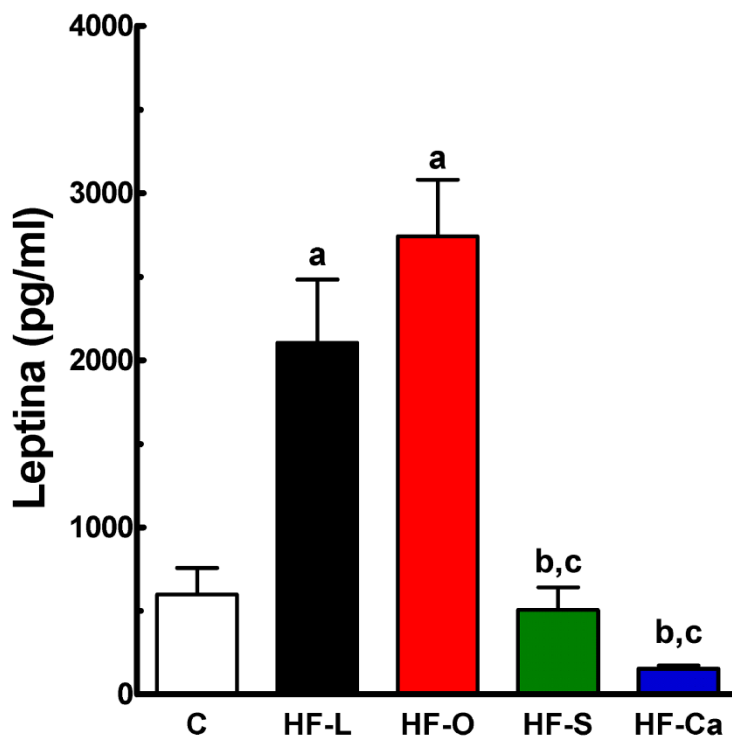
**Figura 5:** Efeito dos diferentes tipos de lipídios nos níveis séricos de resistina.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol; HF-Ca e grupo hiperlipídico com óleo de canola. Os dados são apresentados em média±erro padrão. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L e <sup>c</sup> quando comparado ao grupo HF-O.

Com relação à leptina, os resultados foram semelhantes aos de resistina. Os grupos HF-L e HF-O apresentaram os maiores valores quando comparados aos



demaís grupos. Com relação ao grupo HF-L, o valor da leptina foi 252% maior do que no grupo C, 316% maior do que no grupo HF-S e 1.272% maior do que no grupo HF-Ca ( $P<0,0001$ ). Já em relação ao grupo HF-O, o valor da leptina foi 358% maior do que no grupo C, 442% maior do que no grupo HF-S e 1.687% maior do que no grupo HF-Ca ( $P<0,0001$ ) (Figura 6).

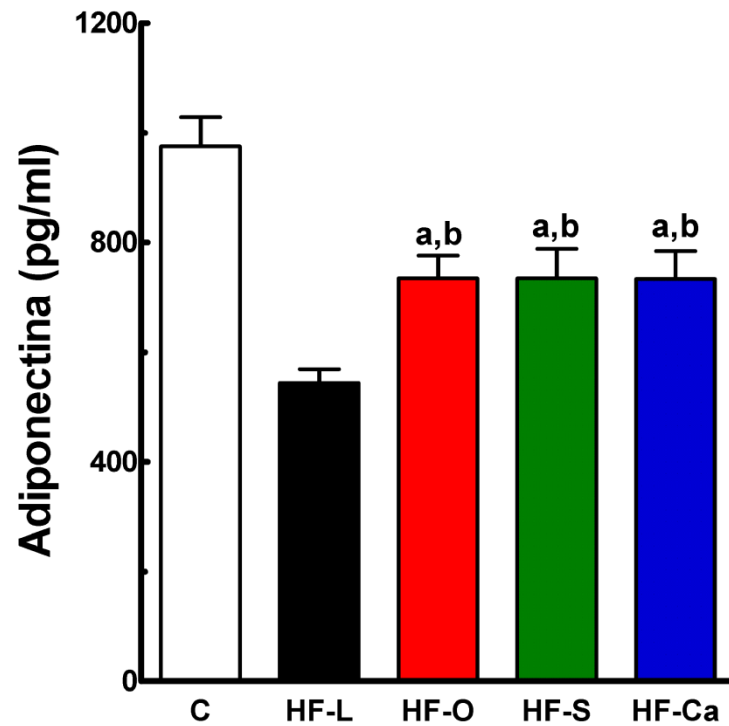


**Figura 6:** Efeito dos diferentes tipos de lipídios nos níveis séricos de leptina.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol; HF-Ca e grupo hiperlipídico com óleo de canola. Os dados são apresentados em média±erro padrão. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L e <sup>c</sup> quando comparado ao grupo HF-O.

Quando avaliamos a adiponectina, os resultados comportaram-se de forma diferente. Houve diminuição acentuada da concentração da adiponectina nos animais do grupo HF-L: a adiponectina foi 44% menor em comparação ao grupo C ( $P<0,001$ ) e 25% menor em comparação aos grupos HF-O, HF-S e HF-Ca ( $P<0,01$ ).

Não houve diferença estatística entre os animais dos grupos HF-O, HF-S e HF-Ca (Figura 7).



**Figura 7:** Efeito dos diferentes tipos de lipídios nos níveis séricos de adiponectina.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol; HF-Ca e grupo hiperlipídico com óleo de canola. Os dados são apresentados em média±erro padrão. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L e <sup>c</sup> quando comparado ao grupo HF-O.

#### 4.5 Citocinas inflamatórias

O valor de IL-6 foi significativamente maior no grupo HF-L em comparação aos demais grupos: 450% maior do que no grupo C ( $P<0,001$ ), 220% maior do que no grupo HF-O ( $P<0,01$ ), 193% maior do que no grupo HF-S ( $P<0,01$ ) e 126% maior do que no grupo HF-Ca ( $P<0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos C, HF-O, HF-S e HF-Ca.

As demais citocinas inflamatórias (PAI-1, MCP-1 e TNF $\alpha$ ) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores séricos das citocinas inflamatórias.

Parâmetros	Grupos				
	C	HF-L	HF-O	HF-S	HF-Ca
IL-6, pg/ml	3,2 $\pm$ 0,6	17,6 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	5,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	6,0 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	7,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
PAI-1, pg/ml	1706,0 $\pm$ 338,2	1688,0 $\pm$ 240,1	1474,0 $\pm$ 132,2	1700,0 $\pm$ 188,9	1366,0 $\pm$ 318,5
MCP-1, pg/ml	40,7 $\pm$ 7,8	42,8 $\pm$ 7,7	54,2 $\pm$ 5,9	50,2 $\pm$ 4,3	37,1 $\pm$ 7,1
TNF $\alpha$ , pg/ml	3,6 $\pm$ 0,8	3,9 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,1

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola. Os dados são apresentados em média $\pm$ erro padrão. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C e <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L.

#### 4.6 Tecido adiposo

O grupo HF-L apresentou maior quantidade de tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral. A quantidade de tecido adiposo subcutâneo no grupo HF-L foi 44% maior quando comparada aos grupos C e HF-S ( $P<0,001$ ), 160% maior quando comparada ao grupo HF-O ( $P<0,001$ ) e 62% maior quando comparado ao grupo HF-Ca ( $P<0,001$ ). Por outro lado, o grupo HF-O apresentou redução significativa da quantidade de tecido adiposo subcutâneo quando comparado aos

grupos HF-S e HF-Ca. Essa redução foi de 44% quando comparado com o grupo HF-S ( $P<0,05$ ) e 37% quando comparado ao grupo HF-Ca ( $P<0,05$ ).

Em relação à quantidade de tecido adiposo visceral, o grupo HF-L também apresentou aumento significativo deste parâmetro: +77% em relação ao grupo C ( $P<0,001$ ), +151% do que o grupo HF-O ( $P<0,001$ ), +171% do que o grupo HF-S ( $P<0,001$ ) e +133% do que o grupo HF-Ca ( $P<0,001$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C, HF-S e HF-Ca.

Também avaliamos a relação entre tecido adiposo visceral (Vis) e tecido adiposo subcutâneo (Sub) (Vis:Sub) dos animais dos grupos estudados. A relação Vis:Sub dos animais dos grupos HF-L e HF-O foram semelhantes e apresentou um aumento de 40% ( $P<0,001$ ) quando comparado aos grupos C, HF-S e HF-Ca.

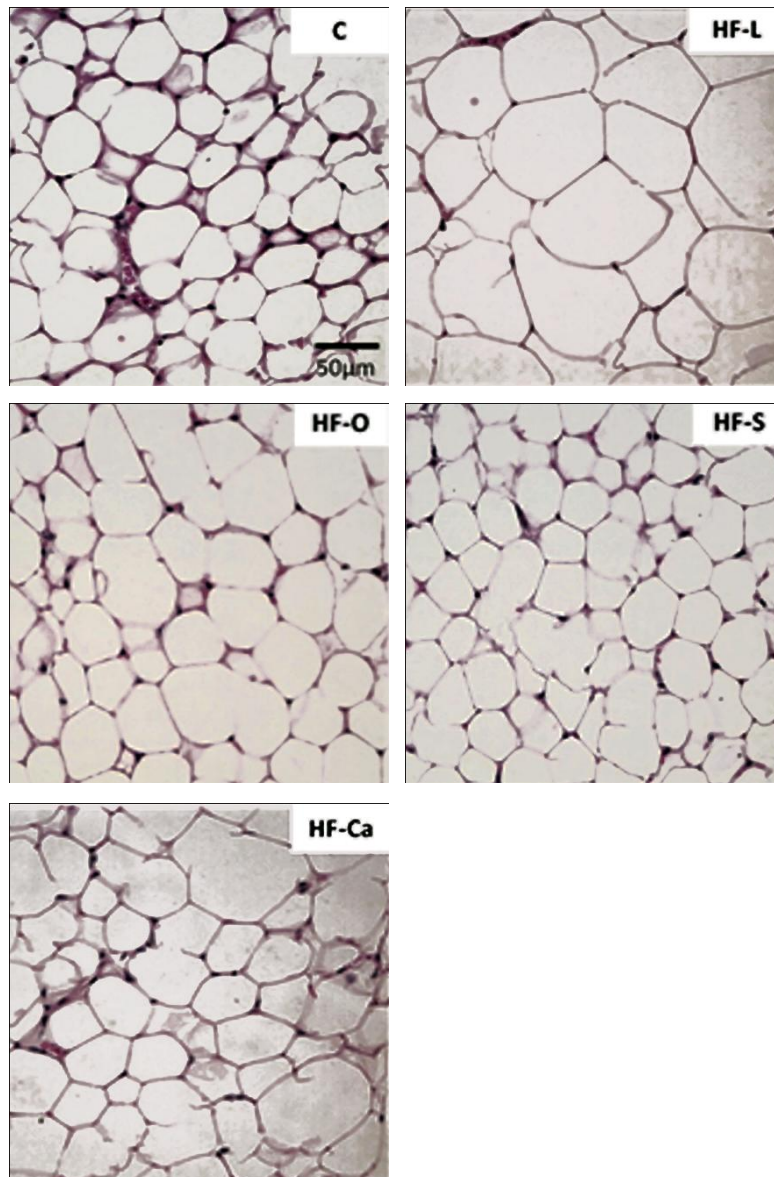
No que diz respeito aos adipócitos, observamos que houve aumento significativo dos diâmetros dos adipócitos nos animais do grupo HF-L, tanto na gordura epididimal como na gordura inguinal. Em relação à gordura epididimal, houve um aumento de 30% no grupo HF-L quando comparado aos grupos C, HF-O, HF-S e HF-Ca ( $P<0,05$ ). E em relação à gordura inguinal, houve um aumento de 60% no grupo HF-L quando comparado aos grupos C, HF-O, HF-S e HF-Ca ( $P<0,05$ ). Os dados do tecido adiposo estão mostrados na Tabela 6 e Figura 8.

**Tabela 6.** Morfologia do tecido adiposo.

Parâmetros	Grupos				
	C	HF-L	HF-O	HF-S	HF-Ca
Subcutâneo, g	0,09±0,01	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,05±0,01 <sup>a,b</sup>	0,09±0,0 <sup>b,c</sup>	0,08±0,0 <sup>b,c</sup>
Visceral, g	0,75±0,03	1,33±0,13 <sup>a</sup>	0,53±0,05 <sup>b</sup>	0,49±0,03 <sup>b</sup>	0,57±0,05 <sup>b</sup>
Vis:Sub	8,33±0,01	10,23±0,01 <sup>a</sup>	10,60±0,02 <sup>a</sup>	5,44±0,01 <sup>b,c</sup>	7,13±0,01 <sup>b,c</sup>
Diametro					
epididimal, µm	57,4± 4,3	79,2±4,8 <sup>a</sup>	59,0±3,5 <sup>b</sup>	59,5±3,2 <sup>b</sup>	56,0±2,7 <sup>b</sup>
inguinal, µm	60,3±4,4	95,8±5,0 <sup>a</sup>	58,3±2,7 <sup>b</sup>	60,3±2,5 <sup>b</sup>	57,7±3,0 <sup>b</sup>

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol, HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola e Vis:Sub, relação entre a massa adiposa visceral sob a massa adiposa subcutânea. Os dados são apresentados em média±erro padrão.

Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P<0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C e <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L.



**Figura 8.** Diâmetro dos adipócitos epididimais.

Fotomicrografias coradas em Hematoxilina & Eosina, aumento de 40x. Observa-se na figura HF-L um aumento no diâmetro dos adipócitos, o que não é visualizado nas demais fotomicrografias.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola.

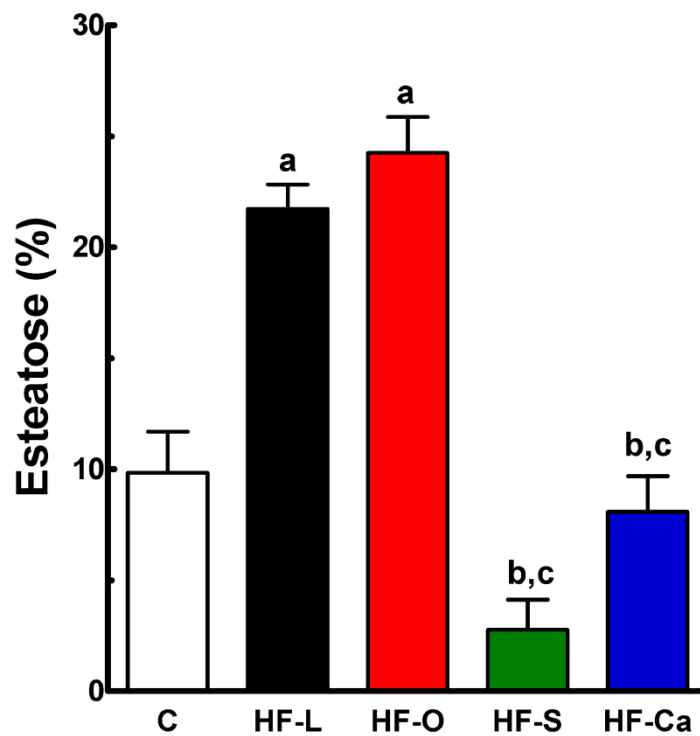
#### 4.7 Correlação entre adipocinas, tecido adiposo e índice de adiposidade

Houve correlação positiva e significativa entre a resistina sérica e a massa do tecido adiposo visceral ( $R = 0,72$ ,  $P < 0,00005$ ) e entre a resistina sérica e o índice de adiposidade ( $R = 0,72$ ,  $P < 0,00006$ ).

Um dado interessante é que os níveis de leptina e adiponectina não se correlacionaram com a massa adiposa corporal, seja visceral ou subcutânea e tampouco com o índice de adiposidade, sugerindo talvez que a resistência seja mais influenciada pela quantidade de tecido adiposo do que as demais adipocinas.

#### 4.8 Tecido hepático

Com relação à presença de esteatose hepática, os grupos HF-L e HF-O apresentaram as maiores quantidades de lipídios no fígado. Em relação ao grupo HF-L, a quantidade de esteatose foi 155% maior do que no grupo C ( $P < 0,0001$ ), 289% maior do que no grupo HF-S ( $P < 0,0001$ ) e 228% maior do que no grupo HF-Ca ( $P < 0,0001$ ). Já em relação ao grupo HF-O, a quantidade de esteatose foi 163% maior do que no grupo C ( $P < 0,0001$ ), 302% maior do que no grupo HF-S ( $P < 0,0001$ ) e 238% maior do que no grupo HF-Ca ( $P < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos C, HF-S e HF-Ca. Estes dados estão ilustrados na Figura 9.

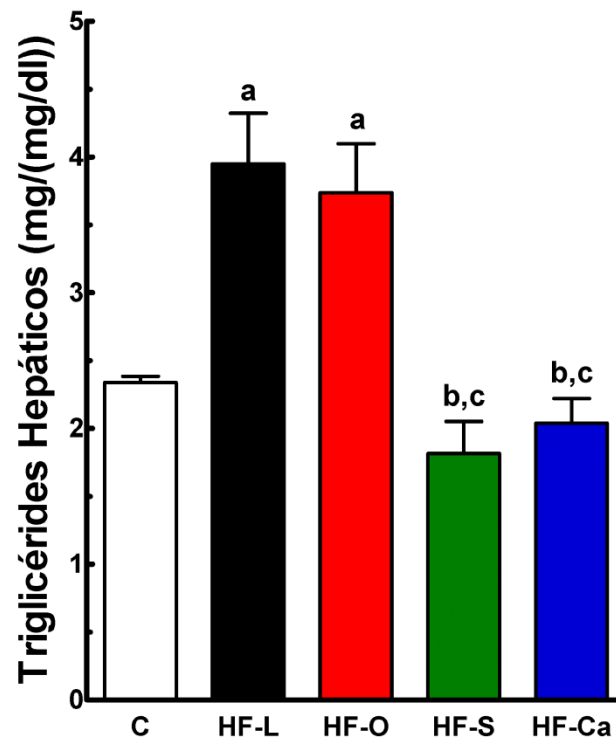


**Figura 9.** Percentual de esteatose hepática nos grupos estudados.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P < 0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L e <sup>c</sup> quando comparado ao grupo HF-O.

Corroborando com os dados supracitados, os triglicérides hepáticos dos grupos HF-L e HF-O também foram os maiores quando comparados com os demais grupos. O grupo HF-L apresentou aumento de 69% quando comparado ao grupo C ( $P < 0,0001$ ), aumento de 117% quando comparado ao grupo HF-S ( $P < 0,0001$ ) e aumento de 94% quando comparado ao grupo HF-Ca ( $P < 0,0001$ ). O grupo HF-O também apresentou aumento de triglicérides hepáticos: +60% quando comparado ao grupo C ( $P < 0,0001$ ), +106% quando comparado ao grupo HF-S ( $P < 0,0001$ ) e +83% em comparação ao grupo HF-Ca ( $P < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos C, HF-S e HF-Ca (Figura 10).





**Figura 10.** Triglicérides hepático nos grupos estudados.

**Abreviações:** C, grupo controle; HF-L, grupo hiperlipídico com banha de porco; HF-O, grupo hiperlipídico com óleo de oliva; HF-S, grupo hiperlipídico com óleo de girassol e HF-Ca, grupo hiperlipídico com óleo de canola. Diferenças estatísticas são representadas pelas letras ( $P < 0,05$ ): <sup>a</sup> quando comparado ao grupo C; <sup>b</sup> quando comparado ao grupo HF-L e <sup>c</sup> quando comparado ao grupo HF-O.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a dieta rica em gordura saturada (com banha de porco, grupo HF-L) e a dieta rica em ácido graxo monoinsaturado (com óleo de oliva, grupo HF-O) favoreceram o desenvolvimento da resistência à insulina, aumento do nível de adipocinas inflamatórias e diminuição da relação gordura subcutânea: gordura visceral, independentemente da quantidade total da massa corporal dos animais. Por outro lado, as dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (no caso, óleo de girassol, grupo HF-S e óleo de canola, grupo HF-Ca) não favorecem os parâmetros envolvidos na gênese da obesidade e resistência à insulina.

A dieta hiperlipídica é capaz de induzir hiperglicemia e resistência à insulina em camundongos (Fraulob *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010), e este é um modelo muito utilizado para induzir estudo obesidade e síndrome metabólica em animais (Oakes *et al.*, 1997; Buettner *et al.*, 2006; Gallou-Kabani *et al.*, 2007).

Normalmente, na literatura, as dietas ricas em gordura são agrupadas como hiperlipídica, mas não diferenciam o tipo de lipídio que compõem as mesmas. A maioria dos estudos que usam dietas hiperlipídicas, não especificam a fonte dos lipídios e fica difícil fazer comparações, pois são poucos os estudos que identificam as fontes dos lipídios usados nas dietas e suas conseqüências.

Geralmente, dietas com alto teor de ácidos graxos saturados (banha de porco) induzem obesidade, alterações no metabolismo de carboidratos e favorecem um estado pró-inflamatório em roedores. Já dietas contendo ácidos graxos poli-insaturados (origem vegetal, como óleo de girassol ou origem animal como óleo de peixe) exercem efeitos benéficos na massa corporal e no metabolismo de carboidratos (Storlien *et al.*, 1996). O papel dos ácidos graxos monoinsaturados (óleo de oliva) não está muito claro. No presente estudo, apenas os animais alimentados com dietas ricas em banha de porco apresentaram aumento na massa corporal e nos níveis séricos de IL-6.

A deposição ectópica de lipídio e o processo inflamatório em órgãos como fígado, músculo e pâncreas desempenham papel no desenvolvimento da resistência à insulina (Iozzo, 2009). Esta deposição ectópica induzindo o surgimento da resistência à insulina foi demonstrada quando dietas ricas em banha de porco foram utilizadas em trabalhos experimentais (Fernandes-Santos *et al.*, 2009; Fraulob *et al.*,

2010; Nascimento *et al.*, 2010). No presente estudo, tanto os animais que foram alimentados com banha de porco assim como os animais alimentados com óleo de oliva apresentaram um quadro de resistência à insulina evidenciada pelo aumento da insulina sérica e aumento no índice HOMA-IR. Corroborando com os nossos dados, um estudo realizado em 2006, também evidenciou que não só os animais alimentados com dietas ricas em banha de porco apresentaram o quadro de resistência à insulina, assim como os animais alimentados com dieta rica em óleo de oliva. (Buettner *et al.*, 2006).

Outros pontos importantes são em relação à quantidade de tecido adiposo, a distribuição e localização do mesmo tanto em humanos quanto em roedores. O aumento de tecido adiposo visceral está correlacionado com doenças metabólicas em humanos (Klein, 2004). Um estudo publicado em 2010 utilizando 3093 participantes (sendo 48% mulheres e 52% homens) sem diabetes mellitus e com IMC médio de 27,6Kg/m<sup>2</sup> avaliou a relação entre a resistência a insulina (avaliado pelo teste HOMA-IR) e os depósitos de gordura visceral e subcutâneo (avaliado através de tomografia computadorizada). Este estudo evidenciou que a gordura visceral influencia mais o desenvolvimento da resistência à insulina do que a gordura subcutânea (Preis *et al.*, 2010).

Além disso, a relação entre a quantidade de tecido adiposo visceral e de tecido adiposo subcutâneo deve sempre ser considerada. Uma relação entre a gordura visceral *versus* gordura subcutânea (Vis:Sub) aumentada indica que existe uma quantidade maior de tecido adiposo visceral com relação ao tecido adiposo subcutâneo e com isso, maiores serão as consequências metabólicas para os animais.

Um estudo realizado em 2006 com camundongos C56Bl/6 e alimentados com dieta hiperlipídica com banha de porco (com 60% da energia proveniente dos lipídios), mostrou que os animais apresentaram aumento da relação Vis:Sub. Os autores também observaram elevação dos níveis de insulina, glicose, triglicérides e resistina séricos, redução na adiponectina e acúmulo de aumento de triglicérides no fígado e no músculo esquelético (Araki *et al.*, 2006). Mais recentemente, trabalhos de nosso laboratório, também evidenciaram que animais alimentados com dietas ricas em banha de porco (com 60% de lipídios) apresentaram aumento da relação Vis:Sub, além de resistência à insulina e esteatose hepática (Souza-Mello *et al.*, 2010).

No nosso estudo, demonstramos que a fonte de lipídios afeta significativamente os locais de depósito do tecido adiposo. Os animais que receberam dieta com banha de porco (rica em ácido graxo saturado) apresentaram aumento em ambas às reservas adiposas, porém com um maior acúmulo na região visceral. Já os animais que receberam dieta com óleo de oliva (rica em ácido graxo monoinsaturado) apresentaram uma redução na reserva subcutânea e não alteraram a reserva visceral. Entretanto quando avaliamos a relação Vis:Sub ambos os grupos (HF-L e HF-O) apresentaram aumento nesta relação, independentemente do aumento da quantidade do tecido adiposo visceral. A distribuição de tecido adiposo corporal pode ser um fator mais importante do que a quantidade total de gordura no que diz respeito ao desenvolvimento de alterações metabólicas. Os animais do grupo HF-O não evoluíram com aumento de peso, mas apresentaram alterações metabólicas semelhantes às dos animais do grupo HF-L. Entretanto, Buettner e colaboradores evidenciaram que animais alimentados por 12 semanas com dietas ricas em banha de porco ou óleo de oliva, apresentam aumento similar da massa corporal, resultado que difere do nosso estudo, contudo, o trabalho citado não avaliou a distribuição do tecido adiposo (Buettner *et al.*, 2006).

Com relação às adipocinas, a resistina parece ser a que mais influencia o desenvolvimento da resistência à insulina (Steppan *et al.*, 2001), uma vez que em animais knockout para resistina ocorre uma melhora da tolerância à glicose e aumento da sensibilidade à insulina em períodos de jejum e com baixos níveis de glicose (Banerjee *et al.*, 2004).

Parece que não são apenas os lipídios que alteram a secreção da resistina, mas também a quantidade e o tipo e carboidratos. Um grupo holandês trabalhou com camundongos C56BL/6 alimentados com dieta rica em banha de porco (30% da energia proveniente dos lipídios) associado a dois diferentes tipos de carboidratos. Um grupo tinha como fonte carboidrato de alto índice glicêmico e outro grupo de baixo índice glicêmico. Os animais foram alimentados por 13 semanas. Os animais alimentados com dieta de alto índice glicêmico apresentaram aumento na massa corporal, resistina e insulina séricas e do índice HOMA-IR. Contudo, os autores observaram que os animais que receberam dieta rica em carboidratos de baixo índice glicêmico, não apresentaram alteração na massa corporal nem no metabolismo de carboidratos (van Schothorst *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010a).

Mais recentemente, outro estudo comparou camundongos (C57BL/6) alimentados com dieta rica em banha de porco (45% da energia proveniente dos lipídios) e alimentados com dieta rica em carboidrato (70% da energia proveniente dos carboidratos). As dietas foram fornecidas durante 12 semanas. Os resultados mostraram que o lipídio dietético influenciou mais o aumento da massa corporal e dos triglicérides hepáticos, além de favorecer o desenvolvimento na resistência à insulina (avaliada pelo HOMA-IR) e o aumento da resistina sérica do que a dieta rica em carboidratos (van Schothorst et al., 2009; Lee et al., 2010a).

No nosso estudo, os animais dos grupos HF-L e HF-O, que receberam dieta com banha de porco e os animais que receberam dieta com óleo de oliva, apresentaram aumento acentuado dos níveis séricos de resistina. Além disso, houve correlação entre os níveis de resistina e o índice de adiposidade, assim como entre os níveis de resistina e a quantidade de tecido adiposo visceral. Estes dados nos mostraram que a ingestão de banha de porco e óleo de oliva influenciou de modo decisivo, o compartimento de gordura visceral e a resistência à insulina.

Outra importante adipocina que participa da gênese das alterações metabólicas é a leptina. Sua ação está relacionada com a ingestão alimentar e a taxa metabólica basal (Galic *et al.*, 2010). Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica por 19 semanas e foram divididos durante o experimento nas semanas 1, 8 e 19. Na primeira semana receberam injeção intraperitoneal de leptina. Na semana 8, metade dos animais recebeu injeção intraperitoneal de leptina e a outra metade recebeu injeção intracerebroventricular de leptina. E na última semana, os animais receberam duas doses diferentes de injeção intracerebroventricular de leptina. Este estudo demonstrou que o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL/6 poderia ser dividido em três etapas: uma fase precoce de resposta à dieta hiperlipídica, já que alguns camundongos foram sensíveis à leptina exógena; uma fase reduzida da ingestão de alimentos quando os camundongos apresentaram um aumento na produção de leptina e ainda mantiveram a sensibilidade da leptina central, e por fim uma fase de aumento da ingestão alimentar, acompanhada por uma redução da sensibilidade a leptina central e concomitante resistência periférica a leptina (Lin *et al.*, 2000).

O consumo de banha de porco induz a resistência à leptina e o nosso trabalho também demonstrou isso. Os animais do grupo HF-L apresentaram níveis aumentados de leptina sérica caracterizando um estado de resistência a leptina.

Entretanto, pela primeira vez, foi demonstrado que uma dieta rica em óleo de oliva também é capaz de ocasionar resistência à leptina, com aumento significativo da leptina sérica.

Outra adipocina relevante no estudo da obesidade é a adiponectina. A adiponectina exerce um papel importante no metabolismo de carboidratos visto que a mesma melhora a sensibilidade à insulina tanto em modelos genéticos de obesidade quanto em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Gnacinska *et al.*, 2009). Um estudo com camundongos selvagens e camundongos deficientes em adiponectina, foram alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica (45% da energia proveniente de lipídios) a base de banha de porco. Nos camundongos selvagens, a dieta hiperlipídica provocou aumento da massa corporal e da quantidade de tecido adiposo corporal, elevou os níveis de insulina e leptina circulantes e reduziu a relação glicose/insulina. Por outro lado, os animais deficientes em adiponectina que receberam dieta hiperlipídica, não apresentaram ganho de massa corporal ou da massa adiposa e os níveis séricos de insulina, leptina e da relação glicose/insulina não foram alterados. Estes resultados sugerem que a indução do aumento da massa adiposa, leptina e da insulina séricas são dependente da adiponectina (Hecker *et al.*, 2010).

Um trabalho recente do nosso laboratório mostrou que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica à base de banha de porco (60% da energia proveniente de lipídios) apresentaram uma redução significativa dos níveis séricos de adiponectina (Souza-Mello *et al.*, 2010). Nosso atual estudo corrobora com esses dados, além disso, nossos resultados mostraram que a redução dos níveis de adiponectina não dependem só da quantidade de lipídio, mas também do tipo de lipídio ingerido na dieta. Por exemplo, os animais dos grupos HF-O, HF-S e HF-Ca que se alimentaram respectivamente com óleo de oliva, óleo de girassol e óleo de canola não apresentaram essa redução apesar de ingerirem dietas hiperlipídicas.

Além do tecido adiposo, outro órgão possui papel fundamental na gênese da resistência à insulina, o fígado. Um trabalho recente, onde camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica à base de banha de porco (60% da energia proveniente de lipídios) durante 16 semanas evidenciou-se presença acentuada de esteatose hepática em contraste com animais alimentados com dieta padrão (10% da energia proveniente de lipídios) (Fraulob *et al.*, 2010). Corroborando com os nossos dados, já foi demonstrado que dietas ricas em banha de porco e em

óleo de oliva provocaram esteatose hepática em ratos, mesmo com uma quantidade de menor de gordura na dieta (42% da energia proveniente de lipídios), porém fornecida durante mais tempo (10 semanas) (Buettner *et al.*, 2006). Além disso, esse mesmo grupo, assim como o nosso, também encontrou maior acúmulo de triglicérides hepáticos em animais alimentados com dieta hiperlipídica a base de banha de porco e óleo de oliva.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, estes resultados demonstram que o tipo de lipídio fornecido em na dieta hiperlipídica é mais importante que a quantidade total, especificamente quando considerado a massa corporal, a resistência à insulina, a remodelação do tecido adiposo, acúmulo de triglicérides hepáticos, presença de esteatose e secreção de adipocinas pró-inflamatórias. Nosso estudo mostrou que os animais que receberam dietas hiperlipídicas contendo com fonte lipídica o óleo de girassol e o óleo de canola (óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados), mesmo em excesso, não desenvolveram obesidade ou resistência à insulina. Além disso, é interessante notar que o consumo uma dieta hiperlipídica cuja fonte de lipídio foi o óleo de oliva (rico em ácido graxo monoinsaturado) provocou quase os mesmos efeitos deletérios que a dieta hiperlipídica com banha de porco (rica em ácido graxo saturado).



## REFERÊNCIAS

ABESO. 2009-2010. *Diretrizes Brasileira de Obesidade*. In. São Paulo: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica.

Aguila MB, Apfel MIR, Mandarin-de-Lacerda CA. Stereology of the myocardium and blood biochemistry in aged rats fed with a cholesterol-rich and canola oil diet (n-3 fatty acid rich). *Basic Res Cardiol* 1998; 93:182-191.

Aguila MB, Loureiro CC, Pinheiro Ada R, Mandarin-de-Lacerda CA. Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78:25-38.

Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Numerical density of cardiac myocytes in aged rats fed a cholesterol-rich diet and a canola oil diet (n-3 fatty acid rich). *Virchows Arch* 1999; 434:451-453.

\_\_\_\_\_. Effect of different high-fat diets on the myocardium stereology and blood pressure in rats. *Pathol Res Pract* 2000; 196:841-846.

\_\_\_\_\_. Blood pressure, ventricular volume and number of cardiomyocyte nuclei in rats fed for 12 months on diets differing in fat composition. *Mech Ageing Dev* 2001a; 122:77-88.

\_\_\_\_\_. Myocardial stereological adaptations in wistar rats fed with different high-fat diets during 18 months. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2001b; 47:387-393.

\_\_\_\_\_. Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats. *Food Chem Toxicol* 2003a; 41:1391-1397.

Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months. *Nutrition* 2003b; 19:347-352.

Aguila MB, Pinheiro AR, Mandarin-de-Lacerda CA. Spontaneously hypertensive rats left ventricular cardiomyocyte loss attenuation through different edible oils long-term intake. *Int J Cardiol* 2005; 100:461-466.

Aguila MB, Sa Silva SP, Pinheiro AR, Mandarin-de-Lacerda CA. Effects of long-term intake of edible oils on hypertension and myocardial and aortic remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2004; 22:921-929.

Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:413-437.

Al-Daghri N, Bartlett WA, Jones AF, Kumar S. Role of leptin in glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4:147-155.

Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999; 282:1530-1538.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-1231.

Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34:2-11.

Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension* 2006; 48:51-57.

Awad AB, Chattopadhyay JP. Effect of dietary saturated fatty acids on intracellular free fatty acids and kinetic properties of hormone-sensitive lipase of rat adipocytes. *J Nutr* 1986; 116:1095-1100.

Awad AB, Zepp EA. Alteration of rat adipose tissue lipolytic response to norepinephrine by dietary fatty acid manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 86:138-144.

Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, et al. Novel resistin promoter polymorphisms: association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 2004; 36:564-570.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, et al Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004; 303:1195-1198.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17:4-12.

Bedoui S, Velkoska E, Bozinovski S, Jones JE, Anderson GP, Morris MJ. Unaltered TNF-alpha production by macrophages and monocytes in diet-induced obesity in the rat. *J Inflamm (Lond)* 2005; 2:2.

Berndt J, Kloting N, Kralisch S, et al Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 2005; 54:2911-2916.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1998; 1:619-625.

Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23:57-63.

Bouchard C, Despres JP, Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev* 1993; 14:72-93.

Briaud I, Kelpel CL, Johnson LM, Tran PO, Poirier V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 2002; 51:662-668.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40:1387-1395.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2467-2474.

Bueno AA, Oyama LM, de Oliveira C, et al. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch* 2008; 455:701-709.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36:485-501.

Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15:798-808.

Buhman KK, Wang LC, Tang Y, et al. Inhibition of Hedgehog signaling protects adult mice from diet-induced weight gain. *J Nutr* 2004; 134:2979-2984.

Bulcao C, Ferreira SR, Giuffrida FM, Ribeiro-Filho FF. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2:19-28.

Byers T. Overweight and mortality among baby boomers--now we're getting personal. *N Engl J Med* 2006; 355:758-760.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11:183-190.

Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999; 341:1097-1105.

Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; 55:2688-2697.

Caro JF. Clinical review 26: Insulin resistance in obese and nonobese man. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:691-695.

Catta-Preta M, Oliveira DA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. *Life Sci* 2006; 80:219-229.

Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E1231-1238.

Chaput JP, Tremblay A. Obesity and physical inactivity: the relevance of reconsidering the notion of sedentariness. *Obes Facts* 2009; 2:249-254.

Chen CC, Wang WS, Chang HY, Liu JS, Chen YJ. Heterogeneity of body mass index, waist circumference, and waist-to-hip ratio in predicting obesity-related metabolic disorders for Taiwanese aged 35-64 y. *Clin Nutr* 2009; 28:543-548.

Chen MP, Chung FM, Chang DM, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:295-299.

Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, et al Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2002; 2:497-503.

Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36:403-409.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-295.

Cooke JP, Oka RK. Does leptin cause vascular disease? *Circulation* 2002; 106:1904-1905.

Curat CA, Wegner V, Sengenès C, et al Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006; 49:744-747.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25:4-7.

de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, et al Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 2007; 56:1655-1661.

Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33:138-144.  
Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316:104-108.

Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alaghband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet* 1995; 346:120-121.

Eriksson P, Van Harmelen V, Hoffstedt J, et al Regional variation in plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue from obese individuals. *Thromb Haemost* 2000; 83:545-548.

Estatística IBGE. 2004. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil*. . In: Estatística IBdGe, editor. Rio de Janeiro.

Evans EM, Rowe DA, Racette SB, Ross KM, McAuley E. Is the current BMI obesity classification appropriate for black and white postmenopausal women? *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:837-843.

Fabbrini E, Conte C, Magkos F. Methods for assessing intrahepatic fat content and steatosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12:474-481.

Fagerberg B, Kellis D, Bergstrom G, Behre CJ. Adiponectin in relation to insulin sensitivity and insulin secretion in the development of type 2 diabetes: a prospective study in 64-year-old women. *J Intern Med* 2010.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:911-919; quiz 920.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:S99-S112.

Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 2009; 25:818-827.

Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:296-306.

\_\_\_\_\_. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:952S-959S.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 2007; 298:2028-2037.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83:S192-203.

Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; 289:187-193.

Foster LJ, Klip A. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C877-890.

Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116:39-48.

Franzen LE, Ekstedt M, Kechagias S, Bodin L. Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Mod Pathol* 2005; 18:912-916.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver

and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212-223.

Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 2000; 130:3127S-3131S.

Friedman JM. The alphabet of weight control. *Nature* 1997; 385:119-120.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395:763-770.

Frystyk J, Berne C, Berglund L, Jensevik K, Flyvbjerg A, Zethelius B. Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:571-576.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307:426-430.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316:129-139.

Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15:1996-2005.

Ge F, Lobdell Ht, Zhou S, Hu C, Berk PD. Digital analysis of hepatic sections in mice accurately quantitates triglycerides and selected properties of lipid droplets. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235:1282-1286.

Glund S, Deshmukh A, Long YC, et al Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. *Diabetes* 2007; 56:1630-1637.

Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 2009; 54:150-157.

Goodpaster BH, Krishnaswami S, Resnick H, et al. Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care* 2003; 26:372-379.

Gorinstein S, Martin-Belloso O, Katrich E, et al. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J Nutr Biochem* 2003; 14:154-159.

Gregoire FM, Zhang Q, Smith SJ, et al. Diet-induced obesity and hepatic gene expression alterations in C57BL/6J and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E703-713.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203:495 e491-498.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal fish oil supplementation benefits programmed offspring from rat dams fed low-protein diet. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:82 e81-87.

Gu D, He J, Duan X, et al. Body weight and mortality among men and women in China. *JAMA* 2006; 295:776-783.

Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, et al.. Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. *PLoS One* 2008; 3:e3466.

Guiu B, Loffroy R, Hillon P, Petit JM. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for quantification of hepatic steatosis: urgent need for standardization! *J Hepatol* 2009; 51:1082-1083; author reply 1083-1084.

Gustafson LA, Kuipers F, Wiegman C, Sauerwein HP, Romijn JA, Meijer AJ. Clofibrate improves glucose tolerance in fat-fed rats but decreases hepatic glucose consumption capacity. *J Hepatol* 2002; 37:425-431.

Gustavsson C, Parini P, Ostojic J, et al. Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1578-1581.

Haluzik M, Gavriloova O, LeRoith D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha deficiency does not alter insulin sensitivity in mice maintained on regular or high-fat diet: hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies. *Endocrinology* 2004; 145:1662-1667.

Han TS, van Leer EM, Seidell JC, Lean ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. *BMJ* 1995; 311:1401-1405.

Harada K, Shen WJ, Patel S, et al.. Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E1182-1195.

Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 2004; 83:653-658.

Hecker PA, O'Shea KM, Galvao TF, Brown BH, Stanley WC. Role of Adiponectin in the Development of High Fat Diet-induced Metabolic Abnormalities in Mice. *Horm Metab Res* 2010.

Hida K, Wada J, Eguchi J, et al.. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:10610-10615.

- Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr* 2000; 130:284S-288S.
- Holness MJ, Greenwood GK, Smith ND, Sugden MC. Diabetogenic impact of long-chain omega-3 fatty acids on pancreatic beta-cell function and the regulation of endogenous glucose production. *Endocrinology* 2003; 144:3958-3968.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665-668.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.
- IBGE. 2010. *Pesquisa de Orçamentos Familiares - Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil*. In: Pesquisa Dd, editor. Rio de Janeiro. p 130.
- IDF. 2005. *The IDF consensus worldwide definition of the METABOLIC SYNDROME*. In. Brussels.
- lozzo P. Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care* 2009; 32 Suppl 2:S168-173.
- Jee SH, Sull JW, Park J, et al.. Body-mass index and mortality in Korean men and women. *N Engl J Med* 2006; 355:779-787.
- Jelenik T, Rossmeisl M, Kuda O, et al. AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 2 subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetes* 2010; 59:2737-2746.
- Jorgensen SB, Honeyman J, Oakhill JS, et al. Oligomeric resistin impairs insulin and AICAR-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle by inhibiting GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297:E57-66.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116:1784-1792.
- Kanaya AM, Harris T, Goodpaster BH, Tylavsky F, Cummings SR. Adipocytokines attenuate the association between visceral adiposity and diabetes in older adults. *Diabetes Care* 2004; 27:1375-1380.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2402-2410.



Katzmarzyk PT, Bray GA, Greenway FL, Johnson WD, Newton RL, Jr., Ravussin E, Ryan DH, Bouchard C. Ethnic-Specific BMI and Waist Circumference Thresholds. *Obesity (Silver Spring)* 2011.

Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32:1431-1437.

Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest* 2004; 113:1530-1532.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al.. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-1321.

Kloting N, Berndt J, Kralisch S, et al. Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339:430-436.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al.. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346:393-403.

Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest* 2001; 108:1533-1540.

Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 2005; 307:373-375.

Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocr J* 2010a; 57:39-50.

Lee JH, Bullen JW, Jr., Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E625-632.

Lee SS, Park SH, Kim HJ, et al.. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol* 2010b; 52:579-585.

Levene AP, Kudo H, Thursz MR, Anstee QM, Goldin RD. Is oil red-O staining and digital image analysis the gold standard for quantifying steatosis in the liver? *Hepatology* 2010; 51:1859; author reply 1859-1860.

Levy JR, Clore JN, Stevens W. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology* 2004; 39:608-616.

Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 2005; 6:13-21.

- Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:639-646.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, et al.. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360:57-58.
- Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis* 2010; 9:42.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998; 12:57-65.
- Lopez-Bermejo A, Chico-Julia B, Fernandez-Balsells M, et al.. Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes* 2006; 55:2871-2875.
- Manco M, Fernandez-Real JM, Valera-Mora ME, et al. Massive weight loss decreases corticosteroid-binding globulin levels and increases free cortisol in healthy obese patients: an adaptive phenomenon? *Diabetes Care* 2007; 30:1494-1500.
- Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611:211-225.
- Martin ML, Jensen MD. Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *J Clin Invest* 1991; 88:609-613.
- Masek J, Fabry P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia* 1959; 15:444-445.
- Matsuo T, Sumida H, Suzuki M. Beef tallow diet decreases beta-adrenergic receptor binding and lipolytic activities in different adipose tissues of rat. *Metabolism* 1995a; 44:1271-1277.
- Matsuo T, Sumida H, Suzuki M. Beef tallow diet decreases norepinephrine turnover rates in rat hypothalamus and cerebral cortex. *Metabolism* 1995b; 44:1377-1379.
- Matsuo T, Suzuki M. Beef tallow diet decreases lipoprotein lipase activities in brown adipose tissue, heart, and soleus muscle by reducing sympathetic activities in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1994; 40:569-581.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
- Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 1985; 26:194-202.

Mavri A, Alessi MC, Juhan-Vague I. Hypofibrinolysis in the insulin resistance syndrome: implication in cardiovascular diseases. *J Intern Med* 2004; 255:448-456.

McPherson R, Jones PH. The metabolic syndrome and type 2 diabetes: role of the adipocyte. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14:549-553.

Mennesson N, Dumortier J, Hervieu V, Milot L, Guillaud O, Scoazec JY, Pilleul F. Liver steatosis quantification using magnetic resonance imaging: a prospective comparative study with liver biopsy. *J Comput Assist Tomogr* 2009; 33:672-677.

Mensink RP, Janssen MC, Katan MB. Effect on blood pressure of two diets differing in total fat but not in saturated and polyunsaturated fatty acids in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1988; 47:976-980.

Mertens I, Van Gaal LF. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev* 2002; 3:85-101.

Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114:232-239.

Mutch NJ, Wilson HM, Booth NA. Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:341-347.

Nachiappan V, Curtiss D, Corkey BE, Kilpatrick L. Cytokines inhibit fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes: synergy among TNF, IL-6, and IL-1. *Shock* 1994; 1:123-129.

Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 2004; 84:623-647.

Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62:17-25.

Neyrinck AM, Bindels LB, De Backer F, Pachikian BD, Cani PD, Delzenne NM. Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to its lipid-lowering action. *Int Immunopharmacol* 2009; 9:767-773.

Nicklas BJ, You T, Pahor M. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. *CMAJ* 2005; 172:1199-1209.

O'Rourke L, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem* 2002; 277:42557-42562.

Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997; 46:1768-1774.

Olson AL, Pessin JE. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 1996; 16:235-256.

Osawa H, Yamada K, Onuma H, et al. The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet* 2004; 75:678-686.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009; 9:35-51.

Pagano C, Pilon C, Olivieri M, et al.. Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3165-3170.

Pan DA, Hulbert AJ, Storlien LH. Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *J Nutr* 1994; 124:1555-1565.

Park EI, Paisley EA, Mangian HJ, et al. Lipid level and type alter stearoyl CoA desaturase mRNA abundance differently in mice with distinct susceptibilities to diet-influenced diseases. *J Nutr* 1997; 127:566-573.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al.. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:472-476.

Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med* 2003; 138:24-32.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006; 17:429-445.

Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:365-375.

Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:381-392.

Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med* 2008; 359:2105-2120.

Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:447-452.

Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116:1234-1241.

Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, et al.. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 1994; 73:460-468.

Preis SR, Massaro JM, Robins SJ, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18:2191-2198.

Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS. Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 2006; 55:3083-3090.

Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4426-4433.

Rahman M, Berenson AB. Accuracy of current body mass index obesity classification for white, black, and Hispanic reproductive-age women. *Obstet Gynecol* 2010; 115:982-988.

Rajala MW, Qi Y, Patel HR, et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53:1671-1679.

Rawlins SR, El-Zammar O, Zinkievich JM, Newman N, Levine RA. Digital quantification is more precise than traditional semiquantitation of hepatic steatosis: correlation with fibrosis in 220 treatment-naive patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2010; 55:2049-2057.

Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, et al. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol* 2010; 52:727-736.

Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 2008; 14:185-192.

Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* 1993; 123:1923-1931.

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998; 280:1843-1848.

- Romieu I, Willett WC, Stampfer MJ, C et al. Energy intake and other determinants of relative weight. *Am J Clin Nutr* 1988; 47:406-412.
- Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; 278:45777-45784.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 2002; 51:3176-3188.
- Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005; 50:171-180.
- Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 2004; 114:224-231.
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007; 87:507-520.
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001; 50:2199-2202.
- Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, Furst A, Scholmerich J, Buchler C. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1732:96-102.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26:57-60.
- Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol* 2009; 51:433-445.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002; 51:3391-3399.
- Sentinelli F, Romeo S, Arca M, et al. Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study. *Diabetes* 2002; 51:860-862.
- Sharma AM, Tarnopolsky MA. Regulating adiponectin: of flax and flux. *Diabetologia* 2005; 48:1035-1037.
- Shulman GI. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19:183-190.

Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281:1683-1686.

Simonen P, Kotronen A, Hallikainen M, et al. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol* 2011; 54:153-159.

Simons PJ, van den Pangaart PS, van Roomen CP, Aerts JM, Boon L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-treated human preadipocytes are potent leptin producers. *Cytokine* 2005; 32:94-103.

Song S, Andrikopoulos S, Filippis C, Thorburn AW, Khan D, Proietto J. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281:E275-282.

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119:239-250.

Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *Br J Nutr* 2007; 98:1159-1169.

Steinberg GR, Dyck DJ. Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E1374-1382.

Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, et al.. The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006a; 91:3592-3597.

Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 2006b; 4:465-474.

Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283:E187-192.

Steinberg GR, Smith AC, Van Denderen BJ, et al. AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J Clin Endocrinol Metab* 2004a; 89:4575-4580.

Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004b; 286:E57-63.

Steinberg GR, Watt MJ, Fam BC, et al. Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 2006c; 147:3906-3914.

Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997; 272:971-976.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409:307-312.

Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1569-1575.

Stevens A, Begum G, White A. Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: A mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? *Eur J Pharmacol* 2011.

Storlien LH, Hulbert AJ, Else PL. Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998; 1:559-563.

Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, et al.. Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids* 1996; 31 Suppl:S261-265.

Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, Suzuki M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr* 1995; 125:920-925.

Tam LS, Tomlinson B, Chu TT, Li TK, Li EK. Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26:1495-1498.

Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E664-671.

Targher G, Bertolini L, Scala L, Poli F, Zenari L, Falezza G. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese individuals. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61:700-703.

Thorburn AW. Prevalence of obesity in Australia. *Obes Rev* 2005; 6:187-189.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92:347-355.

Trost S, Pratley R, Sobel B. Impaired fibrinolysis and risk for cardiovascular disease in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2006; 6:47-54.



- Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005; 257:167-175.
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, et al.. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1986-1998.
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al.. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344:1343-1350.
- Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol* 2001; 116:263-270.
- Turlin B, Ramm GA, Purdie DM, et al.. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. *Liver Int* 2009; 29:530-535.
- Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, et al.. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:3584-3589.
- van der Poorten D, Milner KL, Hui J, et al. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008; 48:449-457.
- van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1759-1766.
- van Schothorst EM, Bunschoten A, Schrauwen P, Mensink RP, Keijer J. Effects of a high-fat, low- versus high-glycemic index diet: retardation of insulin resistance involves adipose tissue modulation. *FASEB J* 2009; 23:1092-1101.
- Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, et al. Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:666-672.
- Vidal H, Auboeuf D, De Vos P, et al. The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *J Clin Invest* 1996; 98:251-255.
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995; 117:25-32.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21:697-738.
- Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2007; 2:31-56.

Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyika SK. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:2323-2330.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796-1808.

Welborn TA, Dhaliwal SS, Bennett SA. Waist-hip ratio is the dominant risk factor predicting cardiovascular death in Australia. *Med J Aust* 2003; 179:580-585.

Westerterp-Plantenga MS, Saris WH, Hukshorn CJ, Campfield LA. Effects of weekly administration of pegylated recombinant human OB protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:426-434.

White CL, Whittington A, Barnes MJ, Wang Z, Bray GA, Morrison CD. HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E291-299.

WHO. 1998. *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. In. Geneva: World Health Organization.

WHO. 1999. *Physical Status: The use and interpretation of anthropometry*. In: Organization WH, editor. Geneva.

WHO. 2000. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation*. In. Geneva: World Health Organization. p 256.

Wildey MB, Pampalone SZ, Pelletier RL, Zive MM, Elder JP, Sallis JF. Fat and sugar levels are high in snacks purchased from student stores in middle schools. *J Am Diet Assoc* 2000; 100:319-322.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003; 133:1081-1087.

Xu L, Spinass GA, Niessen M. ER stress in adipocytes inhibits insulin signaling, represses lipolysis, and alters the secretion of adipokines without inhibiting glucose transport. *Horm Metab Res* 2010; 42:643-651.

Yang RZ, Lee MJ, Hu H, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290:E1253-1261.

Yaqoob P, Sherrington EJ, Jeffery NM, et al. Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27:297-310.

Yaspelkis BB, Davis JR, Saberi M, Smith TL, et al. Leptin administration improves skeletal muscle insulin responsiveness in diet-induced insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E130-142.

Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, et al.. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2002; 2:489-495.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432.

# APÊNDICE – Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets

ARTICLE IN PRESS

NUT8576\_proof ■ 28 June 2011 ■ 1/8

Nutrition xxx (2011) 1–8



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjournal.com



Basic nutritional investigation

## Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets

Mariana Catta-Preta R.D., Ph.D.<sup>a,b</sup>, Marcela Anjos Martins R.D., M.Sc.<sup>a,b</sup>,  
Tatiana Marlowe Cunha Brunini M.D., Ph.D.<sup>b</sup>, Antonio Claudio Mendes-Ribeiro M.D., Ph.D.<sup>b</sup>,  
Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda M.D., Ph.D.<sup>a</sup>, Marcia Barbosa Aguila R.D., Ph.D.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil  
<sup>b</sup>Laboratory of Pharmacology, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

Article history:  
Received 26 January 2011  
Accepted 30 May 2011

## Keywords:

Metabolic change  
Canola oil  
Olive oil  
Sunflower oil  
Lard

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate whether changing the lipid source induces metabolic changes and/or modulates the adipose tissue distribution in mice fed with a high-fat (HF) diet.

**Methods:** C57BL/6 mice were subjected to a 10-wk control diet (10% fat) or an HF diet (60% fat) containing lard (HF-L), olive oil (HF-O), sunflower oil or canola oil. Food intake and body weight were measured. At euthanasia, blood was collected and adipose tissue was dissected. Serum hormones and cytokines were determined.

**Results:** The plasma insulin levels were higher in the HF-L and HF-O groups than in the other three groups ( $P < 0.0001$ ). The levels of resistin were highest in the HF-L and HF-O groups ( $P < 0.0001$ ). Leptin expression was also highest in these two groups ( $P < 0.0001$ ). Of the four groups, interleukin-6 was expressed at the highest level in the HF-L group ( $P < 0.0005$ ), whereas adiponectin was expressed at the lowest level ( $P < 0.0001$ ). The accumulation of subcutaneous and visceral adipose tissues was higher in the HF-L group compared with the other groups. This group was hypertrophic because of excess subcutaneous fat and epididymal fat in the adipocytes. However, the ratio of subcutaneous to visceral fat was significantly lower in the HF-L and HF-O groups compared with the other groups.

**Conclusion:** In mice fed fat-rich diets, the level of adipokines, the distribution of adipose tissue, and the metabolism of carbohydrates are more significantly influenced by the lipid content rather than the absolute amount of lipid.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The primary role of adipose tissue was traditionally thought to serve as a temporary storage site for energy in the form of triacylglycerol, but adipose tissue is recognized currently as the largest endocrine organ of the human body [1]. Adipose tissue is known to express and secrete a variety of products known as adipokines, which include leptin, adiponectin, resistin, visfatin [2, 3], vaspin [4], and omentin [5,6] in addition to proinflammatory

cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, and monocyte chemoattractant protein-1 [7].

Studies have reported that C57BL/6 mice develop obesity, insulin resistance (IR), diabetes mellitus, hypertriglyceridemia [8,9], advanced fatty liver, and fatty pancreatic diseases when fed a high-fat (HF) diet (rich in saturated fat) [10], and the diseases these mice develop closely resemble common forms of disease in humans after developing obesity [11,12]. Compared with other animal models, such as Zucker obese rats, *ob/ob* or *db/db* mice, or other gene-deletion animal models, these HF diets serve as a model of exogenous obesity, which arises by a higher dietary caloric intake (fat overload) [13]. One study has shown that C57BL/6 mice carry a genetic trait that predisposes them to store fat when the dietary fat content is high [12]. However, these results cannot be generalized to human populations, because the obesity in humans responds more to a level of dietary carbohydrates and not to a level

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Ciéncia e Tecnologia (CNPq) and Fundaáo para o Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55-21-2868-8326; fax: +55-21-2868-8033.  
E-mail address: mbaguila@uerj.br (M. B. Aguila).

0899-9007/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.nut.2011.05.011

Please cite this article in press as: Catta-Preta M, et al., Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by..., Nutrition (2011), doi:10.1016/j.nut.2011.05.011

of lipid. In the human, the carbohydrate restriction has a more favorable effect on the metabolic syndrome than a low-fat diet [14]. This can be explained by the metabolic adaptations induced by carbohydrate restriction [15] and less stimulation of insulin. Lower insulin levels result in increased lipolysis and fatty acid oxidation and simultaneously decreases the activity of key enzymes in de novo lipogenesis [16]. To confirm this, one work studied overweight but otherwise healthy women with normal lipid profiles [14]. In this population, the results of this study demonstrated that a short-term, hypocaloric, very low-carbohydrate, and low-fat diet had a similar effect on cardiovascular risk as shown by similar changes in the ratio of total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol and fasting and postprandial triacylglycerol levels. However, a very low-carbohydrate diet was more effective than a low-fat diet at improving insulin sensitivity as measured by the homeostasis model assessment (HOMA) using fasting glucose and insulin levels, but the significance of this small decrease probably was not physiologically relevant in glucose clearance or insulin effectiveness [14].

In rats, an HF diet not only accelerates the filling of pre-existing adipocytes but also stimulates the proliferation of adipocyte precursor cells [17]. Therefore, the hypothesis that obesity may be evaluated as an endocrine tumor has been approached from a genetic perspective in considering hyperplasia and hypertrophy of adipocytes, neovascularization, and increased functional activity in obesity [18].

An indicator for metabolic alterations is the "regional distribution of adipose tissue." Obesity is not a homogeneous condition, and the regional distribution of adipose tissue is important for understanding the relation among obesity, glucose metabolism, and lipid metabolism [19]. Although an increase in total adiposity promotes a higher risk of metabolic diseases, visceral adipose tissue is more closely related to obesity-associated pathologies and complications compared with total adiposity or the quantity of subcutaneous adipose tissue [20,21].

This study was undertaken to increase the understanding of the effect of specific lipid sources from HF diets on glucose metabolism, the distribution of adipose tissue, and the structure and secretory functions in C57BL/6 mice.

## Materials and methods

### Animals and diets

All procedures were performed in accordance with the guidelines of the animal ethics committee at the State University of Rio de Janeiro and were conducted in accordance with the conventional guidelines for experimentation with animals (National Institutes of Health Publication No. 85-23, revised 1996). Animals were maintained under controlled conditions (21 ± 2°C, humidity 60 ± 10%, and 12-h dark/12-h light cycle). Male C57BL/6 mice (12 wk old) were randomly divided into five groups (n = 15 per group, total 75) and subjected to different dietary regimens (Table 1): the standard rodent chow (SC group); 30% of energy from fat, 3.8 kcal/g of chow) or an HF diet (60% of energy from fat, 5.4 kcal/g of chow) containing lard (HF-L group), olive oil (HF-O group), sunflower oil (HF-S group), or canola oil (HF-Ca group). The diets were manufactured by PragoSolucoes (PragoSolucoes, Jau, SP, Brazil; <http://www.pragsolucoes.com.br>) in accordance with AIN-93 recommendations [22]. Diets were administered over a 10-wk period.

### Body mass, food intake, and feed efficiency

Mice had free access to food and water during the experimental period, and their intakes were monitored daily. In addition, their body mass was measured each week. Fresh chow was provided daily, and any remaining chow from the previous day was discarded. Food consumption was determined as the difference between the food supplied and the amount of food left in the grid. Energy intake was the product of food consumption by the energy content of the diet. Feed efficiency was calculated as the ratio between the body mass gain in grams and the food consumed in kilojoules per animal, multiplied by 100.

**Table 1**  
Experimental diets

Ingredients (g/kg)	Groups				
	SC	HF-L	HF-O	HF-S	HF-Ca
Casein (>85% protein)	140.0	190.0	190.0	190.0	190.0
Corn starch	620.692	250.692	250.692	250.692	250.692
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Soy oil	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Lard	—	320.0	—	—	—
Olive oil	—	—	320.0	—	—
Sunflower oil	—	—	—	320.0	—
Canola oil	—	—	—	—	320.0
Fiber	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Vitamin mix*	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mix*	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidant	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Total amount (g)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
Energy (kcal/g)	3807	5407	5407	5407	5407
Carbohydrate (%)	76	26	26	26	26
Protein (%)	14	14	14	14	14
Lipid (%)	10	60	60	60	60

HF-Ca, high-fat diet with canola oil; HF-L, high-fat diet with lard; HF-O, high-fat diet with olive oil; HF-S, high-fat diet with sunflower oil; SC, standard rodent chow.

\* Vitamins and minerals present in the mix were in accordance with AIN-93 M specifications.

### Blood analysis

A blood glucose test, an oral glucose tolerance test (OGTT), and an intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) were conducted before the initiation of the diet feeding and after 9 wk of diet feeding. For blood glucose levels, blood was obtained by milking the tail after a small incision was made to the animal's tail (Accu-Chek glucometer, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). The OGTT was performed using a 2.5% solution of glucose in sterile saline (0.9% NaCl) at a dose of 1.0 g/kg. The glucose was administered by orogastric gavage after a 6-h fasting period. The blood glucose concentration was measured before glucose administration (0 min) and 15, 30, 60, and 120 min after administration. For the IPITT, fasting blood glucose levels were measured (after a 4-h fasting period, blood obtained from the tail vein) using a glucometer (Accu-Chek; 0 min). Insulin was subsequently injected intraperitoneally (1.0 U/kg) and blood glucose was measured again at 15, 30, 60, and 120 min.

On the day before euthanasia, animals were deprived of food for 6 h before being anesthetized (intraperitoneal sodium pentobarbital 150 mg/kg), after which blood samples were obtained by cardiac puncture through the right atrium. The blood plasma was obtained by centrifugation (120 × g, 15 min) at room temperature. Serum adipokines, inflammatory cytokines, and insulin were measured using Multiplex Biomarker Immunoassays for Luminex xMAP technology (Millipore, Billerica, MA, USA). The leptin, resistin, IL-6, monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor type 1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and insulin levels were assessed by MADPK-71K, and adiponectin levels were measured using SinglePlex adiponectin kits (mouse, EZMADP-60K). The HOMA-IR was calculated as fasting glucose (millimoles per liter) multiplied by the fasting insulin level (microunits per milliliter) divided by 22.5 [23].

### Adipose tissue

The subcutaneous fat between the lower part of the rib cage and the mid-thigh was considered inguinal fat, whereas the fat connected to the posterior abdominal wall in the vicinity of the kidneys and the abdominal portion of the ureters was considered retroperitoneal fat. The abdominal fat in the lower part of the abdomen and connected to the epididymis was considered epididymal fat. Therefore, after the animals were euthanized, the inguinal (subcutaneous), epididymal, retroperitoneal, and perirenal fat pads were carefully dissected out (both sides of the animal) and weighed.

The adipose tissues from the subcutaneous and epididymal deposits were fixed in freshly prepared 4% (w/v) buffered formalin (pH 7.2) and embedded in Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), sectioned (5  $\mu$ m thick), and stained with hematoxylin and eosin. Digital images were obtained from the histologic sections and at least 500 adipocytes per group were randomly analyzed. The cell diameters were measured by imaging analysis using Image-Pro

234 Plus 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA). The adiposity index was  
235 estimated as the weight of the visceral plus subcutaneous fat pads multiplied by  
236 100 and then divided by the total body mass [24].

#### 237 Data analyses

238 The resulting data were tested for normality and homogeneity of variances  
239 and then comparisons among groups were performed using one-way analysis of  
240 variance and the Tukey post hoc test. Correlations were assessed using the  
241 Pearson correlation test to investigate correlations among fat masses, adipokines,  
242 resistin, leptin, and adiponectin plasma levels. The differences within the same  
243 group as a function of time were analyzed using the paired *t* test (GraphPad Prism  
244 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).  $P \leq 0.05$  was considered statistically  
245 significant.

### 246 Results

#### 247 Q1 Food intake and feed efficiency

248 Food intake was not different among the four groups. However,  
249 the feed efficiency in mice receiving the HF-L diet was significantly  
250 higher compared with the other three groups (+64%,  $P < 0.01$ ).  
251 There were no statistically significant differences among the three  
252 other groups (HF-O, HF-S, and HF-Ca) in feed efficiency (Table 2).

#### 253 Body mass

254 All animals started the experiment with similar body masses.  
255 Lard feeding induced a significant body mass gain in the HF-L  
256 mice that was observed at week 6, and this gain continued  
257 until the end of the experimental period, resulting in the greatest  
258 body mass among the four experimental groups. The HF-L group  
259 had a final body mass that was 18% greater than the SC control  
260 group and 15% greater than the other three experimental groups  
261 ( $P < 0.001$ ; Fig. 1).

262 **Table 2**  
263 Various lipid sources induce different responses in mice fed high-fat diets

264 Data	265 Groups				
	266 SC	267 HF-L	268 HF-O	269 HF-S	270 HF-Ca
271 Dietetic					
272 Food intake (g)	273 2.7 ± 0.3	274 2.8 ± 0.1	275 3.0 ± 0.2	276 3.1 ± 0.1	277 3.1 ± 0.2
278 Feed efficiency ( $\times 10^3$ ; g/kcal)	279 5.5 ± 1.0	280 9.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	281 5.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	282 4.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	283 5.4 ± 1.1 <sup>b</sup>
284 Carbohydrate metabolism					
285 Baseline glucose (mg/dL)	286 132.0 ± 8.5	287 158.2 ± 9.8	288 153.4 ± 9.2	289 127.4 ± 2.3	290 129.4 ± 4.3
291 Insulin (pg/mL)	292 423.1 ± 92.3	293 1376.0 ± 135.1 <sup>a</sup>	294 1082.0 ± 69.2 <sup>a</sup>	295 809.6 ± 51.7 <sup>b</sup>	296 725.3 ± 71.5 <sup>b</sup>
297 HOMA-IR	298 3.3 ± 0.6	299 13.5 ± 2.0 <sup>a</sup>	280 10.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	281 6.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	282 5.8 ± 0.7 <sup>b</sup>
283 Inflammatory cytokines					
284 IL-6 (pg/mL)	285 3.2 ± 0.6	286 17.6 ± 3.8 <sup>a</sup>	287 5.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	288 6.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	289 7.8 ± 0.6 <sup>b</sup>
290 PAI-1 (pg/mL)	291 1706.0 ± 338.2	292 1688.0 ± 240.1	293 1474.0 ± 132.2	294 1700.0 ± 188.9	295 1366.0 ± 318.5
296 MCP-1 (pg/mL)	297 40.7 ± 7.8	298 42.8 ± 7.7	299 54.2 ± 5.9	300 50.2 ± 4.3	301 37.1 ± 7.1
302 TNF- $\alpha$ (pg/mL)	303 3.6 ± 0.8	304 3.9 ± 0.4	305 2.9 ± 0.3	306 3.0 ± 0.2	307 3.7 ± 0.1
308 Adipose tissue					
309 Subcutaneous mass (g) <sup>a</sup>	310 0.09 ± 0.01	311 0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	312 0.05 ± 0.01 <sup>ab</sup>	313 0.09 ± 0.0 <sup>bc</sup>	314 0.08 ± 0.0 <sup>c</sup>
315 Visceral mass (g) <sup>a</sup>	316 0.75 ± 0.03	317 1.33 ± 0.13 <sup>a</sup>	318 0.53 ± 0.05 <sup>b</sup>	319 0.49 ± 0.03 <sup>b</sup>	320 0.57 ± 0.05 <sup>b</sup>
321 Subcutaneous/visceral fat	322 0.14 ± 0.01	323 0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	324 0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	325 0.17 ± 0.01 <sup>bc</sup>	326 0.14 ± 0.01 <sup>bc</sup>
327 Adipocyte diameter ( $\mu$ m)					
328 In subcutaneous fat	329 57.4 ± 4.3	330 79.2 ± 4.8 <sup>a</sup>	331 59.0 ± 3.5 <sup>b</sup>	332 59.5 ± 3.2 <sup>b</sup>	333 56.0 ± 2.7 <sup>b</sup>
334 In inguinal fat	335 60.3 ± 4.4	336 95.8 ± 5.0 <sup>a</sup>	337 58.3 ± 2.7 <sup>b</sup>	338 60.3 ± 2.5 <sup>b</sup>	339 57.7 ± 3.0 <sup>b</sup>
340 Adipokines					
341 Resistin (pg/mL)	342 357.4 ± 52.12	343 990.6 ± 85.83 <sup>a</sup>	344 664.8 ± 51.70 <sup>a</sup>	345 396.4 ± 25.19 <sup>bc</sup>	346 285.2 ± 55.06 <sup>bc</sup>
347 Leptin (pg/mL)	348 598.6 ± 159.0	349 2105.0 ± 377.5 <sup>a</sup>	350 2742.0 ± 337.7 <sup>a</sup>	351 506.3 ± 133.8 <sup>bc</sup>	352 153.5 ± 20.49 <sup>c</sup>
353 Adiponectin (pg/mL)	354 975.2 ± 53.40	355 544.0 ± 25.26 <sup>b</sup>	356 734.6 ± 41.44 <sup>ab</sup>	357 734.8 ± 53.82 <sup>ab</sup>	358 733.5 ± 51.06 <sup>ab</sup>

359 HF-Ca, high-fat diet based on canola oil; HF-L, high-fat diet based on lard; HF-O, high-fat diet based on olive oil; HF-S, high-fat diet based on sunflower oil; HOMA-IR,  
360 homeostasis model assessment for insulin resistance; IL-6, interleukin-6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1;  
361 SC, standard rodent chow; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$

362 Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical symbols (<sup>a</sup>SC group, <sup>b</sup>HF-L group, <sup>c</sup>HF-O group) represent statistical differences at  $P < 0.05$

363 <sup>a</sup> The inguinal fat pad.

364 <sup>†</sup> The sum of the retroperitoneal, epididymal, and perirenal fat pads.

Please cite this article in press as: Catta-Preta M, et al. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by... Nutrition (2011), doi:10.1016/j.nut.2011.05.011

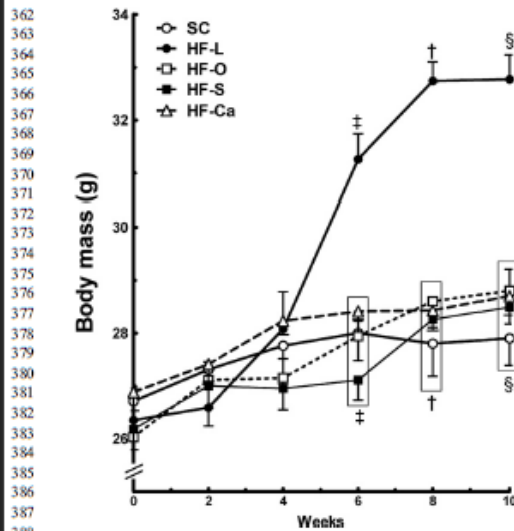


Fig. 1. Body mass evolution. Starting in the sixth week, the HF-L group gained more body mass than the other three groups. This mass difference was maintained until the end of the experiment. The values are reported as mean ± SEM. The statistical difference among the groups is indicated by the same symbol ( $P < 0.01$ ). HF-Ca, high-fat diet based on canola oil; HF-L, high-fat diet based on lard; HF-O, high-fat diet based on olive oil; HF-S, high-fat diet based on sunflower oil; SC, standard chow.

with the SC control group ( $P < 0.0001$ ). Furthermore, the leptin levels were 316% and 442% higher in the HF-L and HF-O groups, respectively, than in the HF-S group ( $P < 0.0001$ ); compared with the HF-Ca group, the leptin levels were 1,272% and 1,687% higher in the HF-L and HF-O groups, respectively ( $P < 0.0001$ ; Table 2).

Interestingly, the levels of adiponectin were lowest in the HF-L group. In general, these levels were low in mice fed HF diets

compared with mice fed standard chow (HF-L, 44% less,  $P < 0.001$ ; HF-O, 25% less,  $P < 0.01$ ; HF-S, 25% less,  $P < 0.01$ ; HF-Ca 25% less,  $P < 0.01$ ). In the HF-L group, the levels of adiponectin were lower than in the HF-O, HF-S, and HF-Ca groups (26% less,  $P < 0.05$ ). No statistically significant differences were found among the HF-O, HF-S, and HF-Ca groups (Table 2).

*Inflammatory cytokines*

The IL-6 levels were the highest in the HF-L group. This level was 450% higher than that observed in the SC group ( $P < 0.001$ ), 220% higher than in the HF-O group ( $P < 0.01$ ), 193% higher than in the HF-S group ( $P < 0.01$ ), and 126% higher than in the HF-Ca group ( $P < 0.01$ ). No statistically significant difference was found in the IL-6 levels among the SC, HF-O, HF-S, and HF-Ca groups. The remaining inflammatory cytokines, plasminogen activator inhibitor type 1, monocyte chemoattractant protein-1, and tumor necrosis factor- $\alpha$ , did not change as a function of the different diets (Table 2).

*Adipose tissue*

The subcutaneous and visceral fat masses were greatest for the HF-L group (Table 2, Fig. 4). The subcutaneous fat mass in the HF-L group was 44% greater than the corresponding masses in the SC and HF-S groups ( $P < 0.001$ ). The subcutaneous fat mass was also 160% greater than that observed in the HF-O group ( $P < 0.001$ ) and 62% greater than the mass in the HF-Ca group ( $P < 0.001$ ). However, the subcutaneous fat pad in the HF-O group was 44% less than that observed in the HF-S group ( $P < 0.05$ ) and 37% less than in the HF-Ca group ( $P < 0.05$ ). The HF-L group also showed the greatest visceral fat pad, which was 77% greater than in the pad for the SC group ( $P < 0.001$ ), 151% greater than in the HF-O group ( $P < 0.001$ ), 171% greater than in the HF-S group ( $P < 0.001$ ), and 133% greater than in the HF-Ca group ( $P < 0.001$ ). No statistically significant difference was observed for the masses of the subcutaneous fat pad and visceral fat pad among the HF-S, HF-Ca, and SC groups.

The ratio of subcutaneous to visceral fat ratio was more than 40% smaller in the HF-L and HF-O groups compared with that

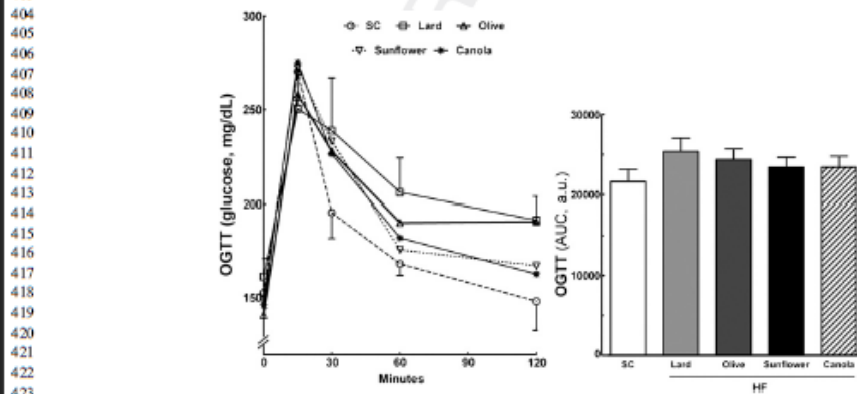


Fig. 2. The OGTT included the curves (left) and the bar graph for the AUCs (right). The values are reported as mean ± SEM. No statistical differences were found among the groups. a.u., arbitrary unit; AUC, area under the curve; HF, high-fat diet; OGTT, oral glucose tolerance test; SC, standard chow.

490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553

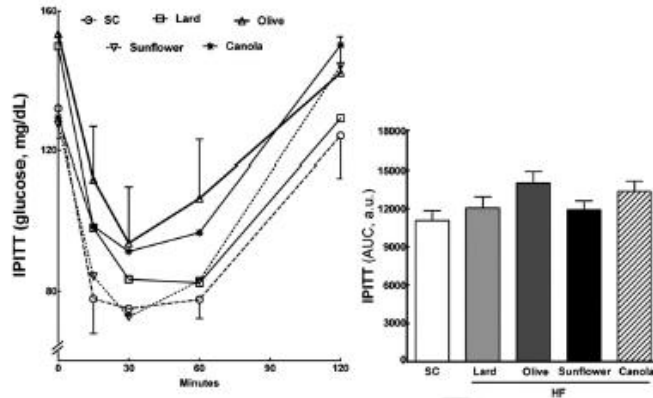


Fig. 3. The IPITT included the curves (left) and the bar graph for the AUCs (right). The values are reported as mean  $\pm$  SEM. No statistical differences were found among the groups. a.u., arbitrary unit; AUC, area under the curve; HF, high-fat diet; IPITT, intraperitoneal insulin tolerance test; SC, standard chow.

calculated for the other groups ( $P < 0.001$ ; Table 2). No statistically significant differences were reported for this ratio among the SC, HF-S, and HF-Ca groups.

The adipocytes were hypertrophic in the epididymal and subcutaneous fat pads of the HF-L group. The epididymal adipocyte in the HF-L group was more than 30% larger than in

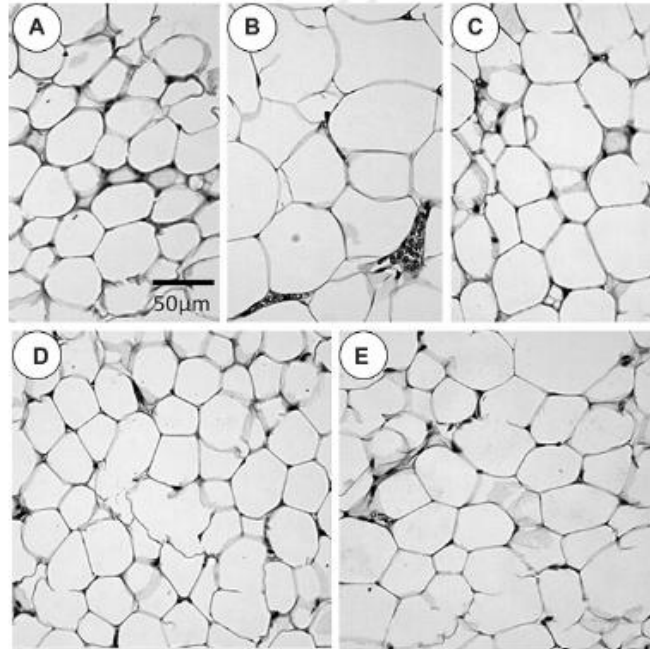


Fig. 4. The adipocyte diameter of the epididymal adipose tissue in (A) the group fed standard chow, (B) the group fed a high-fat diet based on lard, (C) the group fed a high-fat diet based on olive oil, (D) the group fed a high-fat diet based on sunflower oil, and (E) the group fed a high-fat diet based on canola oil.

Please cite this article in press as: Catta-Preta M, et al. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by... Nutrition (2011), doi:10.1016/j.nut.2011.05.011



the pads for the SC, HF-O, HF-S, and HF-Ca groups ( $P < 0.05$ ). In addition, the subcutaneous adipocytes of the HF-L group were more than 60% larger than in the SC, HF-O, HF-S, and HF-Ca groups ( $P < 0.05$ ; Table 2, Fig. 4).

#### Correlation among adipokines, adipose tissue, and adiposity index

There was a significant positive correlation between resistin and visceral fat masses ( $R = 0.72$ ,  $P < 0.00005$ ) and between resistin levels and the adiposity index ( $R = 0.72$ ,  $P < 0.00006$ ). Interestingly, the levels of leptin and adiponectin were not correlated with visceral or subcutaneous fat masses or with the adiposity index.

#### Discussion

In the present study, the diets rich in saturated (HF-L) and monounsaturated (HF-O) fatty acids induced IR by increasing the level of inflammatory adipokines and decreasing the ratio of subcutaneous to visceral fat, regardless of the animal's body mass. In contrast, diets that were rich in polyunsaturated fatty acids (HF-S and HF-Ca) did not alter any of the factors involved in the genesis of IR and obesity.

In the present study, the HF-L mice were heavier than the other mice on the HF diets, but HF-L mice actually consumed the same amount of diet per gram of body weight as the other groups. This point is emphasized by the finding of a much higher feed efficiency (weight gain divided by caloric consumption) in HF-L mice compared with the other mice on HF diets. This means that HF-L mice can store more fat without consuming more calories. Therefore, total calories alone do not account for the greater weight gain of HF-L mice, and this suggests that the body fat gain in HF-L mice despite the same diet intake is tightly linked to the source of dietary lipid. The ability to store fat seems to be more important in the development of obesity in C57BL/6 mice than the increase in caloric content of an HF diet [12].

It has been argued that because the rate of carbohydrate and protein oxidation is determined by intake of these nutrients, whereas the rate of fat oxidation is determined largely by the gap between total energy expenditure and energy intake, obesity is the natural result of a diet rich in fat [25]. From the other studies cited earlier, it would seem that the metabolic rate can be altered as a consequence of altering the fatty acid profile of the diet. Some classic studies have directly addressed this possibility. In animal studies comparing isocaloric HF diets containing saturated (edible beef tallow) with  $\omega$ -6 fat (safflower oil), larger amounts of body fat were accumulated in rats that consumed saturated fat [26]. The expired air from the rats was trapped and the oxygen and carbon dioxide concentrations analyzed by a gas mass analyzer. The increased body fat was associated with lower oxygen consumption compared with the safflower oil-fed animals, indicating a decreased diet-induced thermogenesis of the saturated fat compared with the safflower fat, suggesting that the metabolic rate is altered in conjunction with the modification of membrane phospholipids using the dietary intervention. Another work using open-circuit respirometry; the rodents consuming diets with a relatively high-unsaturated fat profile had significantly greater metabolic rates than those consuming isocaloric high-saturated fat diets [27,28]. Thus, the phospholipid fatty acid composition of membranes seems to be a direct determinant of the metabolic rate in rodents. Higher levels of saturated fatty acids in the diet affect membrane fatty acid composition, leading to a decreased metabolic rate and thus increased susceptibility to obesity.

There are few intervention studies in humans addressing the dietary fatty acid profile and metabolic rate. Perhaps the classic study is that by Jones and Schoeller [29]. In this 2-wk crossover design study, consisting of two consecutive 7-d dietary treatment periods, subjects consumed diets differing only in the dietary  $\omega$ -6 polyunsaturated-to-saturated fatty acid ratio. The basal metabolic rate and the thermogenic effect of food were measured in each subject on days 1 and 7 of each diet period using open-circuit respiratory gas exchange. Consistent with the animal data, the more saturated diet resulted in the lowest basal metabolic rate, thus favoring weight gain. However, that study was limited because a high-carbohydrate diet was not compared with an HF diet.

High-fat diet-induced obesity has been well understood for more than a century [30]. Further studies have shown that HF diets promote hyperglycemia and increase body mass and IR [9,10]. Therefore, it can be used as an experimental model for studying the metabolic syndrome of IR in rodents [31–33].

As evident from the literature, diets with varied fatty acid composition are broadly grouped under the term *high-fat diet*, even if most of the corresponding studies involved the administration of a formula with only one HF component for the purposes of comparison with standard chow and openly failed to analyze the influence of different fat components in the model. Thus, few studies have been performed by changing the components of these HF diets with the goal of a subsequent assessment of their metabolic effects.

It is generally believed that diets based on saturated fatty acids induce the typical HF diet phenotype, whereas diets containing polyunsaturated fatty acids have beneficial effects on body composition and insulin action [34,35]. However, the role of monounsaturated fatty acids in this context is unclear. In the present study, saturated and monounsaturated HF diets proved effective for inducing the inflammation response and IR commonly found in human metabolic syndromes.

Abnormal adipose tissue development leads to IR in non-adipose organs. Ectopic deposition and inflammation play a central role in the development of IR in the muscle, liver, and other tissues and establish a negative reverberating cycle [36]. There is a correlation between the accumulation of intrahepatic and intramuscular triacylglycerols and a low capacity to oxidize fatty acids in the presence of IR [37–39]. This is in agreement with the findings of the present study in the HF-L and HF-O groups that showed IR. This effect is clearly demonstrated when saturated fatty acids are used [9,10,40], but the data are scarce regarding the other sources of fatty acids. A previous study [31] and the present study have demonstrated a marked IR in mice fed saturated or monounsaturated fatty acids, demonstrating that the lipid source is as important as the quantity of the food consumed.

In the present study, we observed that the parameters of IR and the inflammatory response with the HF-L and HF-O diets led to the most pronounced manifestations. We also observed less subcutaneous fat mass deposition in HF-O mice compared with controls (this difference was not seen in the visceral fat mass deposition), but the inflammatory response and IR in these animals occurred despite this smaller fat deposition. In contrast, we observed a decrease of the ratio of subcutaneous to visceral fat mass by 50% in HF-O and HF-L mice. In this case, these results may suggest that the hyperinsulinemia and inflammatory response are more associated with body fat distribution (ratio of subcutaneous to visceral fat) than with total body fat deposition. For example, not all obese patients have the same risk of developing diabetes, cardiovascular disease, or hyperlipidemia. Individuals with peripheral obesity, i.e., fat distributed subcutaneously in the

746 gluteofemoral region, are at little or no risk of the common  
747 medical complications of obesity, whereas individuals with  
748 central obesity, i.e., fat accumulated in visceral depots, are prone  
749 to these complications [41–43]. Furthermore, obesity occurs with  
750 different degrees of fat accumulation in different depots, and  
751 these are associated with different metabolic consequences, with  
752 visceral accumulation of fat producing a much greater risk of  
753 diabetes, dyslipidemia, and accelerated atherosclerosis than  
754 subcutaneous fat and the patterns of fat distribution, and may  
755 have a developmental genetic origin [44]. In some cases, the  
756 metabolic consequences of fat distribution are different in  
757 rodents and humans. For example, leptin exhibits a higher  
758 expression in subcutaneous than in visceral adipose in humans  
759 [45,46], whereas in mice leptin expression is higher in visceral fat  
760 than in subcutaneous fat [47].

761 The release of adipokines has been shown to play a role in the  
762 development of IR and has been shown to increase the risk of  
763 obesity [7]. Among all adipokines, resistin has the highest  
764 correlation with IR [48]. Low levels of glucose present during  
765 periods of fasting improve glucose tolerance and increase insulin  
766 sensitivity in resistin knockout mice [49]. An increase in resistin  
767 levels has been described in several experimental studies using  
768 HF diets based on saturated fatty acids [50,51]. Interestingly, we  
769 found for the first time an increase in resistin levels not only in  
770 mice fed with saturated fat acids, but also in mice fed an HF diet  
771 rich in monounsaturated fatty acids (olive oil). Moreover, the  
772 correlation between resistin levels and visceral fat or the  
773 adiposity index was very strong, indicating a role of the visceral  
774 fat compartment in IR. Other studies demonstrating a causal  
775 relation between resistin and glucose homeostasis have been  
776 based on animal models with altered serum resistin [52]. In this  
777 study, we also showed that IL-6 circulation was drastically  
778 increased only in HF-L mice. IL-6 is an important component of  
779 obesity-related IR in the liver through impairment of insulin  
780 signaling [53,54]. IL-6 can induce IR in the liver. Senn et al. [55]  
781 showed that IL-6 can inhibit insulin receptor signal transduction  
782 in hepatocytes, indicating that IL-6 and insulin share at  
783 least some common signal transduction pathways. In fact, we  
784 observed a relation between IR and serum levels of IL-6 in HF-L  
785 mice, because these mice presented the highest values of serum  
786 insulin and HOMA-IR.

787 Our study showed that even in excess, polyunsaturated fatty  
788 acids do not affect the genesis of obesity and IR. In addition, it is  
789 interesting to note that excessive intake of monounsaturated  
790 fatty acids had similar deleterious effects compared with a diet  
791 rich in saturated fatty acids.

### 792 Conclusion

793 These results demonstrated that the type of the lipid provided  
794 in an HF diet is more important than its quantity, especially  
795 when considering IR, adipose tissue remodeling, and changes in  
796 the levels of proinflammatory adipokines.

### 797 Acknowledgments

798 The authors thank Thatiany Marinho and Angelica Figueiredo  
799 for technical assistance.

### 800 References

- 801 [1] Bukac C, Ferreira SR, Giuffrida FM, Ribeiro-Hilho FF. The new adipose tissue  
802 and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev* 2006;2:19–28.

- 803 [2] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent  
804 advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin  
805 resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:4–12.
- 806 [3] Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, et al. Visceral adipose  
807 tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adi-  
808 pocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10610–5.
- 809 [4] Klöting N, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, et al.  
810 Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity  
811 and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:430–6.
- 812 [5] de Souza Batista CM, Yang XZ, Lee MJ, Glynns NM, Yu DZ, Pray J, et al.  
813 Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity.  
814 *Diabetes* 2007;56:1655–61.
- 815 [6] Yang XZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, et al. Identification of  
816 omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue:  
817 possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*  
818 2006;290:E1253–61.
- 819 [7] Antuna-Paente B, Reve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link  
820 between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008;34:2–11.
- 821 [8] Fernandes-Santos C, Evangelista Carneiro R, Mendonça IS, Aguilá MB,  
822 Mandarim-de-Lacerda CA. Rosiglitazone aggravates nonalcoholic fatty  
823 pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet.  
824 *Pancreas* 2009;38:e80–6.
- 825 [9] Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-  
826 lacerda CA, Aguilá MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations  
827 in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil  
828 (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol* 2010;62:17–25.
- 829 [10] Praulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguilá MB,  
830 Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome:  
831 insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease  
832 (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr*  
833 2010;46:212–23.
- 834 [11] Sarwik RS, Pietro AE, Patekh P, Collins S. Low plasma leptin in response to  
835 dietary fat in diabetes- and obesity-prone mice. *Diabetes* 1997;46:1516–20.
- 836 [12] Sarwik RS, Finglos MN, Rodin J, Sutherland A, Pietro AE, Opara EC, et al.  
837 Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and  
838 diabetes in C57BL/6j and A/J mice. *Metabolism* 1995;44:645–51.
- 839 [13] Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabot JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C,  
840 et al. C57BL/6j and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of  
841 metabolic syndrome. *Obesity* 2007;15:1996–2005.
- 842 [14] Volek JS, Phinney SD, Forsythe CE, Quann EE, Wood RJ, Puglisi MJ, et al.  
843 Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic  
844 syndrome than a low fat diet. *Lipids* 2009;44:297–309.
- 845 [15] Volek JS, Fernandez ML, Feinman RD, Phinney SD. Dietary carbohydrate  
846 restriction induces a unique metabolic state positively affecting athero-  
847 genic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. *Prog*  
848 *Lipid Res* 2008;47:307–18.
- 849 [16] Forsythe CE, Phinney SD, Feinman RD, Volk BM, Freidenreich D, Quann E,  
850 et al. Limited effect of dietary saturated fat on plasma saturated fat in the  
851 context of a low carbohydrate diet. *Lipids* 2010;45:947–62.
- 852 [17] Kiyole BJ, Hirach J. Increased cellular proliferation in adipose tissue of adult  
853 rats fed a high-fat diet. *J Lipid Res* 1979;20:705–15.
- 854 [18] Dindar O, Alyamac E. Obesity: an endocrine tumor? *Med Hypotheses*  
855 2004;63:790–2.
- 856 [19] Bouchard C, Despres JP, Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants  
857 of regional fat distribution. *Endocr Rev* 1993;14:72–93.
- 858 [20] Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al.  
859 Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments:  
860 association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study.  
861 *Circulation* 2007;116:39–48.
- 862 [21] Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P,  
863 Larson MG, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are  
864 cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress:  
865 the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:1234–41.
- 866 [22] Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93  
867 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and  
868 bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* 1993;123:1923–31.
- 869 [23] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.  
870 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function  
871 from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*  
872 1985;28:412–9.
- 873 [24] Meyrinck AM, Bindels LB, De Backer F, Pachikian BD, Cani PD, Delzenne NM.  
874 Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes  
875 adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to  
876 its lipid-lowering action. *Int Immunopharmacol* 2009;9:767–73.
- 877 [25] Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects  
878 of exercise. *Am J Clin Nutr* 1987;45:296–306.
- 879 [26] Shimomura Y, Tamura T, Suzuki M. Less body fat accumulation in rats fed  
880 a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet. *J Nutr* 1990;120:1291–6.
- 881 [27] Pan DA, Halbert AJ, Storlien LH. Dietary fats, membrane phospholipids and  
882 obesity. *J Nutr* 1994;124:1555–65.
- 883 [28] Pan DA, Storlien LH. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phos-  
884 pholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J Nutr*  
885 1993;123:512–9.

886 Please cite this article in press as: Catta-Preta M, et al. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice  
887 by... *Nutrition* (2011), doi:10.1016/j.nut.2011.05.011

- 874 [29] Jones PJ, Schoeller DA. Polyunsaturated:saturated ratio of diet fat influences  
875 energy substrate utilization in the human. *Metabolism* 1988;37:145–51.
- 876 [30] Masek J, Rabry P. High-fat diet and the development of obesity in albino  
877 rats. *Experientia* 1959;15:444–5.
- 878 [31] Buetzner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart IA,  
879 Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and  
880 molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006;36:485–501.
- 881 [32] Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C,  
882 et al. C57Bl/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of  
883 metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:1996–2005.
- 884 [33] Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms  
885 of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding.  
886 *Diabetes* 1997;46:1768–74.
- 887 [34] Skorlien LH, Pan DA, Kriketos AD, O'Connor J, Gatterson ID, Cooney GJ, et al.  
888 Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids*  
889 1996;31(suppl):S261–5.
- 890 [35] Liao JH, Liao TH, Shieh MJ, Chien YW. Effects of different ratios of mono-  
891 unsaturated and polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids on  
892 regulating body fat deposition in hamsters. *Nutrition* 2010;26:811–7.
- 893 [36] Izzo P. Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin  
894 resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care* 2009;32(suppl 2):S168–73.
- 895 [37] Dyck DJ, Heigenhauser GJ, Bruce CR. The role of adipokines as regulators of  
896 skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol*  
897 (Oxf) 2006;186:5–16.
- 898 [38] Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic  
899 pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005;42:987–1000.
- 900 [39] Schrauwen P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance.  
901 *Proc Nutr Soc* 2007;66:33–41.
- 902 [40] Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguilá MB,  
903 Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in over-  
904 weight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 2009;25:818–27.
- 905 [41] Mauriege P, Despres JP, Moorjani S, Prud'Homme D, Lamarche B, Bouchard C,  
906 et al. Abdominal and femoral adipose tissue lipolysis and cardiovascular  
907 disease risk factors in men. *Eur J Clin Invest* 1993;23:729–40.
- 908 [42] Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*  
909 1994;74:761–811.
- 910 [43] Abate M, Garg A. Heterogeneity in adipose tissue metabolism: causes, impli-  
911 cations and management of regional adiposity. *Prog Lipid Res* 1995;34:53–70.
- 912 [44] Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, et al.  
913 Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and  
914 body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6676–81.
- 915 [45] Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, et al. Depot-  
916 specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese  
917 subjects. *Diabetes* 1998;47:98–103.
- 918 [46] Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the  
919 proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral  
920 adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:88–96.
- 921 [47] Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV. Effects of fasting and  
922 refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese  
923 (ob/ob) mice. *FEBS Lett* 1995;368:488–90.
- 924 [48] Seppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The  
925 hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307–12.
- 926 [49] Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, et al.  
927 Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004;303:1195–8.
- 928 [50] Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate  
929 improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed  
930 a high-fat diet. *Endocr J* 2010;57:39–50.
- 931 [51] van Schoorhorst EM, Bunschoten A, Schuurman P, Mensink RP, Keizer J. Effects  
932 of a high-fat, low- versus high-glycemic index diet: retardation of insulin  
933 resistance involves adipose tissue modulation. *FASEB J* 2009;23:1092–101.
- 934 [52] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol*  
935 *Cell Endocrinol* 2010;316:129–39.
- 936 [53] Klover JF, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively  
937 improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005;146:3417–27.
- 938 [54] Klover JF, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-  
939 6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 2003;52:2784–9.
- 940 [55] Senn JF, Klover JF, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular  
941 insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002;51:3391–9.