



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

Antônio Ludgero Correia Júnior

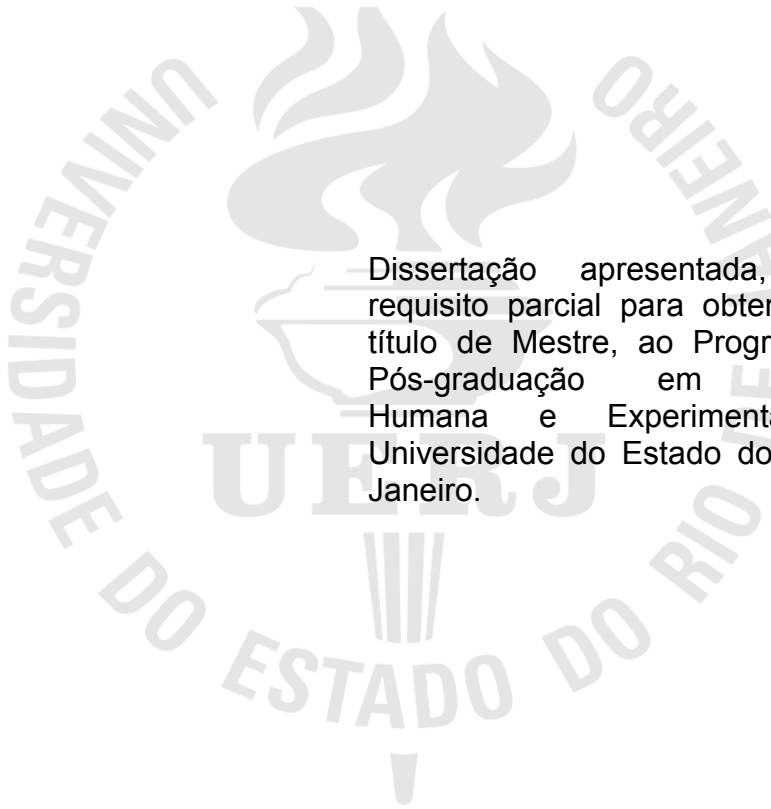
**Efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica
sobre alterações no metabolismo lipídico, remodelamento e
redistribuição do tecido adiposo e sobre os marcadores
inflamatórios em camundongas C57BL/6**

Rio de Janeiro

2011

Antônio Ludgero Correia Júnior

Efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica sobre alterações no metabolismo lipídico, remodelamento e redistribuição do tecido adiposo e sobre os marcadores inflamatórios em camundongas C57BL/6



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

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiane da Silva Faria

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C824 Correia Júnior, Antonio Ludgero.

Efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica sobre alterações no metabolismo lipídico, remodelamento e redistribuição do tecido adiposo e sobre os marcadores inflamatórios em camundongas C57BL/6 / Antonio Ludgero Correia Júnior. - 2011.

68 f.: 15 il.

Orientadora: Tatiane da Silva Faria.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Ovariectomia - Teses. 2. Camundongos como animal de laboratório - Teses. 3. Gorduras na dieta - Teses. 4. Obesidade - Teses. 5. Inflamação - Teses. I. Faria, Tatiane da Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 618.11-089.87

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

Assinatura

Data

Antônio Ludgero Correia Júnior

Efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica sobre alterações no metabolismo lipídico, remodelamento e redistribuição do tecido adiposo e sobre os marcadores inflamatórios em camundongas C57BL/6

Aprovado em 25 de Fevereiro de 2011.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Tatiane da Silva Faria
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Glorimar Rosa
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram durante todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Todo-O-Poderoso Deus pelas bênçãos, força, proteção e luz durante todo o tempo.

Aos meus pais, António Ludgero Correia e Maria Paula Freitas Alfama, aos meus irmãos, Kwami Samora Alfama Correia e Aïcha Paula Alfama Correia e às minhas sobrinhas Aïcha Carolina Ferreira Correia, Paula Regina Correia Santos e Aliah Paula Ferreira Correia, pelo carinho, suporte e amor incondicional.

À minha orientadora, professora doutora Tatiane da Silva Faria pela dedicada orientação, por estar sempre presente e solícita, e pela paciência do início ao fim do período de mestrado.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Mandarim de Lacerda, pelos sábios ensinamentos, paciência e orientação.

À professora doutora Márcia Barbosa Águila pela orientação e ensinamentos.

Aos amigos que de perto ou de longe têm uma palavra de conforto e incentivo sempre que eu preciso.

Aos meus ICs Beatriz, João e Thábata pela colaboração e pronta ajuda durante toda a execução do projeto.

Aos colegas Milton e Geraldo que estiveram presentes em momentos cruciais do experimento e sempre aptos a ajudar. E em recordação/agradecimento aos momentos em que o Milton incentivou a prática do inglês (durante a realização do TOTG): *Guys, I don't have words to describe your superb and bright support throughout this time. I just want you to know that I'll always be there for you, as you did. Many thanks!!!*

Um especial agradecimento à Flávia por toda a ajuda e tempo dispensado no arranque do projeto e a magnífica execução das cirurgias. Que nunca desistas dos teus sonhos. Deus abençoe e proteja a ti e ao teu neném!

Agradeço imensamente o auxílio das técnicas Angélica Figueiredo e Thatiany Marinho pela ajuda no preparo do material.

Meus sinceros agradecimentos aos meus caros colegas e ex-colegas do LMMC, Alessandra, Alini, Ana Volpato, Bianca, Caroline, Débora, Diana, Eliete, Fernanda Amorim, Fernanda Ornellas, Isabele, Jessica, Júlio, Leonardo, Marcela, Mariana, Sandra, Thiago, Vanessa e Victor, por todo o carinho e ajuda.

Tudo posso Naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

Quem habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do onipotente
descansará.

Salmos 91

Follow your bliss and the universe will open doors for you where there were
only walls.

Joseph Campbell

RESUMO

CORREIA-JÚNIOR, António Ludgero. *Efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica sobre alterações no metabolismo lipídico, remodelamento e redistribuição do tecido adiposo e sobre os marcadores inflamatórios em camundongos C57BL/6*. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A menopausa está associada a algumas alterações metabólicas como a obesidade, dislipidemia e inflamação, entre outras anomalias presentes na síndrome metabólica humana. Uma dieta hiperlipídica ou *high-fat* (HF) associada à menopausa piora tais alterações, aumentando ainda mais o risco de doença cardiovascular. A hipótese de que uma dieta HF agrava as complicações relacionadas à ovariectomia foi testada. Foram avaliadas fêmeas C57BL/6 ovariectomizadas (OVX) ou com operação SHAM e alimentados com ração padrão ou *Standard Chow* (SC, 10% de gordura) ou uma dieta HF (60% de gordura) por 18 semanas. A eficiência alimentar (EA), massa corporal (MC), distribuição regional das massas de gordura e a morfometria dos adipócitos foram estudados. As análises de sangue (colesterol total, CT, triglicerídeos, TG, citocinas e adipocinas) foram realizadas. Camundongos OVX-HF apresentaram maior EA e maior MC do que os demais grupos ($P < 0,05$). A gordura visceral (ovariana e retroperitoneal) e a gordura subcutânea (gordura inguinal) tiveram o mesmo padrão de distribuição entre os grupos SHAM-SC, SHAM-HF e OVX-SC, mas o grupo OVX-HF apresentou um padrão diferente de acúmulo de gordura - muito maior do que no grupo SHAM-SC. A associação da ovariectomia com a dieta HF aumentou significativamente o diâmetro dos adipócitos dos animais OVX-HF em comparação aos SHAM-HF ($P < 0,0001$) e também agravou a elevação dos níveis de CT, TG e de leptina nas camundongas OVX-HF, em relação aos OVX-SC ($P < 0,0001$). Os níveis de adiponectina foram maiores nas camundongas OVX-SC comparados com as das camundongas SHAM-SC e OVX-HF ($P < 0,001$). A associação da ovariectomia com a dieta HF agravou o aumento dos níveis séricos de leptina em camundongas OVX-HF, em relação aos OVX-SC ($P < 0,005$). TNF-alfa não foi diferente entre os grupos, mas a IL-6 foi significativamente maior nas camundongas OVX-HF comparados a ambos os grupos SHAM-HF e OVX-SC ($P < 0,0001$). Concluindo, a ingestão de uma dieta hiperlipídica por camundongas ovariectomizadas, leva ao aumento do acúmulo e redistribuição inadequada de gordura, à piora dos níveis de citocinas e adipocinas, assim como à desordem metabólica, o que aumenta os fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Ovariectomia. Camundongos. Dieta Hiperlipídica. Obesidade. Inflamação.

ABSTRACT

Menopause is associated with some metabolic disorders as dyslipidemia, obesity and inflammation among others abnormalities present in the human metabolic syndrome. High-fat diet (HFD) is associated with menopause enhanced menopause alterations, increasing the risk of cardiovascular disease. The hypothesis that a high-fat (HF) diet aggravates ovariectomy-related complications was tested. SHAM and ovariectomized (OVX) C57BL/6 mice fed standard chow (SC, 10% fat) or a HF diet (60% fat) for 18 weeks were studied. Feed efficiency (FE), body mass (BM), regional fat pad masses distribution and adipocyte morphometry were studied. Blood analyses (total cholesterol, TC, triglycerides, TG, cytokines and adipokines) were performed. OVX-HF mice had greater FE and BM than all other groups ($P < 0.05$). Visceral fat (ovarian and retroperitoneal fat pads) and the subcutaneous fat (inguinal fat pad) varied with a parallel pattern of fat accumulation in SHAM-SC, SHAM-HF and OVX-SC, but OVX-HF had different pattern of fat accumulation much greater than in SHAM-SC. The association of ovariectomy with HF diet increased significantly the adipocyte diameter in OVX-HF in comparison with SHAM-HF mice ($P < 0.0001$) and also aggravated the increment of TC, TG and leptin levels in OVX-HF mice in comparison to OVX-SC mice ($P < 0.0001$). Adiponectin levels were higher in OVX-SC mice compared to both SHAM-SC and OVX-HF mice ($P < 0.001$). The association of ovariectomy with HF diet aggravated the increase of serum leptin levels in OVX-HF mice in relation to OVX-SC mice ($P < 0.005$). TNF- α was not different among the groups, but IL-6 was markedly higher in OVX-HF mice than in both SHAM-HF and OVX-SC mice ($P < 0.0001$). In conclusion, high-fat diet intake worsens, in ovariectomized mice, the fat accumulation and redistribution as well as the cytokines and adipokines levels, and metabolic disorder, which increases risk factors for cardiovascular diseases.

Keywords: Ovariectomy. Mice. High-fat diet. Obesity. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de distribuição da gordura corporal	23
Figura 2	Obesidade altera os componentes do tecido adiposo	25
Figura 3	Fotomicrografia de esfregaço vaginal	36
Figura 4	Avaliação da massa uterina	37
Figura 5	Evolução da massa corporal	39
Figura 6	Avaliação da distribuição da gordura corporal	42
Figura 7	Vista ventro abdominal do camundongo	43
Figura 8	Avaliação do diâmetro médio dos adipócitos	44
Figura 9	Fotomicrografias dos adipócitos ovarianos	45
Figura 10	Avaliação dos níveis séricos de colesterol total	47
Figura 11	Avaliação dos níveis séricos de triglicérides	48
Figura 12	Avaliação dos níveis séricos de adiponectina	49
Figura 13	Avaliação dos níveis séricos de leptina	50
Figura 14	Avaliação dos níveis séricos de TNF- α	51
Figura 15	Avaliação dos níveis séricos de IL-6	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das dietas experimentais	33
Tabela 2	Dados biométricos dos grupos experimentais	38
Tabela 3	Avaliação da influencia da ovariectomia e da dieta hiperlipídica	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácido graxo livre
RA	Receptor de andrógenos
Aro	Aromatase
PCr	Proteína C-reativa
CT	Colesterol total
DCV	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EA	Eficiência alimentar
RE	Receptor de estrógenos
FVB	Cepa de camundongo sensível ao vírus da leucemia Friend tipo B
GLUT4	Transportador de glicose 4
HF/ HFD	Dieta <i>high-fat</i> ou hiperlipídica
IL-6	Interleucina-6
MC	Massa corporal
OVX	Cirurgia de ovariectomia

OVX-HF	Grupo ovariectomizado e alimentado com dieta hiperlipídica
OVX-SC	Grupo ovariectomizado e alimentado com dieta padrão
RP	Receptor de progesterona
RI	Resistência à insulina
SC	<i>Standard chow</i> ou dieta padrão
SHAM	Cirurgia Sham
SHAM-HF	Grupo com cirurgia Sham e alimentado com dieta hiperlipídica
SHAM-SC	Grupo com cirurgia Sham e alimentado com dieta padrão
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
TG	Triglicérido
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
u.a.	Unidade arbitrária

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Menopausa	18
1.2	Tecido adiposo	19
1.2.1	<u>Tecido visceral e tecido adiposo subcutâneo</u>	20
1.2.2	<u>Função endócrina do tecido adiposo</u>	20
1.3	Menopausa e obesidade	21
1.4	Obesidade e inflamação	24
1.4.1	<u>Leptina</u>	26
1.4.2	<u>Adiponectina</u>	27
1.4.3	<u>Fator de necrose tumoral-alfa</u>	28
1.4.4	<u>Interleucina-6</u>	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	METODOLOGIA	31
3.1	Animais e desenho experimental	31
3.1.1	<u>Ovariectomia</u>	31
3.1.2	<u>Dieta experimental</u>	32
3.1.3	<u>Controle da massa corporal, ingestão e eficiência alimentar</u>	33
3.1.4	<u>Morte dos animais</u>	34
3.2	Análise bioquímica	34
3.3	Morfometria do adipócito	35
3.4	Análise estatística dos dados	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Menopausa induzida cirurgicamente	36
4.2	Ingestão e eficiência alimentar	38
4.3	Massa corporal	39
4.4	Tecido adiposo	41
4.4.1	<u>Diâmetro dos adipócitos</u>	44

4.5	Perfil lipídico	46
4.6	Adipocinas e citocinas	49
4.6.1	<u>Adipocinas</u>	49
4.6.2	<u>Citocinas</u>	51
4.7	Interações entre ovariectomia e dieta	53
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO I – Comitê de ética em pesquisa.....	67
	ANEXO II – Carta de submissão ao <i>American Journal of Obstetrics & Gynecology</i>	68

INTRODUÇÃO

A menopausa é um dos períodos críticos na vida da mulher, que se caracteriza pela diminuição da produção dos hormônios ovarianos em decorrência da idade. A obesidade em mulheres na pós-menopausa tem sido associada a uma gama de distúrbios metabólicos, que incluem a dislipidemia, resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica e um risco maior de desenvolver doenças cardiovasculares (You, Ryan *et al.*, 2004; Kaaja, 2008). A ovariectomia (OVX) é um modelo já bem conhecido para imitar a menopausa humana e estudar as consequências metabólicas após a perda da função ovariana (Rogers, Perfield *et al.*, 2009). Estudos em camundongos demonstraram que a remoção dos hormônios ovarianos por meio da ovariectomia aumenta a susceptibilidade para o desenvolvimento da obesidade (Hong, Stubbins *et al.*, 2009) e suas comorbidades associadas, e em particular a inflamação.

O sobrepeso e a obesidade são importantes fatores de risco para uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, que atualmente estão significativamente em ascensão nos países de baixa e média renda, especialmente em áreas urbanas (Kelly, Yang *et al.*, 2008; Dixon, 2010). A obesidade está associada ao aumento excessivo de tecido adiposo visceral, mais especificamente no tamanho dos adipócitos, e afeta muito a funcionalidade do tecido adiposo (Heber; Gimeno e Klamann, 2005). Uma das funções do tecido adiposo branco é o controle da homeostase energética, armazenando triglicerídeos (TG) durante o período pós-prandial e liberando ácidos graxos quando o gasto energético for maior que a energia consumida. Outra função do tecido adiposo branco está associada ao metabolismo da glicose no fígado e em outros tecidos, catabolizando TG e liberando glicerol e ácidos graxos. O tecido adiposo é também um órgão endócrino que secreta uma variedade de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, incluindo as adipocinas leptina e adiponectina, bem como citocinas, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) implicados na modulação da sensibilidade à insulina (Vazquez-Vela, Torres *et al.*, 2008) e da inflamação (Fantuzzi, 2005). A resistência à insulina (RI), o excessivo fluxo de ácidos graxos e a inflamação

crônica sistêmica são algumas das desordens presentes na síndrome metabólica e que são responsáveis pelos seus efeitos patológicos (Gallou-Kabani, Vige *et al.*, 2007).

A obesidade pode ser induzida por consumo de alimentos de altos valores energéticos, como os denominados de *fast food*. Estudos em roedores mostraram que a ingestão de dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas pode levar a obesidade induzida por dieta e desordens metabólicas que se assemelham à síndrome metabólica de humanos (Buettner, Scholmerich *et al.*, 2007). Camundongos C57BL/6J ficam mais susceptíveis à obesidade por dieta quando alimentadas com dieta hiperlipídicas em que 60% da sua energia total é proveniente de lipídios (Gallou-Kabani, Vige *et al.*, 2007). Com isso, eles podem representar um bom modelo para estudar a síndrome metabólica em um curto período de tempo.

Assim sendo, este estudo foi realizado com o objetivo de investigar a hipótese de que a interação da obesidade induzida por dieta com a menopausa cirúrgica leva a um prejuízo no metabolismo lipídico, na morfologia do tecido adiposo, nas adipocinas e nas citocinas inflamatórias em camundongas C57BL/6.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Menopausa

A menopausa é um termo usado para descrever a cessação da função menstrual (último período fisiológico do ciclo menstrual) e o término da capacidade reprodutiva feminina. Na prática clínica, é diagnosticada de forma retrospectiva quando a paciente não observar regularmente a menstruação por pelo menos doze meses consecutivos (Kirchengast, Gruber *et al.*, 1999; Lund, 2008). A menopausa é decorrente do envelhecimento dos ovários devido à exaustão dos folículos ovarianos, levando à infertilidade e a progressiva perda da sua atividade hormonal (Wise, Krajnak *et al.*, 1996; Greendale e Sowers, 1997). O déficit na produção de estrogênio é o principal evento fisiopatológico responsável pelas consequências da menopausa. Além dos sintomas já bem conhecidos, como as “ondas de calor”, aumento da sudorese e insônia, a deficiência de estrogênio leva também ao desenvolvimento de algumas doenças crônicas. Doenças essas que incluem a osteoporose e a síndrome metabólica (SM) e suas consequências, tais como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) (Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009; Rachon e Teede, 2010). Alguns autores afirmam que a ovariectomia (OVX, cirurgia para a remoção dos ovários) consiste em uma abordagem bem caracterizada para mimetizar o estado pós-menopáusicos tanto em camundongos como em humanos, apresentando-se como um bom modelo de estudo para as consequências metabólicas da perda das funções ovarianas na menopausa (Hong, Stubbins *et al.*, 2009; Rogers, Perfield *et al.*, 2009).

Os estrógenos compreendem um grupo de hormônios esteróides com 18 carbonos e constituem um grupo importante de hormônios sexuais femininos. São secretados principalmente pelos ovários e, em menor parte pelas adrenais. As formas naturais dos estrógenos são 17 β -estradiol, estrona e estriol. Estradiol está envolvido em várias funções fisiológicas, incluindo no desenvolvimento,

crescimento, homeostase energética, e fisiologia reprodutiva. A sua secreção é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O estradiol é o principal esteróide em humanos e tem maior ação do que estrona e estriol. Circula em maiores níveis e é um potente ativador dos receptores de estrogênio (REs) (Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009; Shi e Clegg, 2009). As ações fisiológicas do estrógeno são mediadas pelos REs (RE α e RE β), que são fatores de transcrição nucleares ativados por ligantes. O RE α é necessário para as ações genômicas do estradiol na regulação do peso corporal e RE β atua mais como um modulador das ações do estrógeno (Shi e Clegg, 2009).

A falta de ativação do RE altera o metabolismo da glicose e lipídico na mulher pós-menopáusicas, o que leva a um aumento na adiposidade visceral, resistência à insulina (RI) e aumento no risco de DCV (Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009). A mulher pré-menopáusicas parece estar protegida do risco de DCV comparada a homens na mesma idade. Contudo, por volta dos 70 anos de idade, a sua incidência se iguala para ambos os sexos, sugerindo a deficiência de estrógeno como o principal fator desencadeador (Manco, Nolfi *et al.*, 2006). Adicionalmente, a diminuição dos níveis de estrógeno associada a outros fatores, como o déficit nos níveis de andrógeno e hormônio de crescimento, mudanças no estilo de vida e atividade física resultam em ganho de peso e alterações marcantes na distribuição da gordura, principalmente na região central, típico da mulher pós-menopáusicas (Kirchengast, Gruber *et al.*, 1999; You, Ryan *et al.*, 2004; Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009).

1.2 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo que regula tanto a homeostase energética como vários outros processos (Flier, 2004), como a inflamação. Nos mamíferos existem dois tipos de tecido adiposo e são caracterizados segundo a sua estrutura celular, localização, cor, vascularização e função: tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom (Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2006). O tecido adiposo branco é o principal local de armazenamento de energia, sob a forma de TGs dentro de gotículas de gordura nos adipócitos,

enquanto que o tecido adiposo marrom adipócitos multilocular ou células com várias gotículas de gordura (Gesta, Tseng *et al.*, 2007). O papel principal do tecido adiposo branco é de armazenar TG durante a fase de consumo energético e de liberar ácidos graxos livres (AGL) quando o gasto energético supera o consumo energético (Vazquez-Vela, Torres *et al.*, 2008). O tecido adiposo branco que se encontra distribuído na região abdominal ou na região visceral (padrão andróide), acarreta um risco muito maior para desordens metabólicas do que o tecido adiposo distribuído subcutaneamente (padrão ginóide) e cuja distribuição está fracamente correlacionada com o risco metabólico (Shi e Clegg, 2009).

1.2.1 Tecido adiposo visceral e tecido adiposo subcutâneo

O tecido adiposo intra-abdominal ou visceral é metabolicamente e funcionalmente diferente do subcutâneo, e é caracterizado por ter relativamente mais capilares e axônios simpáticos eferentes por unidade de volume do que o subcutâneo. A obesidade visceral possui características adipogênicas, metabólicas, pró-aterogênica, e pró-trombótica (Trayhurn, 2005). A gordura visceral pode ser mobilizada rapidamente para respostas a desafios energéticos de curto prazo. Por conseguinte, uma das razões para armazenar gordura no depósito visceral, onde a atividade lipolítica é maior, é torná-lo mais acessível para as atividades específicas intermitentes (Shi e Clegg, 2009).

O tecido adiposo subcutâneo está disperso dentro de uma ampla área embaixo da pele, é relativamente pouco vascularizado, e se destina para a captação de ácidos graxos e armazenamento do excesso de calorías em ambos os sexos (Shi e Clegg, 2009). A baixa atividade lipolítica da gordura subcutânea permite a esse depósito de gordura responder a desafios metabólicos crônicos, tal como ocorre durante a gestação e a lactação nas fêmeas (Shi e Clegg, 2009).

1.2.2 Função endócrina do tecido adiposo

O tecido adiposo é um órgão complexo, essencial e, com funções metabólicas e endócrinas altamente ativas. Além de adipócitos, o tecido adiposo contém matriz de tecido conjuntivo, tecido nervoso, células estromovasculares e células do sistema imunológico. Juntos, esses componentes funcionam como uma unidade integrada. O tecido adiposo não só responde aos sinais aferentes do sistema hormonal tradicional e do sistema nervoso central, mas também expressa e secreta fatores com importantes funções endócrinas (Kershaw e Flier, 2004). Esses fatores incluem adiponectina, leptina, resistina, fator de necrose tumoral alfa, interleucina-6, interleucina-8 e visfatina (Wintour e Henry, 2006). As adipocitocinas influenciam em uma variedade de processos fisiológicos, tais como o controle da ingestão alimentar, homeostase energética, sensibilidade à insulina, angiogênese, proteção vascular, regulação da pressão arterial e coagulação sanguínea. (Havel, 2004). A função endócrina do tecido adiposo é enfatizada pelas consequências metabólicas adversas de ambos o excesso e a deficiência de tecido adiposo (Kershaw e Flier, 2004).

1.3 Menopausa e obesidade

A menopausa está relacionada com o desenvolvimento da obesidade, uma vez que a queda brusca dos níveis de estrógeno sérico na pós-menopausa promove ganho de peso (principalmente por aumento da massa gorda) e alterações no padrão de distribuição do tecido adiposo (Carr, 2003; Rachon e Teede, 2010). O padrão de acumulação da gordura é diferente entre mulheres e homens. Geralmente, as mulheres tendem a acumular gordura na região glútea, desenvolvendo obesidade periférica ou “ginóide”, enquanto que os homens tendem a acumular gordura na região abdominal, caracterizando a obesidade central ou andróide. Contudo, mulheres pós-menopáusicas apresentam mudança no padrão de distribuição da gordura de forma ginóide para andróide (Regitz-Zagrosek, Lehmkuhl *et al.*, 2006). A obesidade andróide é uma das principais características da SM e está relacionada com o aumento de risco cardiovascular e desenvolvimento de DM2. Resultados da maioria dos estudos sugerem que a menopausa tenha um grande impacto na deposição de gordura abdominal

(Rachon e Teede, 2010). Isso pode estar relacionado com a diminuição de atividade física e consequente diminuição de gasto energético. O baixo gasto energético associado ao aumento ou desbalanceamento na ingestão alimentar leva a um balanço energético positivo, o que favorece o aumento da gordura corporal total e, possivelmente, a adiposidade central (Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009). Estudos com roedores OVX vêm reforçar o papel do estrógeno na regulação da atividade física e no ganho de massa corporal. Ratas OVX que apresentaram diminuição da atividade física recuperaram o nível de atividade física que tinham antes da ovariectomia, após tratamento com doses fisiológicas de estrógeno (Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009). Outro estudo realizado em fêmeas de camundongo revelou que a OVX está associada à diminuição do gasto energético e consequente ganho de peso (Rogers, Perfield *et al.*, 2009). Dados mostram que a OVX leva a ganho de peso e aumento no acúmulo de tecido adiposo visceral, que caracteriza a obesidade (Nunez, Carpenter *et al.*, 2007; Nunez, Perkins *et al.*, 2008; Hong, Stubbins *et al.*, 2009; Rogers, Perfield *et al.*, 2009; Rachon e Teede, 2010). Além disso, estudo em camundongos C57BL/6 mostrou que tanto fêmeas pré-menopáusicas como pós-menopáusicas ganham peso quando alimentadas com dieta rica em gordura; contudo, as fêmeas OVX ganham mais peso, em específico na forma de tecido adiposo (Hong, Stubbins *et al.*, 2009).

A quantidade de tecido adiposo visceral varia inversamente com os níveis de estrógeno, isto é, o acúmulo de tecido adiposo visceral ocorre quando os níveis de estrógeno se tornam suficientemente baixos. Isso acontece provavelmente através de efeitos direto do estrógeno, uma vez que os receptores dos hormônios sexuais, inclusive da progesterona e andrógeno (RP e RA, respectivamente), bem como o RE, estão expressos no tecido adiposo. A distribuição dos receptores de hormônios sexuais é diferente no tecido adiposo visceral e no tecido adiposo subcutâneo. RE e RP se encontram em maiores concentrações no tecido adiposo subcutâneo nas fêmeas, enquanto que RA se encontra em maior concentração no tecido adiposo visceral de ambos os sexos. Além do fato do tecido adiposo subcutâneo possuir poucos receptores de andrógeno, o estrógeno regula negativamente a expressão do RA no tecido adiposo subcutâneo (Regitz-Zagrosek, Lehmkuhl *et al.*, 2006; Shi e Clegg, 2009). Estudos experimentais com roedores vêm mostrando a importância do estrógeno

na regulação da distribuição da gordura corporal: camundongos *knockout* para RE α ou para aromatase (Aro), enzima responsável pela biossíntese de estrógeno, apresentaram aumento de tecido adiposo branco (Ignacio, Frankenfeld *et al.*, 2009); ratas OVX apresentaram ganho de gordura, especificamente gordura visceral, com nenhuma alteração de gordura subcutânea (Clegg, Brown *et al.*, 2006); e por outro lado, administração periférica ou central de 17 β -estradiol em fêmeas OVX muda a distribuição de gordura corporal, se assemelhando à de fêmeas intactas (Shi, Seeley *et al.*, 2009) (Figura1).

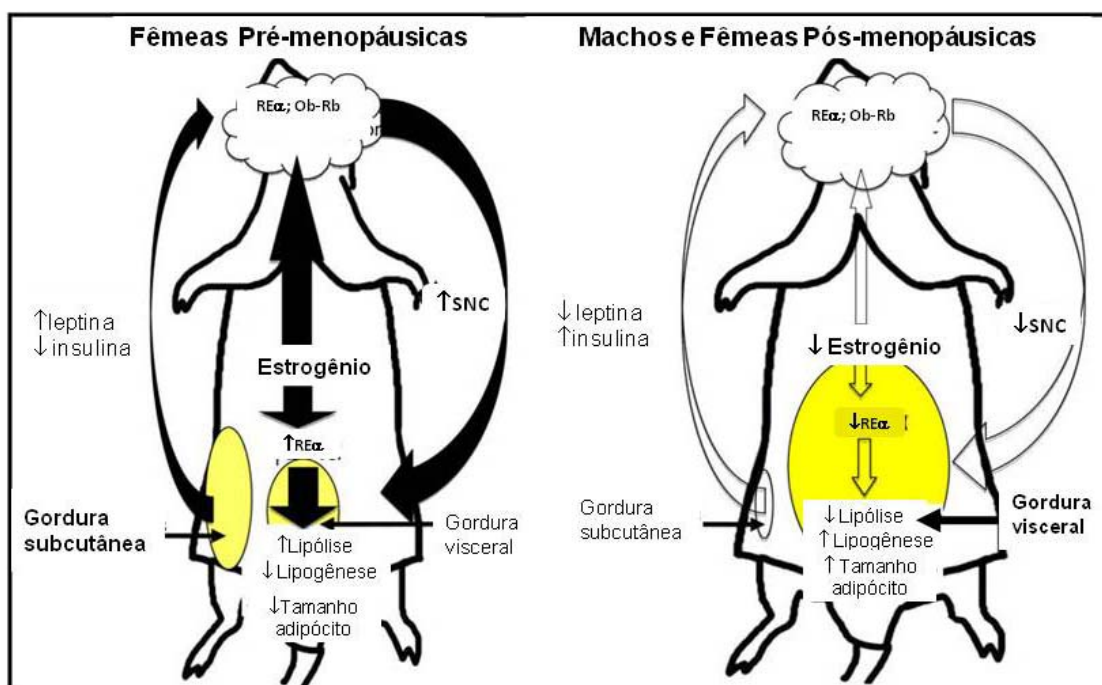


Figura 1. Modelo ilustrando como os hormônios sexuais e a adiposidade podem se interagir para regular a distribuição da gordura corporal. As fêmeas apresentam mais gordura subcutânea em relação aos machos que possuem níveis diminuídos de estrogênio e, que por seu lado, apresentam mais gordura visceral. A diminuição de estrogênio, como acontece na menopausa, está associada a um aumento da adiposidade visceral. Os receptores de estrogênio (RE) são expressos no tecido adiposo e no hipotálamo. O estrogênio regula o balanço energético e a distribuição da gordura corporal tanto pela direta interação com a via de sinalização da leptina ou através da ativação dos receptores de estrogênio. O estrogênio pode regular o metabolismo lipídico atuando diretamente sobre o receptor de estrogênio-alfa (RE α) do tecido adiposo visceral. A interação do estrogênio com a leptina pode influenciar na adiposidade, e possivelmente aumentando a ativação da leptina induzida pelo sistema nervoso simpático que enerva o tecido adiposo visceral, diminuindo dessa forma o acúmulo do depósito de gordura visceral. Além disso, o tecido adiposo subcutâneo, que representa a maior porcentagem de depósito de tecido adiposo em fêmeas, secreta a leptina que

pode ativar os receptores de leptina do sistema nervoso central (SNC), e isso pode influenciar diretamente a ativação do sistema nervoso simpático por leptina Adaptado de Shi & Clegg, 2009 (Shi, Seeley *et al.*, 2009).

1.4 **Obesidade e inflamação**

A incidência da obesidade e suas comorbidades associadas aumentaram dramaticamente em todo o mundo, tanto em crianças como em adultos. Atualmente, a prevalência da obesidade atingiu níveis epidêmicos na maioria dos países desenvolvidos, especialmente nos Estados Unidos (Choudhury e Sanyal, 2004). A obesidade é um crescente problema nas sociedades modernas, devido ao intenso estilo de vida, ingestão de carboidrato ou gordura, e reduzido gasto energético. Mais da metade dos americanos adultos estão com sobrepeso hoje (Abu-Abid, Szold *et al.*, 2002). A obesidade geralmente é responsável por muitas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica, diabetes e hiperlipidemia (Choudhury e Sanyal, 2004).

As condições de sobrepeso e obesidade representam uma significativa preocupação de saúde pública e se associam a uma série de doenças crônicas degenerativas (Cintra, Ropelle *et al.*, 2007). Em virtude da prevalência desses quadros de obesidade e levando-se em consideração os custos econômicos decorrentes dessas comorbidades associadas, evidencia-se a necessidade de melhores condutas terapêuticas e melhor compreensão dos fatores fisiológicos envolvidos no balanço energético (Enriori, Evans *et al.*, 2006).

A obesidade é uma desordem metabólica complexa e multifatorial resultante de um desequilíbrio entre ingestão e gasto energético que podem ter origens genéticas e/ou comportamentais que envolvem a quantidade e qualidade da ingestão de alimentos assim como estilo de vida (Jones, 2010). É caracterizada pelo acúmulo de lipídios em todas as células do organismo, com acentuada hipertrofia e hiperplasia das células adiposas. O consumo de altos níveis de gordura na dieta é um fator importante na promoção da obesidade em humanos assim como em animais (Bray e Popkin, 1998; Hill, Melanson *et al.*, 2000).

O estado de obesidade é caracterizado pelo que se tem sido designado de inflamação sistêmica de baixo grau. Os marcadores inflamatórios, tais como fator

de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína C-reativa (PCr), se encontram mais elevados nos indivíduos obesos quando comparados a indivíduos magros. A presença de inflamação está ligada ao aumento de risco de desenvolvimento de DCV e DM2 na obesidade, particularmente no caso de adiposidade visceral (Fantuzzi, 2005) (Figura 2).

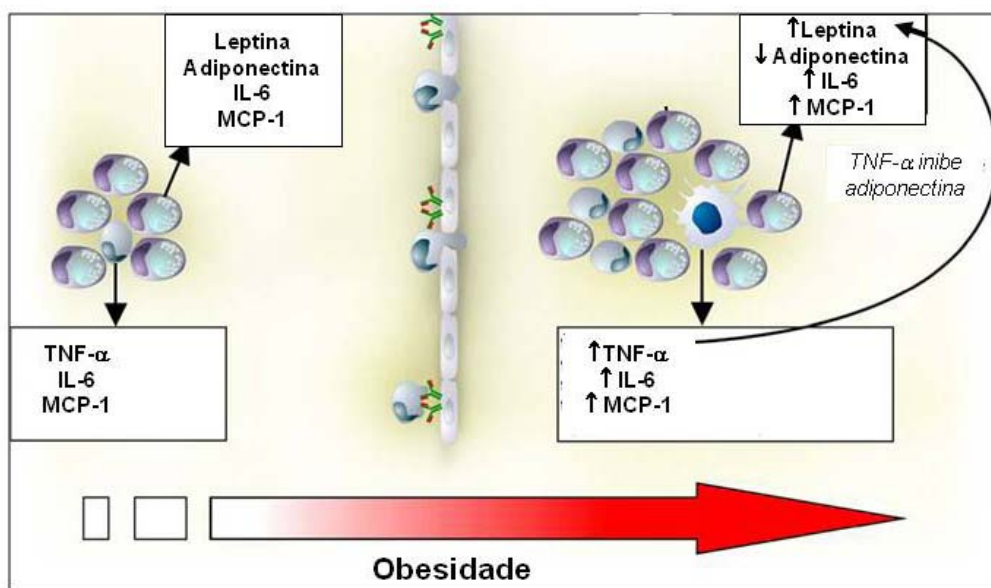


Figura 2. A obesidade altera os componentes celulares e moleculares do tecido adiposo. À esquerda, adipócitos de indivíduos magros com produção normal de citocinas e adipocinas. À direita, a obesidade leva a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos com aumento na produção de citocinas e a maioria das adipocinas. No entanto ocorre a diminuição dos níveis de adiponectina, possivelmente pelo aumento dos níveis de TNF- α . Adaptado de Fantuzzi, 2005. (Fantuzzi, 2005).

Sendo a obesidade definida como um excessivo percentual de gordura corporal em relação à massa magra, em magnitudes suficientes para ocasionar tais transtornos (Zamboni, Mazzali *et al.*, 2005), torna-se possível destacar o papel do tecido adiposo no acometimento destas disfunções, uma vez que este se configura como órgão endócrino sintetizador de inúmeras substâncias endócrinas, parácrinas e autócrinas em resposta a diferentes estímulos (Ahima e Flier, 2000; Flier, 2004; Laclaustra, Corella *et al.*, 2007). Tais substâncias são adipocitocinas e

estão envolvidas na inflamação, algumas delas, leptina, adiponectina, TNF- α e IL-6 (Hu, Qiao et al., 2004; Hutley e Prins, 2005).

1.4.1 Leptina

A leptina (do grego *leptos*, que significa magro) é uma proteína secretada pelo tecido adiposo, com peso molecular de 16 kDa e é constituída por 167 aminoácidos (Zhang, Proenca *et al.*, 1994). A leptina é codificada pelo gene *ob*, o qual é predominantemente expresso pelos adipócitos e seus níveis séricos se correlacionam diretamente com o tecido adiposo (Maffei, Fei *et al.*, 1995). É o fator chave na regulação do peso corpóreo e balanço energético, visto que ela regula o apetite e o gasto de energia via SNC (De Carvalho, Colaco *et al.*, 2006).

A concentração e expressão de leptina estão diretamente correlacionadas com a adiposidade e alterações da massa corporal e a mRNA da leptina é encontrada principalmente no tecido adiposo. A imunohistoquímica de tecido adiposo revelou a presença da leptina apenas em adipócitos maduros e pré-adipócitos (Campfield, Smith *et al.*, 1995; Bornstein, Abu-Asab *et al.*, 2000). Sugere-se que a leptina tenha um papel autócrino e parácrino, uma vez que os adipócitos também expressam os receptores desse hormônio. Sabe-se que no tecido adiposo de roedores, a leptina exerce uma função autócrina convertendo os adipócitos normais em adipócitos ricos em mitocôndrias, capazes de oxidar altas concentrações de lipídios armazenados. De fato, os adipócitos expostos a elevadas concentrações de leptina conseguem diminuir em até 95% da sua gordura.

A leptina atua nas respostas imunológica e inflamatória protegendo os linfócitos T de entrar em apoptose, e influencia na ativação de monócitos, na fagocitose e na produção de citocinas. Em experiências com animais, estímulos inflamatórios induzem agudamente o mRNA e aumenta os níveis de leptina. Todavia, isso não acontece sempre em humanos (Fantuzzi e Faggioni, 2000; Farooqi, Matarese *et al.*, 2002; Sanchez-Margalet, Martin-Romero *et al.*, 2003; La Cava, Alviggi *et al.*, 2004). A deficiência de leptina está associada à redução da inflamação em modelos de doenças autoimunes, ao aumento da susceptibilidade a toxicidade do estímulo pró-inflamatório, tais como as endotoxinas e TNF- α . Esse

efeito talvez seja intermediado pela atividade da leptina nos rins. Contudo, é de consenso que a leptina exerce um papel pró-inflamatório (Faggioni, Jones-Carson *et al.*, 2000; Mancuso, Gottschalk *et al.*, 2002; Kanda, Takahashi *et al.*, 2004; Wang, Poole *et al.*, 2004).

1.4.2 Adiponectina

A adiponectina é expressa exclusivamente pelo tecido adiposo, demonstrando importantes efeitos sobre o metabolismo. Embora a adiponectina seja expressa principalmente pelo tecido adiposo, os níveis séricos de adiponectina não aumentam com a obesidade. Os níveis séricos de adiponectina tendem a diminuir em indivíduos obesos e significativamente reduzidos em pacientes com DM2. Sugere-se que indivíduos com altas concentrações de adiponectina circulantes estão menos propensos a desenvolver DM2, relativamente àqueles com baixas concentrações (Ouchi, Kihara *et al.*, 1999; Chandran, Phillips *et al.*, 2003; Spranger, Kroke *et al.*, 2003).

A adiponectina melhora a resistência à insulina, diminui o influxo de ácidos graxos não esterificados, e aumenta a oxidação de ácidos graxos no fígado e nos músculos (Kershaw e Flier, 2004). Ela também está envolvida na translocação do transportador de glicose (GLUT4) nos músculos e no fígado (Kadowaki e Yamauchi, 2005). A adiponectina tem efeitos benéficos nas suas células alvo, e a sua secreção e a presença dos seus receptores estão bem diminuídas em animais e humanos obesos, produzindo efeitos deletérios. Em humanos, os níveis séricos de adiponectina estão inversamente correlacionados com a resistência à insulina e com a síndrome metabólica (Yatagai, Nagasaka *et al.*, 2003).

A adiponectina desempenha uma função anti-inflamatória, reduzindo a produção e atividade de TNF- α , inibe a produção de IL-6 acompanhado pela indução da citocina anti-inflamatória IL-10 e receptor antagonista de IL-1 (Kappes e Loffler, 2000; Fantuzzi, 2008).

1.4.3 Fator de Necrose Tumoral alfa

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida tanto pelo tecido adiposo, como pelos músculos e tecido linfóide, cuja expressão se encontra elevada na obesidade (Costa e Duarte, 2006). Representa um produto dos macrófagos relacionado a distúrbios metabólicos e processos crônicos de inflamação (Coppack, 2001).

Sugere-se que pelo fato de que estratégias terapêuticas anti-TNF- α serem ineficazes no tratamento das alterações no metabolismo de carboidratos, o TNF- α produzido pelos adipócitos desempenha funções autócrina ou parácrina. Além disso, a produção de TNF- α pelos adipócitos responde a poucos estímulos imunológicos, reforçando assim a hipótese de sua função metabólica (Costa e Duarte, 2006). Esta citocina inibe a sinalização de insulina, diminuindo a expressão de GLUT4 na superfície celular, e conseqüentemente levando à resistência à insulina. Roedores tratados com dieta hiperlipídica apresentam aumento nos níveis de TNF- α , sendo considerado o provável mediador da resistência à insulina e DM2 associados à adiposidade visceral (Hotamisligil, Murray *et al.*, 1994). O TNF- α regula negativamente a produção de adiponectina, levando a perpetuação da inflamação, regula a liberação de PCr pelo fígado e aumenta os níveis plasmáticos de PCr (Hong, Yoo *et al.*, 2007).

1.4.4 Interleucina-6

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente pelo tecido adiposo. Estima-se que o tecido adiposo branco contribui com cerca de 30% da IL-6 circulantes, sendo que a gordura visceral produz maior quantidade do que a gordura subcutânea (Cottam, Mattar *et al.*, 2004; Costa e Duarte, 2006).

A IL-6 também é secretada ao nível do hipotálamo onde se sugere que desempenha um papel na regulação do apetite e gasto energético. Também se

sugere que tenha um papel no metabolismo de carboidratos, uma vez que inibe a lipoproteína lipase, induz a lipólise e aumenta a captação de glicose. A IL-6 encontra-se em altas concentrações no soro, tecido adiposo branco ou em ambos, nos indivíduos obesos (Prins, 2002; Berg e Scherer, 2005). Os níveis séricos de IL-6 estão diretamente correlacionados com o aumento da massa corporal, e inversamente à sensibilidade à insulina (Fried, Bunkin *et al.*, 1998; Cottam, Mattar *et al.*, 2004). A IL-6 exerce efeitos estimulantes sobre linfócitos T e B, favorecendo assim respostas a inflamações crônicas (Gabay, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma dieta hiperlipídica associada à menopausa induzida cirurgicamente na massa corporal, no metabolismo lipídico, no remodelamento do tecido adiposo, nas adipocinas e das citocinas inflamatórias em camundongas C57BL/6.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir as fêmeas C57BL/6 à menopausa por meio da cirurgia de ovariectomia;
- Induzir os animais à obesidade por ingestão de dieta rica em gordura;
- Avaliar os efeitos da cirurgia e da dieta hiperlipídica sobre:
 - A massa corporal;
 - A ingestão alimentar e eficiência alimentar;
 - As alterações estruturais e morfométricas do tecido adiposo;
 - Os níveis séricos de lipídios, citocinas e adipocinas.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e desenho experimental

O estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes do *Care Use of Laboratory Animals* (US National Institutes of Health 85-23, revised 1996). A manipulação e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética dos animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (CEA/007/2010).

Vinte camundongas virgens da linhagem C57BL/6, com quatro semanas de idade, foram mantidas sob condições normais de luz (12h/ciclo escuro), temperatura (21 ± 2 °C), umidade ($60 \pm 10\%$) e ciclo de exaustão de ar. Tiveram livre acesso à água e ração padrão para roedores (produzido por PragSoluções, Jaú, SP, Brasil, de acordo com as recomendações da AIN-93G) (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993).

3.1.1 Ovariectomia

Com 12 semanas de idade, os animais foram anestesiados (injeção intraperitoneal de uma mistura 1:1 de cloridrato de cetamina, Dopalen, 50 mg/kg e cloridrato de xilazina, Anasedan, 5 mg/kg, Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), sob condições assépticas e submetidas à cirurgia de ovariectomia (grupo OVX) ou cirurgia Sham (grupo SHAM). O procedimento cirúrgico foi realizado através de uma pequena incisão na posição ventral da linha média abdominal. Os cornos uterinos foram expostos, as suas extremidades foram atadas e os ovários foram removidos. O útero ficou intacto. Em seguida, a parede abdominal foi suturada. Depois da cirurgia, as camundongas foram mantidas sob ótimas condições para recuperação. Na cirurgia Sham, os animais foram anestesiados e a parede

abdominal foi aberta de forma semelhante das camundongas OVX; os ovários foram exteriorizados para criar um estresse semelhante, mas não foram removidos (Marques, Nascimento *et al.*, 2006). Exame citológico do esfregaço vaginal foi realizado duas vezes durante o experimento: depois de um período de duas semanas de repouso para verificar a menopausa cirurgicamente induzida, e nas vésperas do período de abate para se certificar de que todos os animais estavam sendo mortos na mesma fase do ciclo estral. Após a morte, a massa uterina foi aferida para, também, se certificar do sucesso da ovariectomia.

3.1.2 Dieta experimental

Depois de um período de uma semana de repouso, cada grupo (SHAM e OVX) foi novamente randomizado em dois novos grupos com base no tipo de dieta oferecido: camundongas alimentadas com a dieta padrão (SC) formaram os grupos SHAM-SC e OVX-SC, e as camundongas alimentadas com ração rica em gordura (HF) formaram os grupos SHAM-HF e OVX-HF (n=5/grupo). As dietas foram produzidas por Pragsoluções (Jaú, São Paulo, Brasil, www.pragsolucoes.com.br), em conformidade com as recomendações da AIN-93M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993). A composição da dieta está detalhada na Tabela 1. O conteúdo de vitaminas e minerais de ambas as dietas foi idêntico.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais. Mix de vitamina e mix de mineral estão de acordo com as recomendações da AIN-93.

Conteúdo (g/Kg)	Dietas	
	SC	HF
Caseína ($\geq 85\%$ de proteína)	140,0	190,0
Maisena	620,7	250,7
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	320,0
Fibra	50,0	50,0
Mix vitamina	10,0	10,0
Mix mineral	35,0	35,0
L-Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Gramatura total	1,000	1,000
Conteúdo energético (Kcal/Kg)	3,80	5,40
Carboidratos (%)	76	26
Proteína (%)	14	14
Lípido (%)	10	60

3.1.3

SC, dieta padrão ou *standard chow*; HF, dieta hiperlipídica ou *high-fat diet*.

Controle da massa corporal, ingestão e eficiência alimentar

Cada camundongo foi numerado (marcação na cauda com marcador permanente) e pesado semanalmente durante o período experimental (18 semanas). O consumo alimentar foi medido diariamente. Comida fresca foi fornecida diariamente e toda a sobra do dia anterior foi pesada e descartada. O

consumo alimentar foi determinado como a diferença entre o alimento fornecido e a sobra deixada na grade. O consumo energético foi o produto do consumo alimentar (g) pela energia da dieta (kcal). A eficiência alimentar (EA) foi determinada como porcentagem da ração entre o ganho de massa corporal (g) e consumo energético (kcal) por animal, após 18 semanas com as respectivas dietas.

3.1.4 Morte dos animais e coleta de materiais

Na 30^a semana de idade, os animais foram privados de alimentos por seis horas e depois foram profundamente anestesiados (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150 mg/kg). Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca para análises posteriores. Os depósitos de gordura retroperitoneal (em torno de cada rim e ao longo dos músculos lombares), gordura ovariana (ao redor da bexiga, útero e ovários) e gordura inguinal (os dois depósitos superficiais, debaixo da pele, e anterior ao segmento superior dos membros posteriores) foram cuidadosamente retirados, pesados, e em seguida fixados (formaldeído 4% recém-preparado [wt/vol] em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 48 horas).

3.2 **Análise bioquímica**

O soro foi obtido por centrifugação (120 g por 20 minutos) à temperatura ambiente. Os níveis séricos de colesterol total (CT) e triglicérido (TG) foram determinados pelo ensaio colorimétrico em um analisador bioquímico semiautomático (Bioclin Systems II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os níveis séricos de citocinas e adipocinas foram determinados usando a tecnologia de imunoenensaio, na placa de Multiplex, de acordo com as recomendações do fabricante (MILLIPLEX *mouse adiponectin and mouse cytokine/chemokine panel, 4 Plex*; Millipore, St Quentin en Yveline, França).

3.3 Morfometria do adipócito

Após a fixação do tecido adiposo (anteriormente descrito) os depósitos de gordura ovariana passaram por processamento de rotina para microscopia de luz, incluídas em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), seccionados a 5 μm de espessura e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Imagens digitais dos cortes histológicos foram adquiridas aleatoriamente com uma câmera LC Evolution acoplada a um microscópio Olympus BX51 com objetiva de 40x. As fotomicrografias foram armazenadas com as seguintes especificações: formato TIFF, 36 bits de cor, 1280x1024 pixels. O diâmetro dos adipocitos foi mensurado utilizando o software Image-Pro Plus, versão 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para cada adipócito, o maior e o menor diâmetro foram medidos considerando o ponto médio e o diâmetro médio foi determinado (Mandarim-De-Lacerda, Fernandes-Santos *et al.*, 2010). Foram analisados 50 adipócitos por animal.

3.4 Análise estatística dos dados

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e testados para confirmar a homocedasticidade das variâncias. Quando a homocedasticidade foi confirmada, as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de análise de variância (ANOVA) univariada ou *one-way* seguido de pós-teste de Tukey. O teste Anova bivariada ou *two-way* foi utilizado para avaliar a influência da interação entre as dietas e a ovariectomia sobre os parâmetros estudados. Todas as análises e gráficos foram feitos com o GraphPad Prism versão 5.3 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas para o valor de $P \leq 0,05$ em todas as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 Menopausa induzida cirurgicamente

Como confirmação do êxito da menopausa induzida cirurgicamente, foram analisadas a citologia vaginal e a massa do útero. O ciclo estral das camundongas SHAM se manteve normal, enquanto que nas camundongas OVX, o esfregaço vaginal evidenciou a predominância de leucócitos, caracterizando a fase diestro do ciclo estral dos roedores (Figura 3) e a massa do útero foi menor nessas fêmeas em relação às fêmeas SHAM ($P \leq 0,0001$; análise de variância univariada) caracterizando a atrofia uterina (Figura 4). A ovariectomia influenciou em 85,4% na diminuição da massa uterina das fêmeas OVX ($P = 0,0001$; análise de variância bivariada, tabela 3).

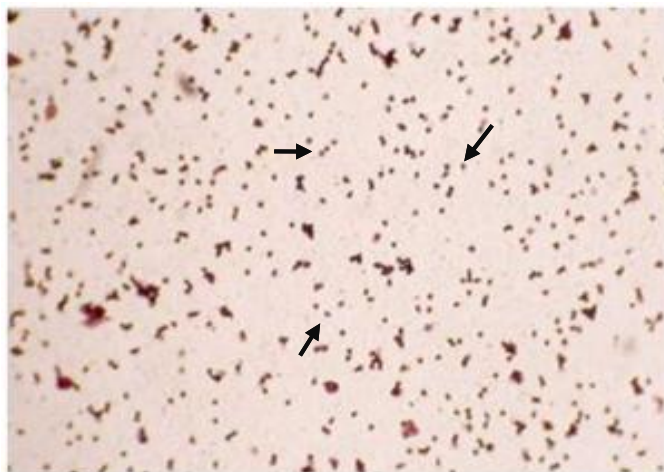


Figura 3. Fotomicrografia de esfregaço vaginal de uma fêmea ovariectomizada. Lâmina corada pelo método de Shorr. Pode-se observar a predominância de leucócitos (setas), o que caracteriza a fase Diestro do ciclo estral dos roedores. Objetiva de 20X.

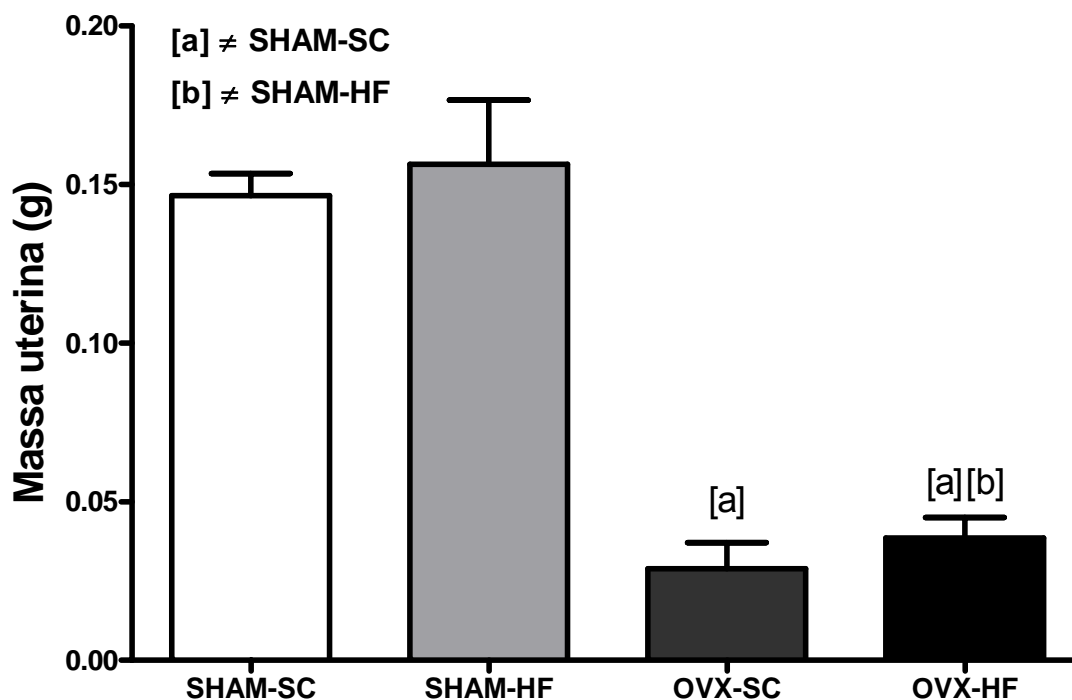


Figura 4. Massa uterina (g) dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b] versus SHAM-HF. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

4.2 Ingestão e eficiência alimentar

A ingestão alimentar diária das camundongas SHAM-HF e camundongas OVX-HF foi significativamente menor em comparação com os seus respectivos grupos SC-pareados (menos 15% em SHAM-SC vs. SHAM-HF, $P < 0,0001$; e menos 14% em OVX-SC vs. OVX-HF, $P < 0,0001$). No entanto, a ingestão energética diária foi significativamente maior nas camundongas SHAM-HF e nas camundongas OVX-HF do que nas camundongas SHAM-SC e OVX-SC (mais de 21%, $P < 0,0001$) devido ao maior teor energético da dieta HF (5,4 Kcal/g) em comparação à dieta SC (3,8 Kcal/g). Como confirmação do registo da obesidade induzida pela dieta HF apenas em camundongas OVX, a eficiência alimentar foi significativamente maior nas camundongas OVX-HF ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Dados biométricos dos grupos experimentais.

Parâmetro	Grupos			
	SHAM-SC	SHAM-HF	OVX-SC	OVX-HF
Massa corporal (g) 18 ^a semana	21,73 ± 0,26	22,97 ± 0,58	23,66 ± 0,50	29,68 ± 1,22 ^{a,b,c}
Ingestão alimentar (g)/dia/animal	2,27 ± 0,03	1,94 ± 0,04 ^a	2,21 ± 0,04	1,89 ± 0,04 ^c
Ingestão energética (g)/dia/animal	8,63 ± 0,13	10,46 ± 0,21 ^a	8,41 ± 0,17	10,22 ± 0,24 ^c

Eficiência alimentar (u.a.)	0,24 ± 0,10	0,39 ± 0,10	0,26 ± 0,15	0,82 ± 0,19 ^{a,c}
-----------------------------	-------------	-------------	-------------	----------------------------

ANOVA uni-variada com pós-teste de Tukey, [a] quando comparado com grupo SHAM-SC, [b] quando comparado com grupo SHAM-HF, ou [c] quando comparado ao grupo OVX- SC. Média ± EPM; n=5 por grupo e $P \leq 0,05$.

Abreviaturas: u.a., unidades arbitrárias; HF, dieta hiperlipídica; OVX, animais ovariectomizados; SC, dieta padrão.

4.3 Massa corporal

Conforme mostrado na Figura 5, a suscetibilidade ao ganho de peso por ingestão de dieta HF está bem caracterizado nas camundongas OVX-HF. No final do experimento (18 semanas), a massa corporal de camundongas do grupo OVX-HF foi 37% superior aos do grupo SHAM-SC ($P < 0,0001$; análise de variância uni-variada), 30% superior aos do SHAM-HF ($P < 0,0001$; análise de variância uni-variada), e 25% maior que as camundongas OVX-SC ($P < 0,0001$; análise de variância uni-variada, tabela 2). Tanto a ovariectomia como a dieta hiperlipídica, interagiram alterando a massa corporal dos animais ($P = 0,001$; análise de variância bivariada, tabela 3).

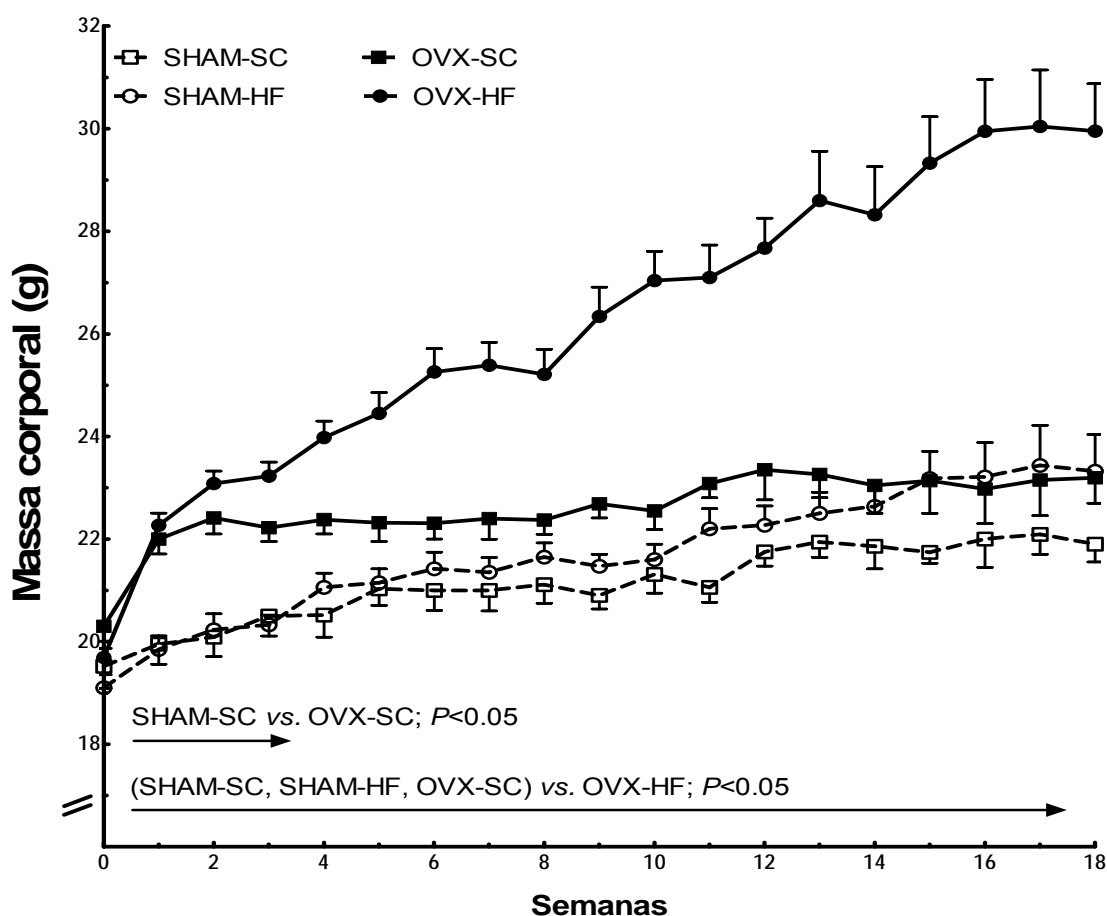


Figura 5. Evolução da massa corporal dos animais C57BL/6 por todo o experimento. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. As setas indicam a extensão, em semanas, e entre quais grupos ocorreram as diferenças. A seta curta significa diferença significativa entre as camundongas OVX e as camundongas SHAM, a partir da primeira semana até a quarta semana do experimento. A seta longa significa diferença significativa entre as camundongas OVX-HF e os demais grupos, a partir da primeira semana até o final do experimento. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

4.4 Tecido adiposo

Avaliamos a massa de cada depósito de tecido adiposo branco dos animais (através da análise de variância uni-variada com pós-teste de Tukey) e observamos que: a) a massa de gordura inguinal foi 639% maior que no grupo SHAM-SC, 340% maior do que no grupo SHAM-HF, e 745% maior que no grupo OVX-SC; b) a massa de gordura retroperitoneal foi 145% maior do que no grupo SHAM-SC e 190% maior que no grupo OVX-SC; c) a massa de gordura ovariana foi 413% maior que no grupo SHAM-SC, 226% maior do que no grupo SHAM-HF, e 425% maior que no grupo OVX-SC. A ovariectomia e a dieta hiperlipídica interagiram alterando a massa da gordura ovariana dos animais ($P=0,0001$; análise de variância bivariada, tabela 3).

O padrão e a porcentagem de distribuição de cada depósito de tecido adiposo do corpo das camundongas estão apresentados na Figura 6. O padrão de distribuição das gorduras viscerais (ovariana e retroperitoneal) e da gordura subcutânea (gordura inguinal) foi semelhante entre os grupos SHAM-SC, SHAM-HF e OVX-SC. No entanto, o grupo OVX-HF apresentou um padrão diferente de distribuição de gordura. Esse grupo apresentou um aumento da gordura inguinal e uma redução da gordura retroperitoneal, contudo sem alteração da gordura visceral.

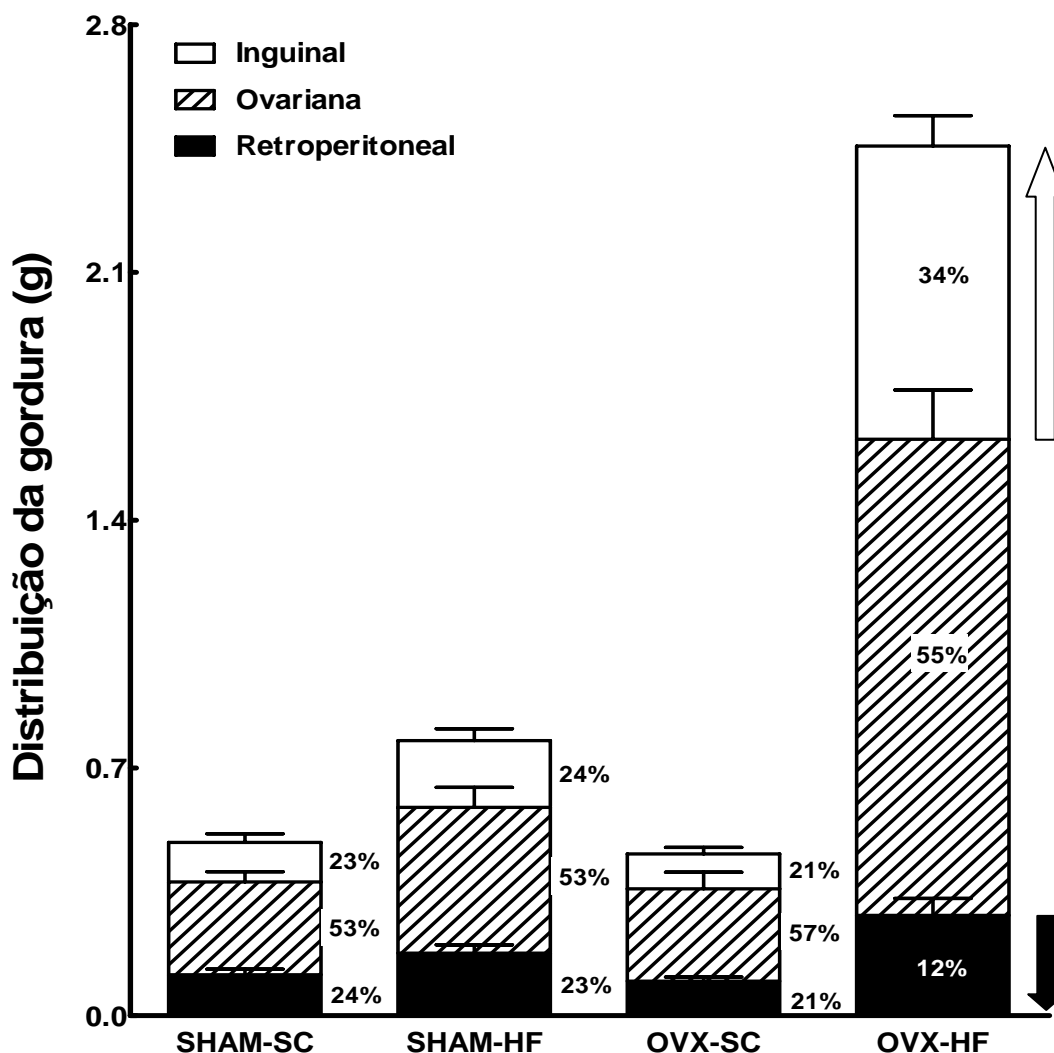


Figura 6. Padrão e porcentagem da distribuição da gordura corporal dos animais. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média. Seta vazia indica o aumento na massa do tecido adiposo da região inguinal e a seta preta indica a diminuição na massa do tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica após 18 semanas de experimento.

A figura 7 mostra imagens dos depósitos de gordura, retroperitoneal e ovariana, dos grupos SHAM-SC, SHAM-HF, OVX-SC e OVX-HF.



Figura 7. Fotografias da vista ventro-abdominal da dissecção dos animais representativos de cada grupo experimental, mostrando, os rins (seta branca aberta) envoltos por pequenos depósitos de gordura no animal SHAM-SC, depósitos de gordura retroperitoneal (asterisco) cobrindo parcialmente os rins do animal SHAM-HF e depósitos de gordura ovariana (seta preta) cobrindo toda a parte inferior da cavidade abdominal do animal OVX-HF.

4.4.1 Diâmetro dos adipócitos

Houve um aumento significativo do diâmetro médio dos adipócitos em amostras de tecido adiposo das camundongas alimentadas com dieta HF. O diâmetro médio dos adipócitos das camundongas SHAM-HF foi 21% maior do que nas camundongas SHAM-SC ($P < 0,0001$; análise de variância uni-variada, figura 8). Comparando o diâmetro dos adipócitos de camundongas OVX-SC com o de camundongas SHAM-SC, nota-se que a ovariectomia também foi capaz de aumentar o diâmetro dos adipócitos (mais de 26%, $P < 0,0001$; análise de variância uni-variada, figura 8). Além disso, a associação da ovariectomia com a dieta HF aumentou significativamente o diâmetro dos adipócitos em OVX-HF, em comparação às camundongas SHAM-HF (mais de 37%, $P < 0,0001$; análise de variância uni-variada, figura 8). O aumento no diâmetro dos adipócitos foi influenciado pela interação entre a ovariectomia e a dieta hiperlipídica ($P = 0,0001$; análise de variância bivariada, tabela 3).

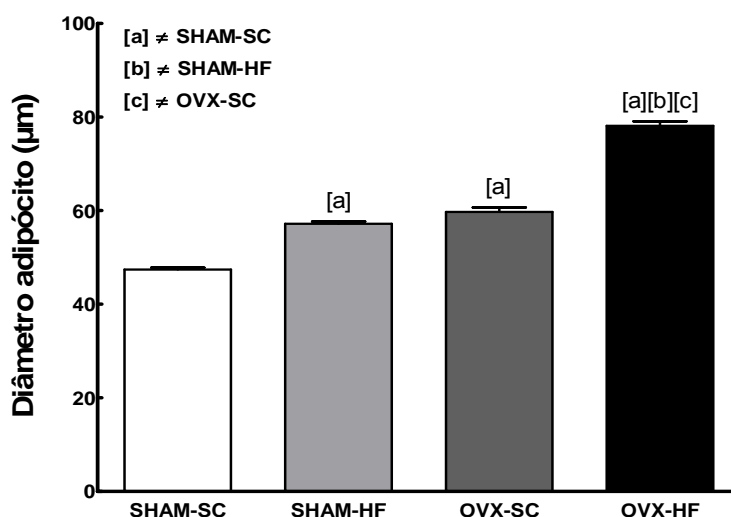


Figura 8. Diâmetro médio dos adipócitos ovarianos dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentadas com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentadas com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentadas com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b] versus SHAM-HF e [c] versus

grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

A diferença no diâmetro dos adipócitos pode ser verificada nas fotomicrografias de cortes histológicos de tecido adiposo visceral (gordura ovariana) dos grupos SHAM-SC, SHAM-HF, OVX-SC e OVX-HF (figura 9). Observado presença de grandes quantidades de macrófagos nos adipócitos dos animais OVX-HF.

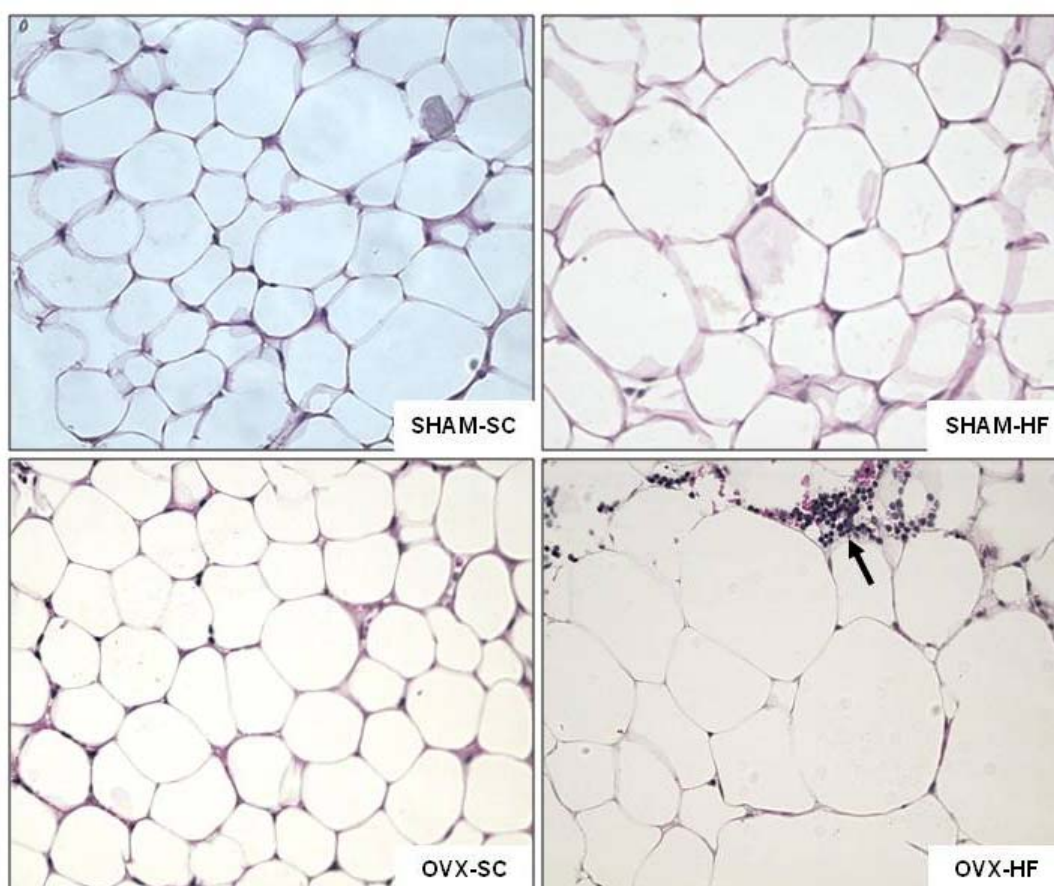


Figura 9. Diâmetro dos adipócitos da gordura ovariana. Cortes histológicos corados em HE - objetiva de 40X. Observa-se na figura OVX-HF um aumento no diâmetro dos adipócitos, além de presença de infiltrado inflamatório (seta). Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta

padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica.

4.5 Perfil lipídico

Os níveis séricos de colesterol total (CT) foram maiores nas camundongas alimentados com dieta HF comparadas às camundongas alimentados com a dieta SC em ambos os grupos SHAM e OVX (Figura 10). O CT foi 46% maior em camundongas SHAM-HF do que em camundongas SHAM-SC ($P < 0,0001$; análise de variância uni-variada) e 51% maior em camundongas OVX-HF do que em camundongas OVX-SC ($P < 0,0001$; análise de variância uni-variada). A ovariectomia foi capaz também de aumentar o CT em camundongas OVX-SC em comparação com as camundongas SHAM-SC (mais de 41%, $P < 0,0001$; análise de variância uni-variada), e a associação da ovariectomia com a dieta HF agravou o aumento do CT em camundongas OVX-HF, em relação às camundongas SHAM-HF (mais de 47%, $P < 0,0001$; análise de variância uni-variada). A alteração nos níveis de CT teve influência da interação entre ovariectomia e da dieta hiperlipídica ($P = 0,001$; análise de variância bivariada, tabela 3).

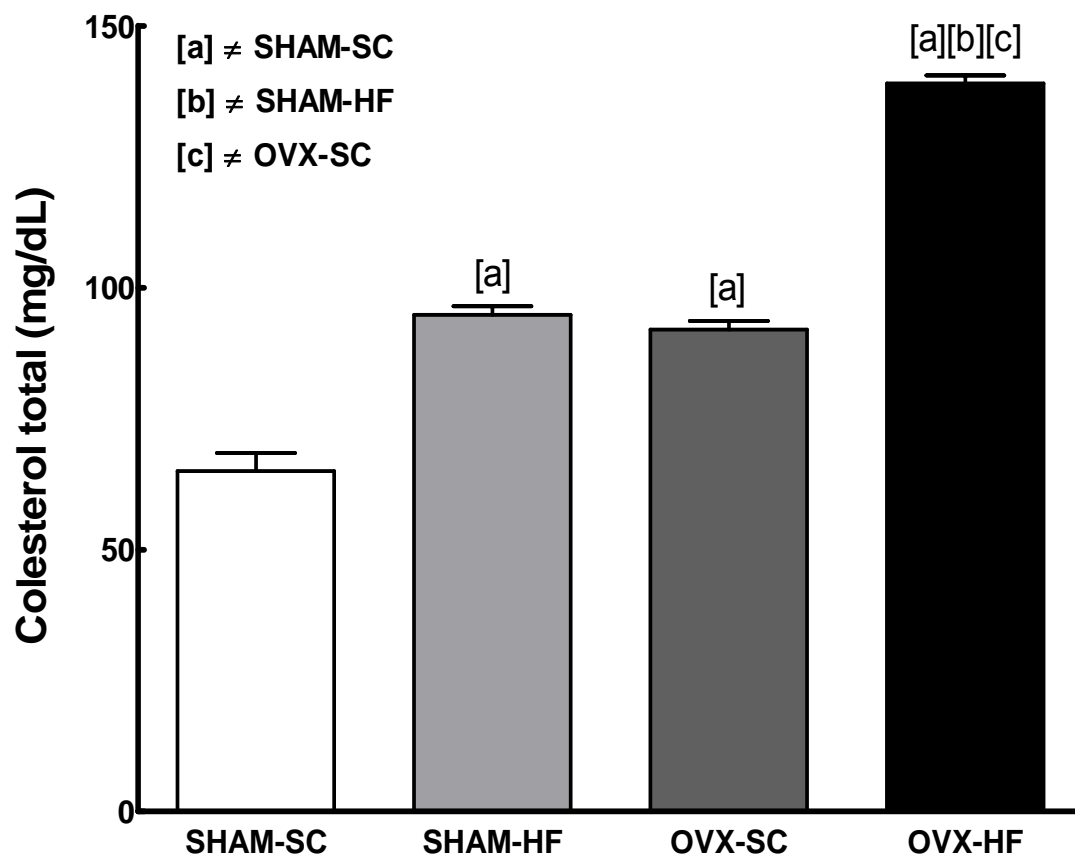


Figura 10. Níveis séricos de colesterol total dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b] versus SHAM-HF e [c] versus grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

No que concerne aos níveis séricos de triglicerídeos (TG), a associação da ovariectomia com a dieta HF foi capaz de aumentar significativamente o TG em camundongas OVX-HF, quando comparadas às camundongas OVX-SC (159%, $P < 0,0001$; análise de variância uni-variada) e SHAM-HF (79%, $P < 0,05$; análise de variância uni-variada) (Figura 11). Essas alterações tiveram a influência da interação entre a ovariectomia e a dieta hiperlipídica ($P < 0,05$; análise de variância bivariada, tabela 3).

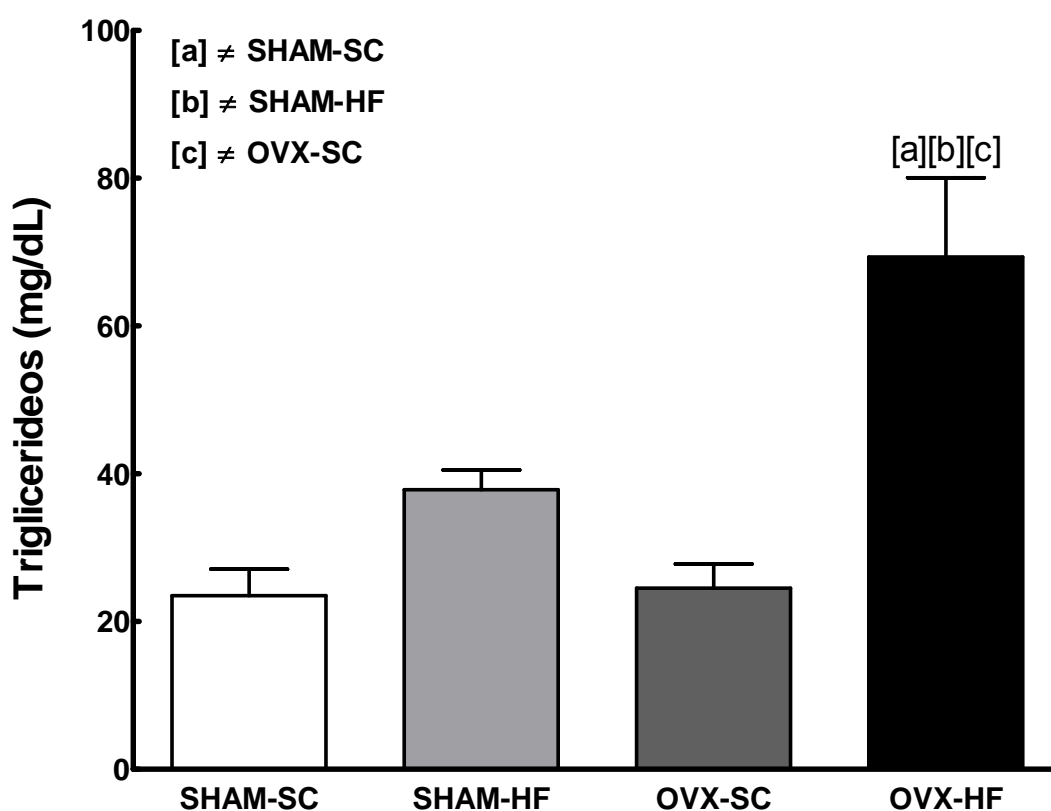


Figura 11. Níveis séricos de triglicerídeos dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b] versus SHAM-HF e [c] versus grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

4.6 Adipocinas e citocinas circulantes

4.6.1 Adipocinas

Por análise de variância uni-variada, os níveis de adiponectina (Figura 12) se mostraram significativamente elevadas nas camundongas OVX-SC quando comparadas às camundongas SHAM-SC (mais de 48%, $P < 0,0001$) e às camundongas OVX-HF (mais de 40%, $P < 0,001$). A análise de variância bivariada mostrou que tanto a ovariectomia como a dieta hiperlipídica interagiram na alteração dos níveis séricos de adiponectina ($P = 0,001$; tabela 3).

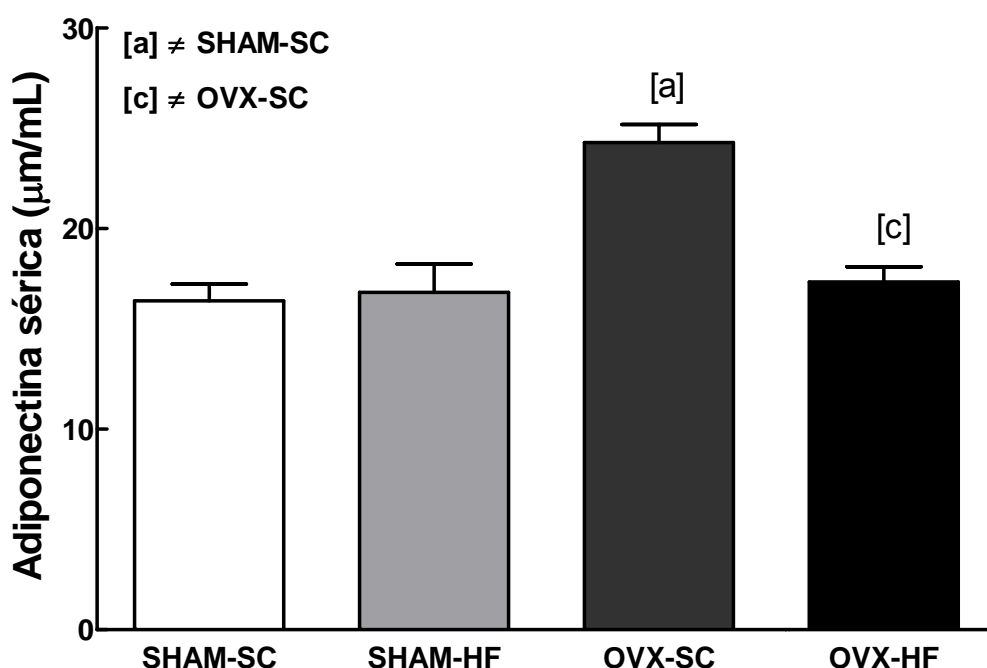


Figura 12. Níveis séricos de adiponectina dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os

símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b] versus SHAM-HF e [c] versus grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

O grupo OVX-HF apresentou maiores níveis sérico de leptina comparado ao grupo OVX-SC (mais 324%, $P < 0,005$; análise de variância uni-variada, figura 13). Esse aumento dos níveis séricos de leptina teve 26,9% de influência da dieta hiperlipídica ($P = 0,05$; análise de variância bivariada, tabela 3).

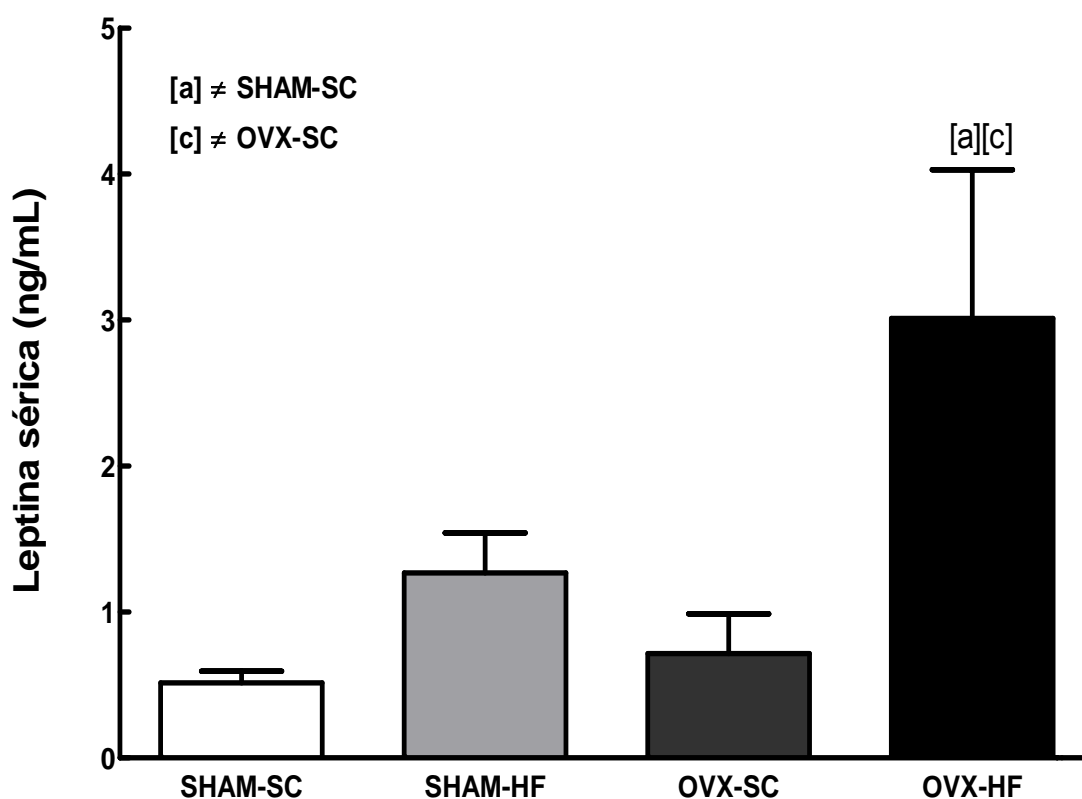


Figura 13. Níveis séricos de leptina dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC e [c]

versus grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

4.6.2 Citocinas

Os níveis séricos de TNF- α e IL-6 também foram avaliados e, semelhantemente ao padrão de acúmulo do tecido adiposo, ambas as citocinas pró-inflamatórias aumentaram com a dieta HF. Contudo, não houve diferença significativa nos níveis de TNF- α (Figura 14) entre os grupos.

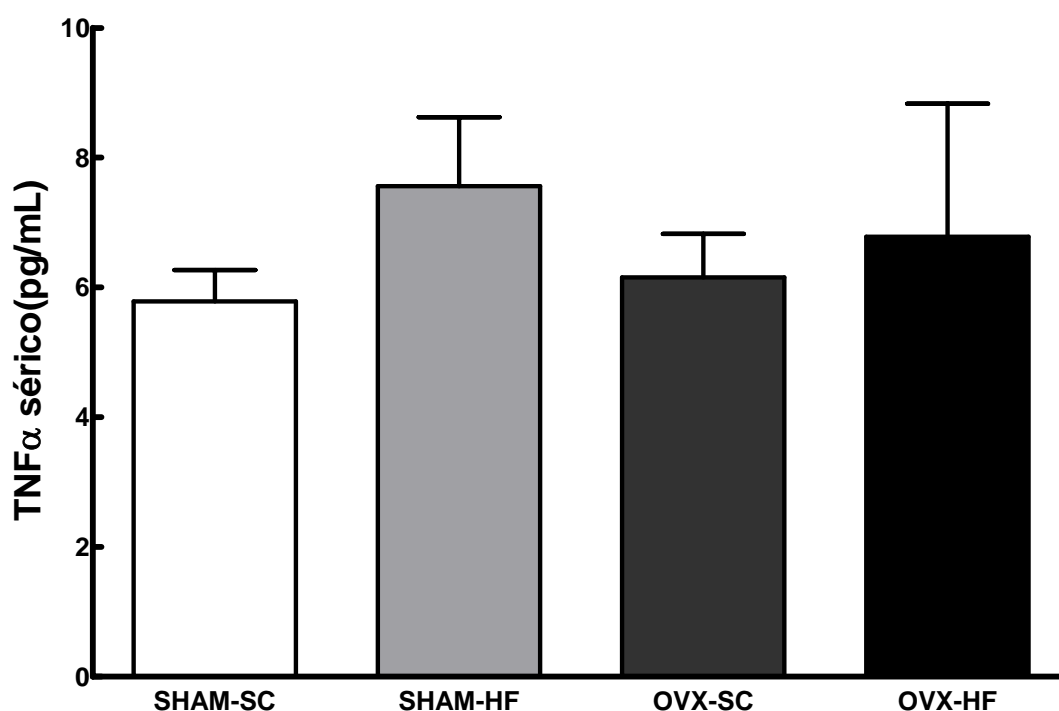


Figura 14. Níveis séricos de TNF α dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b]

versus SHAM-HF e [c] versus grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

No entanto, após análise de variância uni-variada, a IL-6 foi significativamente maior nas camundongas OVX-HF tanto em relação às camundongas SHAM-HF (mais 241%, $P < 0,001$) quanto às camundongas OVX-SC (mais 870%, $P < 0,0001$) (Figura 15). A interação entre a ovariectomia e a dieta hiperlipídica influenciou em 14,3% a alteração nos níveis de IL-6 ($P < 0,05$; análise de variância bivariada, tabela 3).

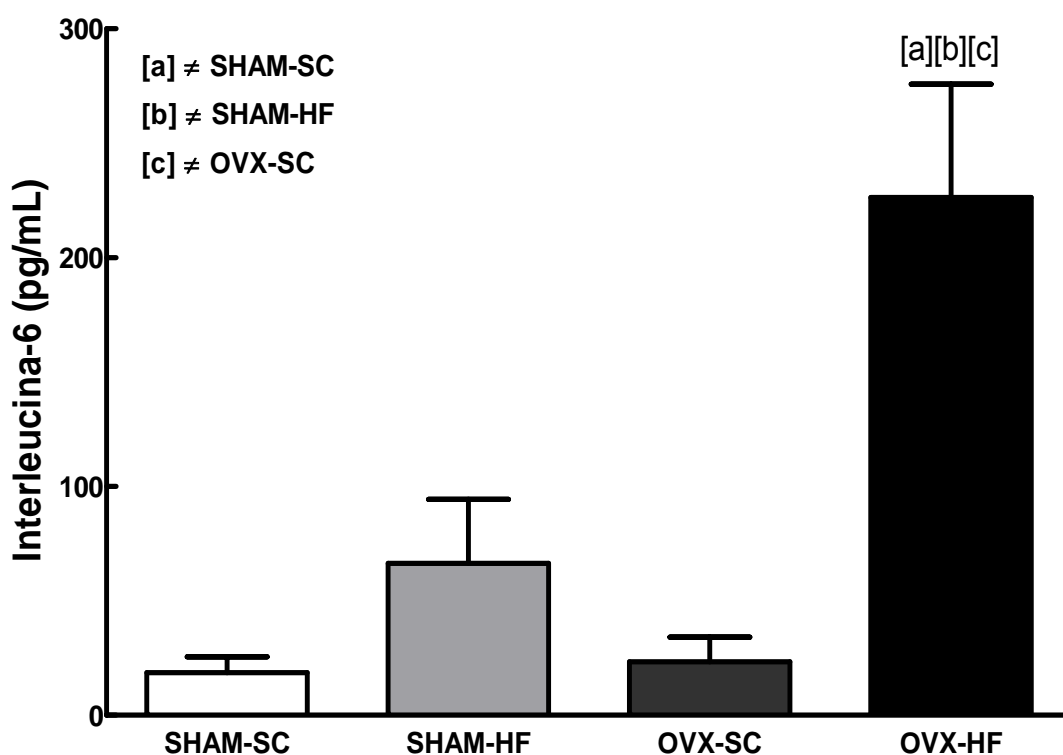


Figura 15. Níveis séricos de IL-6 dos animais C57BL/6. Grupos: SHAM-SC, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta padrão; SHAM-HF, camundongas com cirurgia Sham e alimentados com dieta hiperlipídica; OVX-SC, camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta padrão; OVX-HF,

camundongas ovariectomizadas e alimentados com dieta hiperlipídica. Os símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$): [a] versus SHAM-SC; [b] versus SHAM-HF e [c] versus grupo OVX-SC. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

4.7 Interações entre ovariectomia e dieta (análise de variância bivariada)

Avaliamos as influências das variáveis (ovariectomia e dieta hiperlipídica) isoladamente bem como as suas interações sobre os parâmetros analisados no estudo através da análise de variância bivariada (*two-way* ANOVA). A tabela 3 mostra a porcentagem da influência de cada variável sobre os parâmetros avaliados no estudo e o respectivo valor de P. Os dados realçados em negrito mostram os parâmetros alterados significativamente pelas variáveis.

Tabela 3. ANOVA bivariada ou *two-way*, avaliando a influencia da ovariectomia e da dieta hiperlipídica sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos.

Parâmetro	Ovariectomia		Dieta High-fat		Interação	
	%	P	%	P	%	P
Massa uterina	85,4	0,0001	0,6	NS	0,0	NS
Massa corporal	40,4	0,0001	28,5	0,0001	12,4	0,001
Massa g. ovariana	30,5	0,0001	30,5	0,0001	20,6	0,0001
Diâmetro adipócito	5,2	0,0001	59,0	0,0001	35,5	0,0001
Colesterol total	43,8	0,0001	50,9	0,0001	2,6	0,001
Triglicerídeos	9,9	NS	35,2	0,001	12,6	<0,05
Adiponectina	30,2	0,0001	18,2	0,001	23,2	0,001
Leptina	11,0	NS	26,9	0,05	6,9	NS
IL-6	16,1	<0,05	37,3	0,0001	14,3	<0,05
TNF- α	0,2	NS	5,6	NS	1,3	NS

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos os efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica sobre os parâmetros biométricos, metabólicos e morfológicos de camundongas C57BL/6. Os achados principais foram que: a dieta hiperlipídica agrava os efeitos da ovariectomia sobre as camundongas; leva a profundas alterações metabólicas, incluindo o aumento de massa corporal e acúmulo de gordura abdominal, que caracterizam a obesidade; dislipidemia; a remodelação do tecido adiposo com aumento do diâmetro dos adipócitos; e aumento de marcadores inflamatórios circulantes caracterizando inflamação associada à obesidade.

A linhagem de camundongos C57BL/6J tem maior probabilidade de desenvolver obesidade (Fraulob, Ogg-Diamantino *et al.*, 2010). Estes camundongos desenvolvem alterações metabólicas que mais se assemelham às apresentadas na síndrome metabólica humana, tais como dislipidemia, obesidade e inflamação (Eckel, Grundy *et al.*, 2005; Gallou-Kabani, Vige *et al.*, 2007). No entanto, existem poucos dados na literatura descrevendo um modelo experimental de menopausa associado à obesidade induzida por dieta em camundongas.

Sugere-se que a ovariectomia em camundongas aumenta a susceptibilidade à obesidade, pois ficam mais propensas a acumular gordura, devido à falta de proteção hormonal (Hong, Stubbins *et al.*, 2009). Apesar de ter sido observado diferença significativa na massa corporal entre os grupos SHAM-SC e OVX-SC (através do teste *t*) no final do experimento, não constatamos acúmulo excessivo de tecido adiposo nas fêmeas ovariectomizadas alimentadas com dieta padrão. É importante dizer que por análise de variância uni-variada, comparando todos os grupos experimentais, não foi observada diferença significativa na massa corporal entre os grupos SHAM-SC e OVX-SC. No entanto, observamos que a associação da ovariectomia com ingestão de dieta hiperlipídica foi capaz de aumentar muito a massa corporal das camundongas, mesmo quando comparados às camundongas SHAM que foram alimentados com a dieta hiperlipídica. A avaliação da eficiência alimentar dos animais reforça esses achados, uma vez que os animais OVX-HF apresentaram maior eficiência

alimentar, transformando a energia consumida em ganho de peso. E esse ganho de peso foi principalmente devido ao acúmulo excessivo de tecido adiposo. Assim, é preciso ter cuidado já que as alterações observadas em fêmeas na pós-menopausa, comparadas às fêmeas na pré-menopausa, foram agravadas pelo acúmulo de gordura corporal induzido pela dieta.

Na mulher menopáusicas, há uma mudança na distribuição da gordura corporal da forma “ginóide” para a forma “andróide”, que está associada a um maior risco cardiovascular (Panotopoulos, Raison *et al.*, 1997; Kanaya, Vittinghoff *et al.*, 2003). Como observado nos presentes resultados, a ovariectomia em camundongas não altera a distribuição da gordura, mas associada a uma dieta hiperlipídica alterou significativamente a distribuição da gordura, reduzindo a massa relativa de gordura retroperitoneal (uma gordura visceral de camundongas) e aumentando a massa relativa de gordura inguinal (uma gordura subcutânea em camundongas). Não houve alteração na massa relativa da gordura ovariana (outra gordura visceral em camundongas) entre os grupos. Sugerimos, então, que essa redistribuição da gordura corporal nessas fêmeas seja uma tentativa do organismo compensar a agressão sofrida pelo excesso de lipídios. Contudo, essa tentativa de compensação não se mostrou suficiente devido à grande quantidade de gordura ovariana (gordura visceral), que é considerada uma gordura prejudicial. Não temos conhecimento de nenhum trabalho na literatura descrevendo a redistribuição da gordura. Os efeitos que o envelhecimento e a menopausa exercem sobre as mulheres levam ao aumento do teor de gordura corporal total, favorecendo a distribuição central de gordura (Chang, Wu *et al.*, 2000). Contudo, a redistribuição de gordura em mulheres mais velhas pode aumentar significativamente o teor de gordura abdominal total sem que haja alteração na massa corporal total, ou a circunferência da cintura (Franklin, Plutz-Snyder *et al.*, 2009).

O consumo de dietas hiperlipídicas de origem animal altera muito a morfologia e o tamanho dos adipócitos, bem como o metabolismo de carboidratos (Nascimento, Barbosa-Da-Silva *et al.*). O aumento da massa do tecido adiposo branco na obesidade está provavelmente associado a alterações histológicas e bioquímicas, característico de inflamação (Ahima, 2006). Na literatura, os dados do colesterol total de roedores alimentados com dietas hiperlipídicas parecem ser inconsistentes, uma vez que a indução de hipercolesterolemia é impossível sem

adição de colesterol na dieta (Buettner, Scholmerich *et al.*, 2007). Nossos resultados estão de acordo com as afirmações acima, uma vez que ambos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento tanto no tamanho dos adipócitos, como nos níveis de TG e CT em relação aos seus grupos alimentados com dieta padrão. Verificamos também que a ovariectomia, por si só, levou ao aumento dos níveis de colesterol total das fêmeas OVX-SC. Sugerimos que isso tenha acontecido devido ao fato do colesterol ser precursor do estrógeno (Ha, Sung *et al.*, 2009). E uma vez que esse colesterol não esteja sendo utilizado para a síntese de estrógeno nas fêmeas ovariectomizadas, os níveis séricos aumentam. E quando essas fêmeas são alimentadas com uma dieta hiperlipídica, contendo uma grande de colesterol, os níveis séricos de colesterol aumentam ainda mais, como foi observado no grupo OVX-HF.

A ovariectomia levou ao remodelamento do tecido adiposo, aumentando o tamanho dos adipócitos, observado tanto nas camundongas OVX alimentadas com a dieta padrão como as alimentadas com dieta hiperlipídica. Isso indica que o estrógeno exerce um papel sobre o acúmulo e distribuição de gordura, uma vez que mulheres pré-menopáusicas parecem estar protegidas desse acréscimo de gordura abdominal. Consequentemente, o estrógeno pode estar envolvido também no desenvolvimento dos adipócitos (Cooke e Naaz, 2004). Entretanto, devido à limitação nos dados a respeito da relação entre o estrógeno e o tamanho dos adipócitos, esse mecanismo não está bem esclarecido. O aumento de tamanho dos adipócitos é importante, pois o tecido adiposo secreta várias adipocinas e citocinas, como a leptina, adiponectina, TNF-alfa e IL-6, que estão envolvidos no metabolismo lipídico e na inflamação (Ahima, 2006).

O estado de obesidade é caracterizado pela diminuição da adiponectina (adipocina anti-inflamatória) e aumento de leptina, IL-6 e TNF-alfa (adipocina e citocinas pró-inflamatórias). Ultimamente, a ligação entre adipocinas e inflamação tem sido muito pesquisada. Ambas as adipocinas estão envolvidas na modulação da inflamação. Porém, o seu mecanismo de regulação não está bem claro (Fantuzzi, 2005). No presente estudo, as camundongas OVX-SC apresentaram maior concentração de adiponectina em comparação às camundongas SHAM-SC. Esse dado está de acordo com estudos anteriores, em animais e em seres humanos onde foram encontrados maior concentração de adiponectina em camundongas FVB ovariectomizadas relativamente às controles não-

ovariectomizadas (Combs, Berg *et al.*, 2003), assim como em mulheres pós-menopáusicas relativamente às mulheres pré-menopáusicas (Gavrila, Chan *et al.*, 2003). Além disso, o estrógeno parece diminuir a regulação dos níveis de adiponectina (Leung, Xu *et al.*, 2009). Por outro lado, as camundongas OVX-HF apresentaram concentrações significativamente menores de adiponectina do que o seu grupo controle (OVX-SC), corroborando a literatura que diz que as concentrações de adiponectina estão inversamente relacionadas com a obesidade abdominal (Tamakoshi, Yatsuya *et al.*, 2007) e inflamação. O aumento do tecido adiposo está associado com inflamação crônica de baixo grau e fatores inflamatórios que inibem a produção de adiponectina levando à perpetuação da inflamação (Fantuzzi, 2008). Muito provavelmente porque o TNF- α , uma das citocinas que se encontram elevadas na inflamação, regula negativamente a produção de adiponectina (Hong, Yoo *et al.*, 2007).

As camundongas OVX-HF, do nosso estudo, apresentaram a maior concentração sérica de leptina de acordo com a correlação positiva entre massa de tecido adiposo e os níveis circulantes de leptina encontrados em mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas (Hong, Yoo *et al.*, 2007). Os níveis de leptina tendem a ser elevados em roedores com obesidade induzida por dieta (Buettner, Scholmerich *et al.*, 2007). É sabido que a leptina exerce um papel no controle da saciedade (Fantuzzi, 2005), o que pode explicar a diminuição no consumo alimentar das fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica e cujos níveis de leptina estão mais elevados. Além disso, é do consenso geral que a leptina exerce um papel pró-inflamatório na modulação da inflamação (Fantuzzi, 2005). Os marcadores inflamatórios estão diretamente relacionados com a inflamação na obesidade (Tilg e Moschen, 2008). Em relação às citocinas, os grupos alimentados com a dieta rica em gordura mostraram aumento dos níveis séricos de TNF- α e IL-6 comparados àqueles alimentados com ração padrão. As camundongas OVX-HF apresentaram os maiores níveis de TNF- α e IL-6, concordando com o aumento da regulação de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α e IL-6 relatado por um estudo realizado em camundongas C57BL/6J ovariectomizadas e com aumento da adiposidade (Rogers, Perfield *et al.*, 2009). Reforçando os achados séricos de marcadores inflamatórios, na análise das amostras de tecido adiposo desses animais foram visualizados grandes quantidades de macrófagos entre os adipócitos.

O presente trabalho analisou também as influências que a dieta hiperlipídica e a ovariectomia, isoladamente, ou que as suas interações exercem sobre os resultados. A dieta hiperlipídica e a ovariectomia, bem como suas interações, exerceram um efeito significativo no desenvolvimento da dislipidemia, obesidade e inflamação. Entretanto, a dieta hiperlipídica teve maior influência sobre o desenvolvimento da dislipidemia e o estado pró-inflamatório, enquanto a ovariectomia exerceu uma maior influência na indução da obesidade. Essas alterações se assemelham muito ao espectro de alguns componentes que delineiam a síndrome metabólica humana. É importante dizer que, mulheres idosas e obesas com a síndrome metabólica apresentam menor massa magra, maior gordura visceral, e maior quantidade plasmática de receptores tipo 1 de TNF- α . A gravidade da síndrome metabólica está associada com a composição corporal, adiposidade visceral e inflamação (You, Ryan *et al.*, 2004). Os elementos-chave envolvidos no controle da síndrome metabólica estão na modificação da dieta e do estilo de vida. O tratamento adequado pode incluir também o controle individual dos fatores de risco cardiovascular com o uso de agentes anti-hipertensivos e agentes modificadores de lipídios entre outros (Schneider, Tompkins *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os achados do presente estudo permitem dizer que a associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica em camundongas C57BL/6 leva a:

- Aumento na adiposidade, com grande aumento da gordura corporal, principalmente da gordura ovariana (gordura visceral) e caracterizando a obesidade;
- Redistribuição e remodelamento do tecido adiposo, apresentando adipócitos com maiores diâmetros;
- Dislipidemia, com altos níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos;
- Aumento de adipocina (leptina) e citocinas (TNF- α e IL-6) pró-inflamatórias, e diminuição de adipocina anti-inflamatória (adiponectina), caracterizando o estado inflamatório.

Essa cascata de alterações se assemelha às desordens metabólicas presentes na síndrome metabólica em humanos e aumenta os riscos para doenças cardiovasculares. Isso pode ser útil para que se tenha uma melhor compreensão da relação entre a ingestão de alimentos altamente calóricos e o desenvolvimento da síndrome metabólica na menopausa, assim como para o desenvolvimento de cuidados preventivos, terapia ou tratamento para os transtornos associados à menopausa.

REFERÊNCIAS

- Abu-Abid, S., A. Szold, *et al.* Obesity and cancer. J Med, v.33, n.1-4, p.73-86. 2002.
- Ahima, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. Obesity (Silver Spring), v.14 Suppl 5, Aug, p.242S-249S. 2006.
- Ahima, R. S. e J. S. Flier. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab, v.11, n.8, Oct, p.327-32. 2000.
- Berg, A. H. e P. E. Scherer. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res, v.96, n.9, May 13, p.939-49. 2005.
- Bornstein, S. R., M. Abu-Asab, *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. Diabetes, v.49, n.4, Apr, p.532-8. 2000.
- Buettner, R., J. Scholmerich, *et al.* High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity (Silver Spring), v.15, n.4, Apr, p.798-808. 2007.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, *et al.* Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science, v.269, n.5223, Jul 28, p.546-9. 1995.
- Carr, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. J Clin Endocrinol Metab, v.88, n.6, Jun, p.2404-11. 2003.
- Chandran, M., S. A. Phillips, *et al.* Adiponectin: more than just another fat cell hormone? Diabetes Care, v.26, n.8, Aug, p.2442-50. 2003.
- Chang, C. J., C. H. Wu, *et al.* Relationships of age, menopause and central obesity on cardiovascular disease risk factors in Chinese women. Int J Obes Relat Metab Disord, v.24, n.12, Dec, p.1699-704. 2000.
- Choudhury, J. e A. J. Sanyal. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Clin Liver Dis, v.8, n.3, Aug, p.575-94, ix. 2004.
- Cintra, D. E., E. R. Ropelle, *et al.* [Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin, leptin and physical exercise]. Rev Neurol, v.45, n.11, Dec 1-15, p.672-82. 2007.
- Clegg, D. J., L. M. Brown, *et al.* Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. Diabetes, v.55, n.4, Apr, p.978-87. 2006.
- Combs, T. P., A. H. Berg, *et al.* Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. Diabetes, v.52, n.2, Feb, p.268-76. 2003.

- Cooke, P. S. e A. Naaz. Role of estrogens in adipocyte development and function. Exp Biol Med (Maywood), v.229, n.11, Dec, p.1127-35. 2004.
- Coppack, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. Proc Nutr Soc, v.60, n.3, Aug, p.349-56. 2001.
- Costa, J. V. e J. S. Duarte. [Adipose tissue and adipokines]. Acta Med Port, v.19, n.3, May-Jun, p.251-6. 2006.
- Cottam, D. R., S. G. Mattar, *et al.* The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. Obes Surg, v.14, n.5, May, p.589-600. 2004.
- De Carvalho, M. H., A. L. Colaco, *et al.* [Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance]. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.50, n.2, Apr, p.304-12. 2006.
- Dixon, J. B. The effect of obesity on health outcomes. Mol Cell Endocrinol, v.316, n.2, Mar 25, p.104-8. 2010.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, *et al.* The metabolic syndrome. Lancet, v.365, n.9468, Apr 16-22, p.1415-28. 2005.
- Enriori, P. J., A. E. Evans, *et al.* Leptin resistance and obesity. Obesity (Silver Spring), v.14 Suppl 5, Aug, p.254S-258S. 2006.
- Faggioni, R., J. Jones-Carson, *et al.* Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.5, Feb 29, p.2367-72. 2000.
- Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol, v.115, n.5, May, p.911-9; quiz 920. 2005.
- Fantuzzi, G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. J Allergy Clin Immunol, v.121, n.2, Feb, p.326-30. 2008.
- Fantuzzi, G. e R. Faggioni. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J Leukoc Biol, v.68, n.4, Oct, p.437-46. 2000.
- Farooqi, I. S., G. Matarese, *et al.* Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest, v.110, n.8, Oct, p.1093-103. 2002.
- Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell, v.116, n.2, Feb 23, p.337-50. 2004.
- Fonseca-Alaniz, M. H., J. Takada, *et al.* [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.50, n.2, Apr, p.216-29. 2006.

Franklin, R. M., L. Ploutz-Snyder, *et al.* Longitudinal changes in abdominal fat distribution with menopause. Metabolism, v.58, n.3, Mar, p.311-5. 2009.

Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, *et al.* 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, v.46, n.3, May, p.212-23. 2010.

Fried, S. K., D. A. Bunkin, *et al.* Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.3, Mar, p.847-50. 1998.

Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res Ther, v.8 Suppl 2, p.S3. 2006.

Gallou-Kabani, C., A. Vige, *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. Obesity (Silver Spring), v.15, n.8, Aug, p.1996-2005. 2007.

Gavrila, A., J. L. Chan, *et al.* Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. J Clin Endocrinol Metab, v.88, n.10, Oct, p.4823-31. 2003.

Gesta, S., Y. H. Tseng, *et al.* Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. Cell, v.131, n.2, Oct 19, p.242-56. 2007.

Gimeno, R. E. e L. D. Klaman. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. Curr Opin Pharmacol, v.5, n.2, Apr, p.122-8. 2005.

Greendale, G. A. e M. Sowers. The menopause transition. Endocrinol Metab Clin North Am, v.26, n.2, Jun, p.261-77. 1997.

Ha, M., J. Sung, *et al.* Serum total cholesterol and the risk of breast cancer in postmenopausal Korean women. Cancer Causes Control, v.20, n.7, Sep, p.1055-60. 2009.

Havel, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. Diabetes, v.53 Suppl 1, Feb, p.S143-51. 2004.

Heber, D. An integrative view of obesity. Am J Clin Nutr, v.91, n.1, Jan, p.280S-283S.

Hong, J., R. E. Stubbins, *et al.* Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. Nutr J, v.8, p.11. 2009.

Hong, S. C., S. W. Yoo, *et al.* Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. Menopause, v.14, n.5, Sep-Oct, p.835-40. 2007.

Hotamisligil, G. S., D. L. Murray, *et al.* Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.11, May 24, p.4854-8. 1994.

- Hu, G., Q. Qiao, *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. Arch Intern Med, v.164, n.10, May 24, p.1066-76. 2004.
- Hutley, L. e J. B. Prins. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. Am J Med Sci, v.330, n.6, Dec, p.280-9. 2005.
- Ignacio, D. L., T. G. Frankenfeld, *et al.* [Body mass regulation by estrogen and physical activity]. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.53, n.3, Apr, p.310-7. 2009.
- Jones, P. H. Management of obesity in the prevention of cardiovascular disease. Methodist Debakey Cardiovasc J, v.6, n.4, Nov-2011 Jan, p.33-6. 2010.
- Kaaja, R. J. Metabolic syndrome and the menopause. Menopause Int, v.14, n.1, Mar, p.21-5. 2008.
- Kadowaki, T. e T. Yamauchi. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev, v.26, n.3, May, p.439-51. 2005.
- Kanaya, A. M., E. Vittinghoff, *et al.* Association of total and central obesity with mortality in postmenopausal women with coronary heart disease. Am J Epidemiol, v.158, n.12, Dec 15, p.1161-70. 2003.
- Kanda, T., T. Takahashi, *et al.* Leptin deficiency enhances myocardial necrosis and lethality in a murine model of viral myocarditis. Life Sci, v.75, n.12, Aug 6, p.1435-47. 2004.
- Kappes, A. e G. Loffler. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. Horm Metab Res, v.32, n.11-12, Nov-Dec, p.548-54. 2000.
- Kelly, T., W. Yang, *et al.* Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. Int J Obes (Lond), v.32, n.9, Sep, p.1431-7. 2008.
- Kershaw, E. E. e J. S. Flier. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.6, Jun, p.2548-56. 2004.
- Kirchengast, S., D. Gruber, *et al.* Postmenopausal weight status, body composition and body fat distribution in relation to parameters of menstrual and reproductive history. Maturitas, v.33, n.2, Oct 24, p.117-26. 1999.
- La Cava, A., C. Alviggi, *et al.* Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. J Mol Med, v.82, n.1, Jan, p.4-11. 2004.
- Laclaustra, M., D. Corella, *et al.* Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. Nutr Metab Cardiovasc Dis, v.17, n.2, Feb, p.125-39. 2007.
- Leung, K. C., A. Xu, *et al.* Adiponectin isoform distribution in women--relationship to female sex steroids and insulin sensitivity. Metabolism, v.58, n.2, Feb, p.239-45. 2009.

- Lund, K. J. Menopause and the menopausal transition. Med Clin North Am, v.92, n.5, Sep, p.1253-71, xii. 2008.
- Maffei, M., H. Fei, *et al.* Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.15, Jul 18, p.6957-60. 1995.
- Manco, M., G. Nolfi, *et al.* Menopause, insulin resistance, and risk factors for cardiovascular disease. Menopause, v.13, n.5, Sep-Oct, p.809-17. 2006.
- Mancuso, P., A. Gottschalk, *et al.* Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. J Immunol, v.168, n.8, Apr 15, p.4018-24. 2002.
- Mandarim-De-Lacerda, C. A., C. Fernandes-Santos, *et al.* Image analysis and quantitative morphology. Methods Mol Biol, v.611, p.211-25. 2010.
- Marques, C. M., F. A. Nascimento, *et al.* Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. Menopause, v.13, n.1, Jan-Feb, p.87-95. 2006.
- Nascimento, F. A., S. Barbosa-Da-Silva, *et al.* 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, v.62, n.1, Jan, p.17-25.
- Nunez, N. P., C. L. Carpenter, *et al.* Extreme obesity reduces bone mineral density: complementary evidence from mice and women. Obesity (Silver Spring), v.15, n.8, Aug, p.1980-7. 2007.
- Nunez, N. P., S. N. Perkins, *et al.* Obesity accelerates mouse mammary tumor growth in the absence of ovarian hormones. Nutr Cancer, v.60, n.4, p.534-41. 2008.
- Ouchi, N., S. Kihara, *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. Circulation, v.100, n.25, Dec 21-28, p.2473-6. 1999.
- Panotopoulos, G., J. Raison, *et al.* Weight gain at the time of menopause. Hum Reprod, v.12 Suppl 1, Oct, p.126-33. 1997.
- Prins, J. B. Adipose tissue as an endocrine organ. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, v.16, n.4, Dec, p.639-51. 2002.
- Rachon, D. e H. Teede. Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. Mol Cell Endocrinol, v.316, n.2, Mar 25, p.172-9. 2010.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Regitz-Zagrosek, V., E. Lehmkuhl, *et al.* Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. Clin Res Cardiol, v.95, n.3, Mar, p.136-47. 2006.

Rogers, N. H., J. W. Perfield, 2nd, *et al.* Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. Endocrinology, Jan 29. 2009.

Sanchez-Margalet, V., C. Martin-Romero, *et al.* Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. Clin Exp Immunol, v.133, n.1, Jul, p.11-9. 2003.

Schneider, J. G., C. Tompkins, *et al.* The metabolic syndrome in women. Cardiol Rev, v.14, n.6, Nov-Dec, p.286-91. 2006.

Shi, H. e D. J. Clegg. Sex differences in the regulation of body weight. Physiol Behav, v.97, n.2, May 25, p.199-204. 2009.

Shi, H., R. J. Seeley, *et al.* Sexual differences in the control of energy homeostasis. Front Neuroendocrinol, v.30, n.3, Aug, p.396-404. 2009.

Spranger, J., A. Kroke, *et al.* Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. Lancet, v.361, n.9353, Jan 18, p.226-8. 2003.

Tamakoshi, K., H. Yatsuya, *et al.* The transition to menopause reinforces adiponectin production and its contribution to improvement of insulin-resistant state. Clin Endocrinol (Oxf), v.66, n.1, Jan, p.65-71. 2007.

Tilg, H. e A. R. Moschen. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. Trends Endocrinol Metab, v.19, n.10, Dec, p.371-9. 2008.

Trayhurn, P. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. Endocrinology, v.146, n.3, Mar, p.1003-5. 2005.

Vazquez-Vela, M. E., N. Torres, *et al.* White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. Arch Med Res, v.39, n.8, Nov, p.715-28. 2008.

Wang, W., B. Poole, *et al.* Role of leptin deficiency in early acute renal failure during endotoxemia in ob/ob mice. J Am Soc Nephrol, v.15, n.3, Mar, p.645-9. 2004.

Wintour, E. M. e B. A. Henry. Glycerol transport: an additional target for obesity therapy? Trends Endocrinol Metab, v.17, n.3, Apr, p.77-8. 2006.

Wise, P. M., K. M. Krajinak, *et al.* Menopause: the aging of multiple pacemakers. Science, v.273, n.5271, Jul 5, p.67-70. 1996.

Yatagai, T., S. Nagasaka, *et al.* Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. Metabolism, v.52, n.10, Oct, p.1274-8. 2003.

You, T., A. S. Ryan, *et al.* The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.11, Nov, p.5517-22. 2004.

Zamboni, M., G. Mazzali, *et al.* Health consequences of obesity in the elderly: a review of four unresolved questions. Int J Obes (Lond), v.29, n.9, Sep, p.1011-29. 2005.

Zhang, Y., R. Proenca, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, v.372, n.6505, Dec 1, p.425-32. 1994.

ANEXO A



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEA/007/2010 sobre "**Efeitos do agonista Pan-PPAR (bezafibrato) sobre as alterações estruturais e metabólicas em órgãos alvo de camungongas C57BL/6 ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica**", sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **15/01/2010**. Este certificado expira em **15/01/2014**.

Rio de Janeiro, 15 de Janeiro de 2010.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof^ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof^ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

/ass

ANEXO B

-----Original Message----- From: The American Journal of Obstetrics & Gynecology

Sent: Sunday, January 30, 2011 2:39 PM

To: mandarim@uerj.br

Subject: Submission Confirmation

01-30-2011

Dear Prof Mandarin:

This acknowledges the receipt of your submission entitled, "High-fat diet enhances adipose tissue, and inflammation markers in ovariectomized C57BL/6 mice," to the American Journal of Obstetrics & Gynecology.

If any items in the submission checklist were omitted, the submission will be considered incomplete and returned to you for resubmission. It is the responsibility of the corresponding author to make sure all authors have been consulted and have approved this submission. We appreciate your attention to these important details.

We will report the results of the manuscript review as soon as possible. Also, you may log onto <http://ees.elsevier.com/ajog> as an author for details on the processing of your manuscript or to view the new Journal format.

Thank you for your submission to the American Journal of Obstetrics & Gynecology.

Sincerely,

Tom Garite, MD Moon Kim, MD

Editor-in-Chief Editor-in-Chief

=====
EDITORIAL OFFICE CONTACTS

WEST OFFICE

Sandra Perrine, Managing Editor

Email: Perrine@Ajog.Phxcoxmail.com

Phone: (480) 812-9261

EAST OFFICE

Donna Stroud, Managing Editor

Email: ajog@rrohio.com

Phone: (614) 527-3820