



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

Júlio César Fraulob Aquino

**Alterações estruturais pancreáticas e metabólicas em  
camundongos C57BL/6 alimentados com dieta de alta densidade  
energética**

Rio de Janeiro

2008

Júlio César Fraulob Aquino

**Alterações estruturais pancreáticas e metabólicas em camundongos C57BL/6  
alimentados com dieta de alta densidade energética**



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.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2008

Júlio César Fraulob Aquino

**Alterações estruturais pancreáticas e metabólicas em camundongos C57BL/6  
alimentados com dieta de alta densidade energética**

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.

Avaliada em 01 de agosto de 2008.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Glorimar Rosa  
Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ

Rio de Janeiro

2008

## DEDICATÓRIA

A Deus  
A meus pais  
Aos meus tios  
A minha noiva  
À minha família  
Aos meus amigos  
E ao meu orientador.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Deus, por me fortalecer em todos os momentos e me permitir viver segundo o seu propósito.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, sustento e estímulo para que eu conquistasse meus sonhos.

Aos meus tios, pelo amor, amparo e por acreditarem nos meus sonhos, além do estímulo ao estudo e aos meus primos, pela alegria e incentivo que me proporcionaram.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila, que abriu as portas e me deu oportunidade de poder aprofundar os meus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, por acreditar na minha capacidade e me orientar no meu trabalho, aconselhar e repreender em diversos momentos e dar oportunidade de concretizar uma das etapas de minha vida.

A minha ainda namorada (futura noiva), que cresce a cada dia ao meu lado, me apoia e incentiva o meu caminhar.

Aos membros da família LMMC, que a todo o momento auxiliam e de forma alegre me apoiaram em todo meu trabalho, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste e muitas vezes me aturaram.

À Thatiany de Souza Marinho pelo apoio técnico dado a este trabalho, oito mil cortes realizados e por muitos momentos de descontração.

Aos amigos Alessandra Pinheiro, Caroline Fernandes, Karla Pires, Vanessa Mello, Lyana Parente e Daniele Bezerra pelo auxílio em diversos momentos deste projeto.

Aos meus amigos de tarefas de projeto, Leonardo Mendonça e Cláudia Mansano, que proporcionaram muitas noites mal-dormidas e ótimos resultados. Além do auxílio nas rápidas eutanásias.

À minha IC Rebeca Ogg, pela ajuda dada no realizar desse trabalho e ao ainda IC Victor Motta, pela amizade e auxílios prestados.

Aos meus amigos Ana Rosa, Geraldo Oliveira, Sandra Barbosa e Rodrigo Neto, que a todo o momento me acompanharam e compartilharam as alegrias e angústias.

E não vos conformeis com este século, mas transformai-vos pela renovação da vossa mente, para que experimenteis qual seja a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.

*Romanos 12:2*

## RESUMO

AQUINO, Júlio César Fraulob. *Alterações estruturais pancreáticas e metabólicas em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta de alta densidade energética*. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) em 2008 - Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Camundongos C57BL/6 machos com oito semanas de idade alimentados com diferentes dietas durante 16 semanas: de alta densidade energética (ADE, 26% das calorias de carboidrato, 60% de gordura e 14% de proteína) ou dieta padrão (CO, 76% das calorias de carboidrato, 10% de gordura e 14% de proteína). Comparado ao grupo CO, o grupo ADE apresentou maior ganho de massa e maior depósito de tecido adiposo, bem como maiores níveis plasmáticos de triglicérides, LDL-c, ALT, AST e fosfatase alcalina e com maiores níveis de corticosterona plasmática, glicose de jejum e insulina com uma consequente resistência à insulina (avaliado pelo HOMA-IR). No TOTG, a glicose plasmática aumentou ao máximo após 15 min. da administração de glicose oral em ambos os grupos. Entretanto os níveis de glicose foram maiores no grupo ADE que no grupo CO ( $P < 0.0001$ ). O *clearance* de glicose no grupo ADE foi reduzido, permanecendo aumentado após 120 min. ( $P < 0.001$ ), caracterizando intolerância a glicose no grupo ADE. O teste intraperitoneal de tolerância à insulina mostrou uma rápida redução na glicose plasmática após 15 minutos da administração de insulina em ambos os grupos, mas significativamente aumentada no grupo ADE ( $P < 0.0001$ ), permanecendo desta forma até os 120 min. após a administração. Concluindo, camundongos C57BL/6 respondem a dieta ADE desenvolvendo os sinais e sintomas associados à síndrome metabólica observada em humanos. Por conseguinte, este modelo animal poderá ajudar-nos a compreender melhor as alterações em órgãos alvos associadas com a síndrome metabólica, assim como a possibilidade de tratamentos diferentes.

Palavras-chave: Hiperglicemia. Resistência à insulina. Obesidade. Síndrome metabólica. Pâncreas. Camundongo.

## ABSTRACT

Eight-week-old male C57BL/6 mice fed different diets during 16 weeks: very high-fat chow (HFC, 26% of calories from carbohydrates, 60% from fat, and 14% from protein), or standard chow (SC, 76% of calories from carbohydrates, 10% from fat, and 14% from protein). Compared to SC mice, the HFC mice showed greater mass gain and greater total visceral fat pads, as well as higher plasma levels of triglycerides, LDL-C, ALT, AST and ALK, and higher plasma corticosterone, fasting plasma glucose and insulin with the consequent insulin resistance (assessed by HOMA-IR). In OGTT, The plasma glucose increased to a maximum after 15 min of glucose oral administration in both groups. However, the glucose level in HFC mice was higher than in SC mice ( $P<0.0001$ ). The clearance of glucose in HFC mice showed a delay, remaining elevated after 120 min ( $P<0.001$ ), characterizing an impairment of glucose clearance in HFC mice when compared to SC mice. The insulin tolerance test demonstrated quick decrease of plasma glucose after 15 min of insulin administration in both groups, but plasma glucose remained significantly high in HFC mice when compared to SC mice ( $P<0.0001$ ) in the following time-points until 120 min. In conclusion, C57BL/6 mice respond to a very high-fat diet developing the aggregate of symptoms and signs associated with the metabolic syndrome seen in humans. Therefore, this animal model could help us better understand the target organ alterations associated with the syndrome and the possibility of different treatments.

Keywords: Hyperglycemia. Insulin resistance. Obesity. Pancreas. Metabolic syndrome. Mice.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Acúmulo de gordura abdominal e suas consequências.....	23
Figura 2 - Mecanismos que conduzem à HAS em roedores alimentados com dieta ADE.....	28
Figura 3 - Eixo adipoinsular.....	29
Figura 4 - Evolução da massa corpora e área sob a curva (ASC).....	41
Figura 5 - Massa do fígado e do pâncreas.....	42
Figura 6 - Vista ventro abdominal do camundongo dissecado mostrando os depósitos de gordura.....	43
Figura 7 - Eficiência alimentar e ASC.....	44
Figura 8 - Curva do teste oral de tolerância à glicose e ASC.....	48
Figura 9 - Curva do teste intraperitoneal de tolerância à insulina e ASC.	48
Figura 10 - Diâmetro e número de ilhotas pancreáticas.....	49
Figura 11 - Densidade de volume de células alfa nas ilhotas pancreáticas.....	50
Figura 12 - Densidade de volume de células beta nas ilhotas pancreáticas.....	51
Figura 13 - Fotomicrografia da morfologia do pâncreas.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de algumas das definições mais amplamente utilizadas para a síndrome metabólica.....	17
Tabela 2 - Critério para diagnóstico clínico da síndrome metabólica.....	18
Tabela 3 - Recomendação atual dos limites de circunferência da cintura para obesidade abdominal segundo as organizações.....	19
Tabela 4 - Risco de doenças associadas à classificação de sobrepeso e obesidade segundo IMC e circunferência da cintura.....	21
Tabela 5 - Valores étnicos específicos para circunferência de cintura.....	21
Tabela 6 - Composição e conteúdo energético das dietas padrão (Co) e de alta densidade energética (ADE).....	35
Tabela 7 - Composição corporal, alimento e lipídios ingeridos e eficiência alimentar em camundongos alimentados com dieta padrão (CO) e de alta densidade energética (ADE).....	45
Tabela 8 - Análise bioquímica.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ADE	Alta densidade energética
AG	Ácido graxo
AGL	Ácidos graxos livres
AGS	Ácidos graxos saturados
AGT	Ácidos graxos trans
AHA	American Heart Association /National Heart, Lung and Blood Institute
ASC	Área sob a curva
ATPIII	National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III
CC	Circunferência da cintura
CO	Controle
CT	Colesterol total
DCV	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
EPM	Erro padrão da média
FA	Fosfatase alcalina
GPJ	Glicose plasmática de jejum
H	Homen
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	Homeostasis model assessment-insulin resistance
IDF	International Diabetes Federation (IDF)
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Mulher
MC	Massa corporal
MEC	Matriz extracelular
NAFLD	Doença não alcoólica do fígado gorduroso
NAFPD	Doença não alcoólica do pâncreas gorduroso
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NASP	Esteatopancreatite não alcoólica

NF-Kb	Fator nuclear kappa B
Ob-R	Receptor da leptina
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistêmica
PPAR- $\alpha$	Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPAR – peroxissome proliferator-activated receptor)
PPAR- $\gamma$	Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPAR – peroxissome proliferator -activated receptor)
SM	Síndrome metabólica
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TG	Triglicerídeo
TGF	Tampão gelatina-fosfato
TITI	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization
A	Alfa
B	Beta

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<b>Síndrome metabólica</b> .....	16
2.2	<b>Obesidade</b> .....	20
2.2.1	<u>Índice de massa corporal</u> .....	20
2.2.2	<u>Obesidade abdominal e circunferência da cintura</u> .....	22
2.3	<b>Dieta de alta densidade energética (ADE)</b> .....	24
2.4	<b>Obesidade e inflamação</b> .....	29
2.5	<b>Alterações hepáticas e dieta ADE</b> .....	30
2.6	<b>Alterações pancreáticas e dieta ADE</b> .....	33
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	34
3.2	<b>Massa corporal e Ingestão alimentar</b> .....	34
3.3	<b>Eutanásia e obtenção do material para análise bioquímica</b> .....	35
3.4	<b>Teste oral de tolerância à glicose – TOTG</b> .....	36
3.5	<b>Teste intraperitoneal de tolerância à insulina – TITI</b> .....	36
3.6	<b>Radioimunoensaio</b> .....	37
3.7	<b>Análise bioquímica</b> .....	38
3.8	<b>Estereologia</b> .....	38
3.9	<b>Imunohistoquímica</b> .....	39
3.10	<b>Análise estatística</b> .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	<b>Massa corporal e depósitos de gordura</b> .....	41
4.2	<b>Dieta e eficiência alimentar</b> .....	44
4.3	<b>Análise bioquímica</b> .....	45
4.4	<b>TOTG e TITI</b> .....	47
4.5	<b>Densidade de células <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> das ilhotas pancreáticas</b> .....	49
4.6	<b>Histologia do pâncreas</b> .....	52
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	53
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
	<b>APÊNDICE A – Comitê de ética em pesquisa</b> .....	65
	<b>APÊNDICE B – Artigo</b> .....	66

## INTRODUÇÃO

A alta prevalência da obesidade central, resistência à insulina ou diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão, hipertrigliceridemia e baixo HDL “*high density lipoprotein*”, são componentes da síndrome metabólica e fatores de risco para doenças cardiovasculares (Bonora, 2006). Por isso, a síndrome metabólica representa um grave problema de saúde pública (Darsow et al., 2006).

As doenças cardiovasculares (DCV) são as maiores causas de morte no mundo e lideram os orçamentos destinados a programas de saúde. No ano de 2002, as DCV foram responsáveis por quase 17 milhões de mortes, o que representou cerca de 30% do número total de óbitos no mundo. Mais de 1/3 destas mortes ocorrem de forma prematura em adultos de meia idade (WHO, 2004).

Este fato coincide com o aumento da prevalência global de obesidade, concomitante ao declínio da mortalidade por doenças infectocontagiosas, fenômeno designado por transição nutricional (Popkin, 2001).

O papel da dieta hiperlipídica e/ou da ingestão de carboidratos na patogênese do DM2 é um assunto de debates que ainda permanece controverso. Os camundongos da linhagem C57BL/6J desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão arterial, quando alimentados com uma dieta de alta densidade energética (ADE), mimetizando a síndrome metabólica (SM) em humanos (Adeghate et al., 2006; Gallou-Kabani et al., 2007), mas, diferente de outros modelos animais (hamster), este modelo não é afetado quando alimentado com uma dieta rica em frutose (Messier et al., 2007). Do mesmo modo, quando uma dieta livre de carboidratos simples, cujo conteúdo de carboidrato foi trocado por gordura (20% para 68% respectivamente) é administrada a camundongos, não são observados efeitos deletérios na função das células beta (Jurgens et al., 2007).

A sobrecarga na ingestão de ácidos graxos e seus efeitos nos depósitos de gordura dos camundongos dependem do tempo de ingestão (Bueno et al., 2008). E quando administrado cronicamente, prejudica a regulação da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) das células beta pancreáticas, de forma a adaptar a ilhota a um ambiente metabolicamente alterado, a fim de proteger a ilhota do desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina (Walz et al., 2006).

Um dos mecanismos envolvidos na resistência à insulina e no DM2 na sobrecarga de lipídios por dieta em camundongos C57BL/6J parece ser o aumento da saturação de fosfolipídios da membrana mitocondrial que conduz a uma menor função mitocondrial (de Wilde et al., 2008).

Por outro lado, a ingestão excessiva de lipídios, principalmente de ácidos graxos trans (AGT) e ácidos graxos saturados (AGS), predispõe ao desenvolvimento da resistência à insulina e da esteatose hepática e esta última vem sendo descrita como manifestação hepática da SM (Grundy et al., 2002; Alberti et al., 2005; Haag e Dippenaar, 2005).

A associação entre a obesidade abdominal, síndrome metabólica e DCV está bem caracterizado. A prevalência da síndrome metabólica está a aumentar, e novos critérios diagnósticos foram publicados para corrigir as diferenças étnicas para a determinação do risco cardiovascular em relação a um determinado nível de adiposidade abdominal. Isso leva em conta o papel central que a gordura visceral é proposta a desempenhar no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, e indica como medições da circunferência da cintura podem ser úteis em ajudar na identificação clínica desta morbidade. O aumento da gordura visceral está associado a uma mudança no equilíbrio normal de adipocinas, resultando em um estado pró-inflamatório (Ritchie e Connell, 2007).

Este trabalho visa comparar, em camundongos C57BL/6, os efeitos de uma dieta padrão com uma dieta de alta densidade energética (60% de gordura) sobre a biometria corporal, depósitos de gordura, lipídios sanguíneos, metabolismo de carboidratos, a densidade de volume celular de células  $\alpha$  e de células  $\beta$ , assim como o número e diâmetro das ilhotas pancreáticas.

## 1 OBJETIVOS

- Avaliar o impacto da dieta com alta densidade energética sobre a massa corporal e depósitos de gordura de camundongos C57BL/6.
- Estudar as alterações na morfologia e morfometria do pâncreas de camundongos C57BL/6 que receberam dieta de alta densidade energética.
- Induzir SM em camundongos C57BL/6 por administração de dieta de alta densidade energética.
- Avaliar a intolerância à glicose e a resistência à insulina, assim como analisar as concentrações plasmáticas de glicose, lipídios e insulina.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Síndrome metabólica

Atualmente, diferentes conceitos para definição da síndrome metabólica, dos parâmetros clínicos para o rastreamento e dos valores de corte têm sido propostos por diferentes organizações (*World Health Organization (WHO)*, *The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*, *The National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATPIII)*, *The American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)*, *The International Diabetes Federation (IDF)* e *The American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI)*) para identificar os indivíduos com síndrome metabólica, estando às principais características utilizadas neste diagnóstico resumidas na tabela 1. Recentemente, as organizações reunidas (*International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention*; *National Heart, Lung, and Blood Institute*; *American Heart Association*; *World Heart Federation*; *International Atherosclerosis Society*; and *International Association for the Study of Obesity*) determinaram novos pontos de corte dos parâmetros clínicos e dos valores de corte para circunferência de cintura que estão resumidas nas tabelas 2 e 3 (Alberti et al., 2009).

Embora seja claro que *In Vivo* a resistência à insulina é a alteração chave associada com o processo aterogênico, pró-trombótico e ao perfil inflamatório que tem sido chamado por alguns de "síndrome metabólica", por outros de "síndrome X" ou de "síndrome da resistência à insulina", é cada vez mais reconhecido que a forma mais prevalente da presente constelação de alterações metabólicas associadas à resistência a insulina é encontrada em pacientes com obesidade abdominal, especialmente com um excesso de tecido adiposo intra-abdominal ou de tecido adiposo visceral (Ritchie e Connell, 2007; Despres et al., 2008).

Apesar das características comuns entre as definições, existem parâmetros específicos em que se diferem. A WHO e a EGIR exigem inicialmente classificações como a medição da resistência à insulina, que são parâmetros utilizados principalmente no campo da pesquisa, com o uso de mecanismos para a determinação da resistência à insulina como o teste oral de tolerância à glicose e o teste de hiperinsulinemia, com clamp euglicêmico. Os critérios da ATPIII foram desenvolvidos para ser aplicado no ambulatório, entretanto, em contraste com

outras definições, este não têm critérios de diagnóstico obrigatórios. Desta forma, foram utilizados como base para posterior elaboração de critérios do IDF e do AHA/NHLBI. A IDF tem a obesidade central como critério de classificação, enquanto que a AACE não tem definido parâmetros para este diagnóstico.

Tabela 1. Comparação de algumas das definições mais amplamente utilizada para a síndrome metabólica (Ritchie e Connell, 2007).

<b>WHO (1999)</b>	<b>EGIR (1999)</b>	<b>ATPIII (2001)</b>	<b>IDF (2005)</b>
Diabetes, glicose jejum alterada, intolerância à glicose ou resistência à insulina (hiperinsulinemia definida pelo mecanismo do clamp euglicêmico), acrescido de dois ou mais dos fatores seguintes: IMC >30 kg/m <sup>2</sup> ou relação cintura/quadril >0.9 (H) ou >0.85 (M) TG >150 mg/dl ou HDL-c <35 (H) ou <38 mg/dl (M)	Resistência à insulina considerando os valores de insulina em jejum, além de dois ou mais dos seguintes fatores:  Obesidade central com CC ≥94 cm (H) ou ≥80 cm (M) TG >176 mg/dl ou HDL-c <38 mg/dl	Três ou mais dos seguintes fatores:  CC ≥102 cm (H) ou ≥88 cm (M)  TG >150 mg/dl	Obesidade central (valores étnicos específicos), bem como quaisquer de duas dos seguintes fatores:  TG >150 mg/dl ou sob tratamento específico HDL-c <40 (H) ou <50 mg/dl (M) ou sob tratamento específico PAS ≥130/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva GPJ ≥ 90 mg/dl ou diagnóstico prévio de diabetes tipo 2
PAS >130/90 mmHg	PAS ≥140/90 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva	PAS ≥135/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva	PAS ≥130/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva
Excreção de albumina >20µg/min	GPJ ≥110 mg/dl	GPJ ≥110 mg/dl	GPJ ≥ 90 mg/dl ou diagnóstico prévio de diabetes tipo 2

IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistêmica; H, homens; M, Mulher; GPJ, glicose plasmática de jejum; TG, triglicérideo; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; CC, circunferência da cintura.

Tabela 2. Critério para Diagnóstico Clínico da Síndrome Metabólica (Alberti et al., 2009).

Medidas	Pontes de cortes
Elevated waist circumference*	Population- and country-specific definitions
Elevated triglycerides (drug treatment for elevated triglycerides is an alternate indicator <sup>†</sup> )	≥150 mg/dL (1.7 mmol/L)
Reduced HDL-C (drug treatment for reduced HDL-C is an alternate indicator <sup>†</sup> )	<40 mg/dL (1.0 mmol/L) in males; <50 mg/dL (1.3 mmol/L) in females
Elevated blood pressure (antihypertensive drug treatment in a patient with a history of hypertension is an alternate indicator)	Systolic ≥130 and/or diastolic ≥85 mm Hg
Elevated fasting glucose <sup>‡</sup> (drug treatment of elevated glucose is an alternate indicator)	≥100 mg/dL

\*It is recommended that the IDF cut points be used for non-Europeans and either the IDF or AHA/NHLBI cut points used for people of European origin until more data are available.

<sup>†</sup>The most commonly used drugs for elevated triglycerides and reduced HDL-C are fibrates and nicotinic acid. A patient taking 1 of these drugs can be presumed to have high triglycerides and low HDL-C. High-dose ω-3 fatty acids presumes high triglycerides.

<sup>‡</sup>Most patients with type 2 diabetes mellitus will have the metabolic syndrome by the proposed criteria.

Tabela 3. Recomendação Atual dos Limites de Circunferência da Cintura para Obesidade Abdominal Segundo as Organizações (Alberti et al., 2009).

Population	Organization (Reference)	Recommended Waist Circumference Threshold for Abdominal Obesity	
		Men	Women
Europid	IDF (4)	≥94 cm	≥80 cm
Caucasian	WHO (7)	≥94 cm (increased risk)	≥80 cm (increased risk)
		≥102 cm (still higher risk)	≥88 cm (still higher risk)
United States	AHA/NHLBI (ATP III)* (5)	≥102 cm	≥88 cm
Canada	Health Canada (8,9)	≥102 cm	≥88 cm
European	European Cardiovascular Societies (10)	≥102 cm	≥88 cm
Asian (including Japanese)	IDF (4)	≥90 cm	≥80 cm
Asian	WHO (11)	≥90 cm	≥80 cm
Japanese	Japanese Obesity Society (12)	≥85 cm	≥90 cm
China	Cooperative Task Force (13)	≥85 cm	≥80 cm
Middle East, Mediterranean	IDF (4)	≥94 cm	≥80 cm
Sub-Saharan African	IDF (4)	≥94 cm	≥80 cm
Ethnic Central and South American	IDF (4)	≥90 cm	≥80 cm

\*Recent AHA/NHLBI guidelines for metabolic syndrome recognize an increased risk for CVD and diabetes at waist-circumference thresholds of ≥94 cm in men and ≥80 cm in women and identify these as optional cut points for individuals or populations with increased insulin resistance.

## 2.2 Obesidade

### 2.2.1 Índice de massa corporal (IMC)

A obesidade é uma doença crônica multifatorial complexa que se desenvolve a partir de uma interação do genótipo e do meio ambiente. A nossa compreensão de como e porque se desenvolve obesidade está incompleta, mas é certo que envolve a integração de critérios sociais, comportamentais, culturais, fisiológicos, metabólicos e fatores genéticos. Embora haja um consenso sobre os riscos para a saúde do excesso de peso e da obesidade, há um menor consenso sobre a importância do seu cuidado.

Segundo a WHO, todo indivíduo (com idade de 18 anos ou mais) com um IMC maior que  $25 \text{ kg/m}^2$  é considerado em risco de desenvolvimento de morbidades associadas ao sobrepeso ou obesidade, relacionados a doenças como a hipertensão arterial elevada, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, doenças coronarianas e outras doenças. Os indivíduos com um IMC de 25 a 29,9 são considerados com sobrepeso, enquanto que indivíduos com um  $\text{IMC} \geq 30$  são considerados obesos (Tabela 4) (Alberti e Zimmet, 1998).

Tabela 4 – Risco de doenças associadas à classificação de sobrepeso e obesidade segundo índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura (NIH, 1998).

<b>Classificação de sobrepeso e obesidade pelo IMC, circunferência da cintura e risco associado a doenças*.</b>				
		Classificação da obesidade	<b>Risco de doenças relacionadas à eutrofia e circunferência da cintura.</b>	
			Circunferência da cintura ≤102 cm (H) ou ≤88 cm (M)	Circunferência da cintura >102 cm (H) ou >88 cm (M)
Baixo peso	<18.5		—	—
Eutrófico	18.5 – 24.9		—	—
Sobrepeso	25.0 – 29.9		Aumentado	Alto
Obesidade	30.0 – 34.9	Grau I	Alto	Muito alto
	35.0 – 39.9	Grau II	Muito alto	Muito alto
Obesidade mórbida	≥40	Grau III	Extremamente alto	Extremamente alto

\*Risco de doenças como diabetes tipo 2, hipertensão e DCV. IMC, índice de massa corporal; H, homens; M, Mulher.

Tabela 5 - Valores étnicos específicos para circunferência de cintura (Alberti et al., 2006).

	<b>Sexo</b>	<b>Circunferência da cintura</b>
<b>Europeus (nos EUA, os valores da ATPIII são semelhantes para serem usados na prática clínica)</b>	Homens	≥94 cm
	Mulheres	≥80 cm
<b>Sul asiáticos</b>	Homens	≥90 cm
	Mulheres	≥80 cm
<b>Japoneses</b>	Homens	≥90 cm
	Mulheres	≥80 cm
<b>População do mediterrâneo e oriente médio</b>	Homens	Usar valores de corte europeus
	Mulheres	até avaliação de dados mais específicos

Adaptado do IDF <http://www.idf.org>

### 2.2.2 Obesidade abdominal e circunferência da cintura

Acredita-se que a obesidade abdominal e resistência à insulina sejam as principais forças fisiológicas que resultam nas alterações cardiovasculares e na síndrome metabólica. Deve-se observar que a obesidade abdominal é o único critério de diagnóstico obrigatório instituído pela IDF na síndrome metabólica. A classificação de obesidade abdominal pela IDF foi definida para dar um consenso mundial, levando em consideração as diferenças étnicas, sendo reconhecido como um risco aumentado para DCV, segundo o determinado grau de adiposidade. Os valores determinados de circunferência da cintura instituídos pela IDF utilizados neste diagnóstico estão resumidos na tabela 5.

O excesso de gordura na região do abdômen, avaliado pela circunferência da cintura, de forma desproporcional em relação à gordura corporal total é um fator de risco independente ou um preditor de morbidade. A circunferência da cintura está positivamente correlacionada com o teor de gordura abdominal e fornece uma medição clinicamente aceitável para a avaliação de um paciente, antes e durante o tratamento de emagrecimento. A avaliação do risco de doenças associada à circunferência da cintura e ao IMC está descritos na tabela 4 (NIH, 1998).

Segundo Despres, a obesidade visceral pode representar um fenótipo clínico intermediário, que vem a refletir a relativa incapacidade de tecido adiposo subcutâneo em agir como um protetor para a depuração metabólica e um armazenamento da energia extra, derivada de triglicerídeos dietéticos, levando com isso a uma ectópica deposição de gordura nos depósitos visceral, músculo esquelético, fígado, coração, pâncreas etc. Assim, a obesidade visceral pode ser um marcador parcial de um estado metabólico alterado e em parte a causa da síndrome metabólica. A Figura 1 resume essas ações (Despres, 2006).

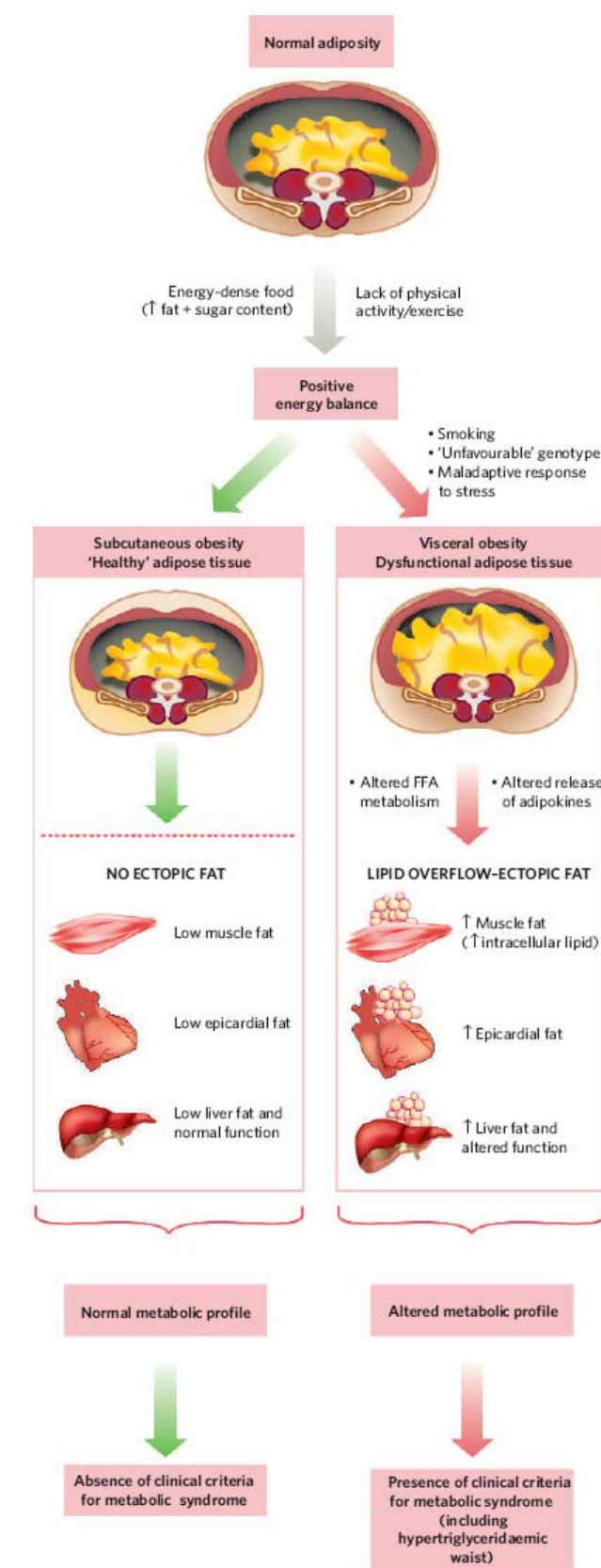


Figura 1 - O acúmulo excessivo de gordura visceral poderia ser casualmente relacionado com as características de resistência à insulina, mas também poderia ser um marcador disfuncional do tecido adiposo pela ineficiência em armazenar adequadamente a energia excedente. De acordo com este modelo, o organismo tem capacidade para lidar com o



excesso de calorias (resultante do excesso de consumo calórico, a vida sedentária, ou, como é frequentemente o caso, uma combinação dos dois fatores) podendo, em último caso, determinar a susceptibilidade do indivíduo em desenvolver a síndrome metabólica. Há evidências sugerindo que, se o excesso de energia é canalizado para o tecido adiposo subcutâneo insulino-sensível, o indivíduo, embora com balanço energético positivo, estará protegido do desenvolvimento da síndrome metabólica. No entanto, nos casos em que o tecido adiposo está ausente, deficiente ou resistente à insulina com uma capacidade limitada de armazenar a energia excedente, os triglicerídeos excedentes serão depositados em locais indesejáveis, tais como o fígado, o coração, o músculo esquelético e no tecido adiposo visceral -- Um fenômeno descrito como depósito de gordura ectópica. Fatores associados a um acúmulo preferencial de gordura visceral e com características de resistência à insulina incluem, entre outros, tabagismo, a susceptibilidade genética a obesidade visceral, que está muito bem documentada (Bouchard et al., 1990) e a um perfil neuroendócrino relacionado com uma resposta mal-adaptada ao estresse. As consequências metabólicas resultantes deste “defeito” na capacidade de partimento da energia incluem obesidade visceral, resistência à insulina, uma dislipidemia aterogênica e um estado pró-trombóticos e pró-inflamatório. Estes são elementos essenciais da síndrome metabólica. Esta constelação de alterações metabólicas podem ser detectadas por meio dos critérios clínicos para a síndrome metabólica, sendo as duas mais simples a presença simultânea do aumento da circunferência da cintura e dos níveis de triglicerídeos em jejum, uma condição que tem sido descrito como “hipertrigliceridemia da cintura”(Lemieux et al., 2000; Despres e Lemieux, 2006).

### **2.3 Dieta de alta densidade energética (ADE)**

O crescente aumento da prevalência de obesidade no mundo vem sendo atribuído principalmente a modificações do estilo de vida, com predominância dietas hiperenergéticas ocidentais e sedentarismo na maior parte dos países. Nesse contexto, o impacto metabólico de dietas ricas em lipídios vem sendo estudado frequentemente e já é aceita internacionalmente a forte correlação entre consumo exagerado de AGS e incidência de DCV (NIH, 1998; NCEP, 2002). Desde então, foram impostas inúmeras recomendações à população visando à redução da ingestão dessa classe lipídica. A partir daí, um aumento compensatório do consumo de AGT, derivado principalmente da inclusão de gordura vegetal hidrogenada na dieta, foi observado. Estatísticas americanas apontam que da média de 35% de

ingestão lipídica da população, 8% representam AGT (Allison et al., 1999; Hu et al., 2001; IBGE, 2004).

Os efeitos do AGT são ainda mais nocivos que os do AGS, pois além de promover aumento da LDL (*“low density lipoprotein”*), reduzem a HDL (*“high density lipoprotein”*) e aumentam o risco de doença coronariana. Além de favorecer a resistência à insulina e o acúmulo de gordura na região abdominal, acentuando o risco de SM em humanos (Kris-Etherton et al., 1997; Hu et al., 2001). Diversos modelos experimentais vêm sendo utilizados para tentar mimetizar o consumo exagerado de AGS e AGT atual e suas alterações metabólicas a partir do emprego de dietas hiperlipídicas ou ADE. Em roedores, os autores são unânimes ao relatarem o aumento da massa corporal dos animais submetidos a esses protocolos após cerca de 3 semanas de dieta ADE, refletindo um aumento da massa adiposa, e sua forte associação com a gênese da HAS após 8 semanas de experimento (Williams et al., 2003; Rahmouni et al., 2004; Gallou-Kabani et al., 2007).

A hipertensão induzida por obesidade em modelos experimentais alimentados com ADE mimetiza as alterações morfológicas e metabólicas da HAS em humanos. A literatura documenta que a etiologia da HAS nesses modelos experimentais engloba resistência à insulina, hiperinsulinemia e estímulo do sistema nervoso simpático, sem descartar o componente renal (Hall et al., 1998; Hall et al., 2003). A redução da expressão do subtipo  $\alpha_2A$ -adrenoreceptor, que possui efeito hipotensor, no rim de animais com sobrepeso induzido por dietas ADE, colabora para o estabelecimento do quadro hipertensivo (Coatmellec-Taglioni et al., 2000; Coatmellec-Taglioni et al., 2002). Além disso, a administração crônica de tais dietas promove alterações hemodinâmicas importantes como elevação da frequência cardíaca e de mais de 50% do débito cardíaco explicadas principalmente pelo incremento do tecido adiposo e seu fluxo sanguíneo associado (Hall et al., 1998).

A HAS induzida por sobrepeso cursa com resistência seletiva à insulina, ou seja, a captação tecidual de glicose é prejudicada, porém algumas propriedades da insulina são mantidas. Mesmo na presença de hiperinsulinemia, indivíduos obesos continuam sensíveis à retenção renal de sódio mediada pela insulina, promovendo HAS. Outros autores associaram níveis suprafisiológicos de insulina ao remodelamento arterial adverso. Além disso, a hiperinsulinemia determina redução da atividade de óxido nítrico sintetase endotelial por bloqueio da via PI3quinase, colaborando para o estabelecimento da HAS por anormalidades na vasodilatação.

Nesse modelo de sobrepeso induzido por ADE, a hiperinsulinemia está relacionada à resistência à leptina e ao acúmulo de triglicerídeos na musculatura periférica e precede a HAS, colaborando para a sua gênese (Osei, 1999; Ginsberg, 2000; Steinberg e Dyck, 2000; Hall et al., 2001; Rocchini, 2002).

A influência da hiperinsulinemia na ativação simpática também não deve ser descartada. O aumento do tônus simpático produz elevação da frequência cardíaca, do débito cardíaco e aumento da reabsorção de sódio. A denervação renal previne tanto a HAS quanto a retenção de sódio associada à obesidade. A ingestão alimentar estimula os receptores  $\beta$ -adrenérgicos e a atividade simpática, determinando aumento do gasto energético. Contudo, ingestão crônica de dietas ADE e a hiperfagia resultante destas promovem estímulos contínuos desses receptores e a consequente redução de sua expressão. A HAS apresenta relação direta com reduzida resposta cardíaca, vascular e glicêmica à  $\beta$ -agonistas, ressaltando os efeitos da estimulação simpática excessiva na gênese da HAS (Kassab et al., 1995; Mancina et al., 1999; Julius et al., 2000; Rocchini, 2002; Grisk e Rettig, 2004; Landsberg, 2006).

Outro efeito das dietas de alta densidade energética é a hiperleptinemia, a qual também aumenta o tônus simpático. Inicialmente reconhecida como um fator envolvido na saciedade, a leptina exerce efeitos renais, metabólicos e sobre o tônus simpático que contribuem para as disfunções cardiovasculares secundárias à obesidade. Níveis elevados de leptina promovem redução da expressão (“*down-regulation*”) do receptor Ob-R (receptor da leptina) na medula renal de ratos alimentados com dietas ADE por mecanismo de degradação mediado por clatrina que segue a rota lisossomal. Isso resulta em reduções na produção de óxido nítrico renal e na natriurese, corroborando para a elevação da PAS (Ahima e Flier, 2000; Hall et al., 2001; Coatmellec-Taglioni et al., 2003).

O excesso de massa corporal também vem sendo relacionado com a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) apesar da retenção de sódio e da expansão do volume extracelular. Esta ativação ocorre principalmente por compressão da medula renal a partir do acúmulo anormal de gordura perirrenal e modificações histológicas da medula renal que incluem aumento dos componentes da matriz extracelular (MEC) e células intersticiais entre os túbulos renais (Hall et al., 1998; Hall, 2003; Hall et al., 2003). Ainda auxiliam na compressão medular o aumento do estresse oxidativo mediado pelo excesso de tecido adiposo ou pela

dieta. Esses resultam em aumento da liberação de renina, o qual vem sendo encontrado em roedores alimentados com dietas ADE e apresentam forte correlação com os elevados níveis pressóricos, indicando uma ação efetiva do SRAA na elevação da PA (Dobrian et al., 2000; Dobrian et al., 2001; Dobrian et al., 2003).

Adicionalmente, a expressão dos componentes do SRAA pelo tecido adiposo explica a forte correlação positiva entre níveis de leptina (indicador da massa de tecido adiposo), angiotensina II e atividade plasmática da renina em indivíduos obesos. A expressão de angiotensina II é regulada positivamente pelos ácidos graxos por mecanismo de transcrição ativado por Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPAR- $\alpha$ ) e/ou Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPAR- $\gamma$ ), estando aumentada na vigência de dietas hiperlipídicas (Engeli et al., 2000; Boustany et al., 2005). Foi demonstrado ainda um aumento da expressão de angiotensinogênio no tecido adiposo intra-abdominal em ratos alimentados com dieta ADE. Esse aumento repercute no SRAA sistêmico, ativando-o, e promovendo HAS (Boustany et al., 2004).

A partir dessa gama de mecanismos propostos e resumidos na Figura 2, a HAS induzida por sobrepeso em roedores submetidos a dietas hiperlipídicas é acompanhada também por remodelamento vascular e renal adversos. Inicialmente, o aumento da taxa de filtração glomerular e a vasodilatação renal ajudam a superar a compressão medular e reabsorção tubular aumentada, mantendo o balanço de sódio à custa de elevação na PAS (Hall et al., 1998; Dobrian et al., 2000; Hall, 2003; Hall et al., 2003).

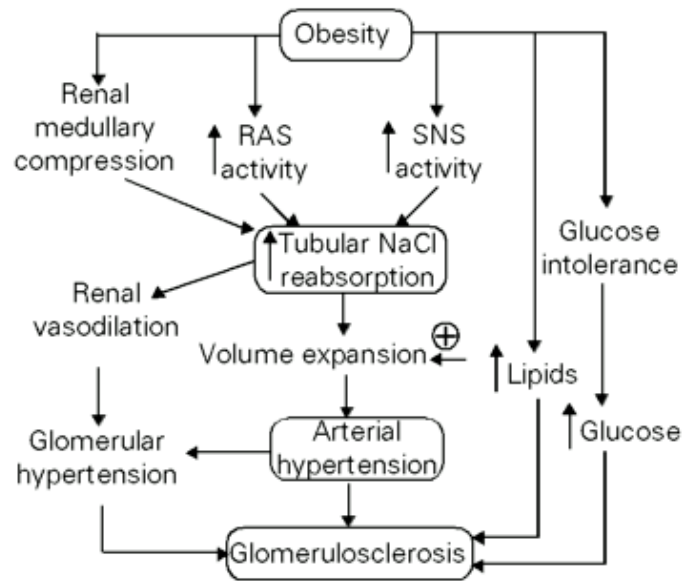


Figura 2 – Mecanismos que conduzem à HAS em roedores alimentados com dieta ADE (Hall et al., 1998).

Recentemente, foi demonstrado que a leptina desempenha ampla variedade de ações durante a gestação e lactação, afetando o crescimento e o desenvolvimento tanto por mecanismos centrais quanto periféricos. No período neonatal, a leptina é crucial à maturação adequada das projeções dos núcleos arqueados hipotalâmicos (primeiras duas semanas pós-natal), à formação do eixo adipoinular e à proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas, todos implicados na regulação precisa do apetite (Haynes et al., 1997; Holmes et al., 2003).

A atividade do eixo adipoinular consiste no fato de que em condições fisiológicas, a insulina estimula a adipogênese e esta promove o aumento da leptina, que por meio de “*feedback*” negativo reduz a produção de insulina pelo pâncreas, mas aumenta a sensibilidade dos tecidos periféricos a esse hormônio, mantendo a homeostase metabólica (Haynes et al., 1997; Kieffer e Habener, 2000; Vickers et al., 2001). Em condições normais, à medida que os estoques de gordura aumentam, níveis circulantes elevados de leptina reduzem a insulina circulante e menos energia é direcionada à formação de estoques de gordura. Em contrapartida, quando os depósitos de gordura caem, níveis reduzidos de leptina permitem o aumento da produção de insulina e a resultante deposição de gordura. Dessa forma, o eixo adipoinular integra o tecido adiposo, o cérebro e o pâncreas endócrino no controle do comportamento alimentar, regulação metabólica e balanço energético (Kieffer e Habener, 2000; Breier et al., 2001). A Figura 3 resume essas ações.

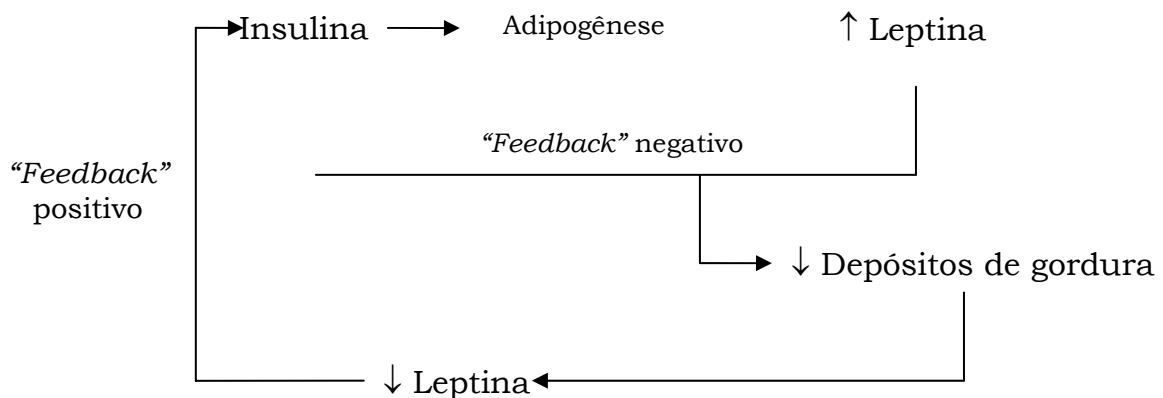


Figura 3 – Eixo adipoinsular

## 2.4 Obesidade e inflamação

A ligação entre obesidade e inflamação foi proposta pela primeira vez em mais de uma década atrás com a conclusão de que as citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), estavam superexpressos na obesidade. Estudos posteriores demonstraram que os níveis plasmáticos de outros mediadores inflamatórios (interleucina-6 [IL-6]) também são elevados. O tecido adiposo é capaz de expressar muitas destas moléculas pró-inflamatórias, com presença de infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco, demonstrando desta forma ser uma fonte potencial de produção de citocinas (Pittas et al., 2004; Ritchie e Connell, 2007).

Atualmente tem-se como hipótese que o tecido adiposo venha a ser o maior órgão endócrino no corpo, sendo secretor de um grande número de substâncias biologicamente importantes denominadas adipocinas. As mais bem caracterizadas adipocinas são a adiponectina, leptina, TNF- $\alpha$  e a interleucina-6 (IL-6) (Hutley e Prins, 2005).

Estudos recentes demonstraram que a ingestão elevada de gordura está associada com estresse oxidativo e ativação do fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição pró-inflamatório (Mohanty et al., 2002). É descrito que uma dieta rica em frutas e fibras, não estimula o processo de inflamação de forma significativa, quando comparado a uma dieta com elevado teor de gordura (Dandona et al., 2005).

Desta forma, o estado pró-inflamatório da obesidade e da síndrome metabólica é originado pela excessiva ingestão calórica. Esse estado pró-inflamatório induz resistência à insulina, levando às manifestações clínicas e bioquímicas da síndrome metabólica (Dandona et al., 2005).

## 2.5 Alterações hepáticas e dieta ADE

O fígado desempenha papel central no controle da homeostase glicêmica e está sujeito a uma regulação complexa por substratos, insulina e outros hormônios. Em roedores, este órgão parece ser particularmente importante para a sensibilidade à insulina, já que desde que a ação hepática da insulina seja preservada, a espécie fica protegida contra o DM2. De fato, roedores estocam quantidade proporcionalmente superior de glicogênio quando comparados a humanos e observa-se forte correlação entre resistência hepática à insulina e hiperglicemia de jejum, ressaltando a importância do fígado na gênese do DM2 nesses animais (Nandi et al., 2004; Diehl, 2005).

Dietas hiperlipídicas aumentam a deposição de gordura. O excesso de tecido adiposo resulta em incremento das taxas de lipólise e maior captação de ácidos graxos livres (AGL) por órgãos como o fígado, pâncreas e músculo esquelético. Normalmente, esse excesso de AGL é canalizado para a mitocôndria onde ocorre a  $\beta$ -oxidação. Contudo, nos estados de resistência à insulina, a carga excessiva de AGL é direcionada à lipogênese (esterificação), conduzindo ao acúmulo de triglicerídeos no interior desses órgãos que não são destinados a essa função, configurando a condição patológica conhecida como esteatose hepática (Holness e Sugden, 1999; Vega, 2001; Festi et al., 2004).

A esteatose hepática ou doença não alcoólica do fígado gorduroso (NAFLD) vem sendo apontada como a manifestação hepática da SM e já acomete 25% da população dos países onde a obesidade é mais prevalente (Marchesini et al., 2001). Embora inicialmente tenha característica benigna, ela representa o ponto de partida de doenças mais graves como esteatohepatite não-alcoólica (NASH), cirrose hepática e hepatocarcinoma. O padrão ouro para seu diagnóstico é o acometimento de mais de 5-10% do peso do tecido ou como percentual de hepatócitos afetados em biópsia hepática. Seus principais fatores de risco incluem obesidade central e resistência à insulina, além do DM2, dislipidemia e utilização de determinados fármacos. A esteatose hepática ocorre sempre que o “*input*” de ácidos graxos (captação, síntese ou esterificação) excede o “*output*” (oxidação e secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)), resultando no acúmulo principalmente de triglicerídeos nos hepatócitos (Brunt et al., 1999; Koteish e Diehl, 2001; Neuschwander-Tetri e Caldwell, 2003; Festi et al., 2004).

Dentre as causas mais frequentes do aumento do “*input*” figuram: o consumo de dietas hiperlipídicas, o aumento da lipogênese “*de novo*” e da esterificação de ácidos graxos (AG). Por outro lado, a redução do output ocorre por meio da menor secreção de VLDL e/ou da  $\beta$ -oxidação. As repercussões da esteatose são sistêmicas, visto que a oxidação de AG nas mitocôndrias de hepatócitos provém uma gama de substratos energéticos essenciais ao metabolismo e esta via metabólica se encontra reduzida na esteatose (Koteish e Diehl, 2001; den Boer et al., 2004).

Os fatores que provocam a progressão da NAFLD, esteatose isolada, para a NASH, caracterizada pela presença de fibrose e necrose, continuam obscuros (Kirsch et al., 2003). Baseado na teoria dos dois passos, o primeiro passo consiste no desenvolvimento da esteatose hepática, a qual uma vez estabelecida promove adaptações de rotas sinalizadoras celulares frente aos níveis elevados de estresse oxidativo. Dessa forma a célula sobrevive nesse meio adverso, mas fica mais propensa ao desenvolvimento do segundo passo que a partir de apoptose e/ou necrose aliada à inflamação conduz à NASH (Festi et al., 2004).

O desenvolvimento da esteatose (primeiro passo) encontra-se intimamente relacionado à obesidade centrípeta à medida que 76% dos portadores são obesos (Marceau et al., 1999; Akbar e Kawther, 2006). A literatura postula que o tecido adiposo abdominal é a maior fonte de AGL. Animais com sobrepeso induzido por dieta ADE cursam com resistência à insulina, a qual possui efeitos distintos sobre o tecido adiposo e hepático. No primeiro, ela estimula a lipólise, com consequente aumento do transporte de AGL para o fígado pela veia porta e aumento do “*input*” de AG. Por outro lado, no fígado, a hiperinsulinemia inibe a  $\beta$ -oxidação, reduzindo o “*output*”. Ambas as ações favorecem o acúmulo de gordura nos hepatócitos, condição que promove resistência hepática à ação da insulina. A perda da capacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose agrava a resistência global à insulina e exacerba a manifestação dos componentes da SM como obesidade, dislipidemia e HAS (Festi et al., 2004; Adams e Angulo, 2005; Brunt, 2005). Outro mecanismo proposto é o aumento da liberação de TNF- $\alpha$  pelo excesso de tecido adiposo visceral. Esta adipocina promove redução da expressão do PPAR- $\alpha$ , receptor nuclear que ativa a transcrição de genes implicados na formação de enzimas ligadas a oxidação lipídica. A redução da atividade do PPAR- $\alpha$  além de reduzir a oxidação lipídica, ativa a apoptose e aumenta o estresse oxidativo,



ambos apontados como cruciais para a progressão para a NASH (Bishop-Bailey, 2000; Koteish e Diehl, 2001; Svegliati-Baroni et al., 2006).

A alta ingestão de AGS pode atuar como o segundo passo, acelerando a progressão da NAFLD para NASH à medida que promove aumento da injúria hepática, ativação de células estreladas, ativação da caspase 3 (efetora) e fibrose periportal (Carmiel-Haggai et al., 2005; Wang et al., 2006). A NASH cursa com alteração da composição da MEC caracterizada pelo aumento da síntese em detrimento à degradação desta. As células estreladas são as mais importantes no tecido hepático para a síntese de MEC e são ativadas por dietas ADE, espécies reativas de oxigênio, triglicerídeos, VLDL e citocinas inflamatórias. Com o desenvolvimento da cirrose, por exemplo, há aumento do número de células estreladas no fígado, as quais na presença de injúria hepática apresentam ativação de mecanismos pré e pós-transcricionais que promovem a deposição de colágeno tipo I e fibrose (Lu et al., 1998; Lieber et al., 2004; Carmiel-Haggai et al., 2005).

A literatura documenta outras evidências de que a qualidade do lipídio da dieta é primordial à patogênese da esteatose hepática. Dietas ricas em AGT promovem o acúmulo de triglicerídeos principalmente no fígado de roedores após 8 semanas de administração, ao passo que dieta similar com o predomínio de AGS eleva preferencialmente os triglicerídeos plasmáticos no mesmo modelo. Uma explicação plausível é a oxidação mais lenta dos isômeros trans em comparação aos isômeros cis de ácidos graxos, o que juntamente com anormalidades do metabolismo lipídico impostas por dietas ADE aumentam a relação AG esterificados/AG oxidados (Aguila et al., 2003; Colandré et al., 2003). Além do aumento da ingestão energética, o elevado estresse oxidativo hepático encontra-se relacionado ao ganho ponderal, resistência à insulina e ao agravamento da SM em roedores alimentados com dietas ADE, predispondo à esteatose hepática (Milagro et al., 2006). Alterações funcionais e estruturais de mitocôndrias hepáticas, local onde ocorre a  $\beta$ -oxidação, aumento da peroxidação lipídica em peroxissomos e microsossomos e o conseqüente aumento do estresse oxidativo já foram relatadas em animais portadores de esteatose microvesicular (Natarajan et al., 2006).

## 2.6 Alterações pancreáticas e dieta ADE

Em 1920, Schaefer relatou uma correlação entre o peso do pâncreas no indivíduo adulto e o peso corporal (Schaefer, 1926). Em 1933, Ogilvie avaliando pâncreas de cadáveres magros e obesos encontrou um percentual de gordura no pâncreas de 9% e 17% respectivamente (Ogilvie, 1933). Na década de 1960 e 1970 a gordura no pâncreas (lipomatose pancreática) foi correlacionada com a idade, obesidade e diabetes tipo 2 (Walters, 1966). Recentes estudos de tomografia computadorizada (TC) e de ressonância magnética, mostraram também correlação entre a obesidade com a quantidade de gordura pancreática (Matsumoto et al., 1995; Kovanlikaya et al., 2005). Além disto, outras observações em humanos sugerem que a gravidade da pancreatite é aumentada em pacientes obesos (Segersvard et al., 2001; Papachristou et al., 2006).

Embora observações tenham sido feitas quanto à presença de gordura em pâncreas de indivíduos obesos, não há estudos descritivos de esteatose pancreática ou de doenças não alcoólicas do pâncreas gorduroso (NAFPD) ou de esteatopancreatite não alcoólica (NASP) associados ao consumo de dieta de alta densidade energética.

Segundo Mathur, os pâncreas de camundongos obesos, deficientes de leptina ( $Lep^{ob}$ ), apresentam-se mais pesados quando comparados aos seus respectivos controles magros (C57BL/6J) e sob avaliação histológica, os animais obesos apresentaram aumento na gordura pancreática total e na gordura intralobular (Mathur et al., 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (publicação N°85-23 do NIH, revisada em 1996). Os cuidados com os animais seguiram as normas impostas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto sob o protocolo CEA/168/2006.

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal Fluminense, mantidos no Laboratório de Morfometria & Morfologia Cardiovascular em caixas apropriadas com condições controladas de temperatura controlada ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $60\pm 10\%$ ) com acesso irrestrito a comida e água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12h claro-escuro, com início às 01:00 a.m. e de reposição de ar (15 minutos/hora).

Os animais foram separados em dois grupos que receberam diferentes dietas durante 16 semanas, a partir da 8ª semana até a 32ª semana de vida, denominados Controle (CO), que recebeu dieta padrão com 76% das calorias de carboidratos, 10% de gordura e 14% de proteína e o grupo que recebeu dieta com alta densidade energética (ADE) com 26% das calorias de carboidratos, 60% de gordura, 14% de proteína. Não houve restrição de proteínas, visto que nas duas dietas a proteína fornecida era fonte de proteínas de alto valor biológico (22g ptn/kg – AIN93), assim como o conteúdo vitamínico e mineral em ambas as dietas eram idênticos e de acordo com as recomendações do “*American Institute of Nutrition*” para roedores na fase de manutenção (AIN 93M) (Reeves et al., 1993).

A manipulação das dietas ofertadas aos animais foi feita pela empresa Rhoster (São Paulo, [www.rhoster.com.br](http://www.rhoster.com.br)) e suas composições químicas estão descritas com detalhes na Tabela 6.

#### 3.2 Massa corporal e ingestão alimentar

A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente a partir da 8ª semana durante todo o curso do experimento, sempre às 14h00min em balança digital (precisão 0,01g). As médias dos grupos em cada semana foram calculadas e

traçadas. O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente às 13h00min. A dieta era fornecida diariamente e todo restante do dia anterior descartado, devido ao alto conteúdo de gordura da dieta ADE, sendo assim susceptível à rancificação.

Tabela 6 - Composição e conteúdo energético das dietas padrão (CO) e de alta densidade energética (ADE).

Ingredientes (g/Kg)	Dieta	
	CO	ADE
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
Mistura de vitamina*	10.0	10.0
Mistura de mineral*	35.0	35.0
Cistina	1.8	1.8
Colina	2.5	2.5
Antioxidante	0.008	0.008
Total em gramas	1,000	1,000
Energia (Kcal/Kg)	3,573	5,404
Hidratos de carbono (%)	76	26
Proteínas (%)	14	14
Lipídios (%)	10	60

\* Mineral and vitamin mixtures (AIN-93M) (10).

### 3.3 Eutanásia e obtenção do material para análise bioquímica

Ao término de 16 semanas de experimento, no dia da eutanásia, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e submetidos ao jejum de 6 horas. Antes do procedimento, os animais foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico intraperitoneal (15 mg/kg). Em seguida, abdômen e tórax foram abertos através de incisão mediana. Em seguida os órgãos foram dissecados e retirados o

pâncreas, fígado e os depósitos de gordura retroperitoneal, perirrenal, epididimária, inguinal e subescapular. Estes foram completamente removidos de ambos os lados e suas massa foram aferidas em balança de precisão digital (precisão 0,001g). A gordura retroperitoneal foi considerada como os depósitos localizados ao redor dos rins e ao longo dos músculos lombares e a gordura perirrenal como os depósitos relacionados diretamente com os rins. A gordura epididimária incluiu o tecido adiposo ao redor dos ureteres, bexiga e epidídimos e a gordura inguinal, como toda gordura localizada na região inguinal.

O fígado, rins, coração como todo e ventrículo esquerdo foram mensurados pelo método de Scherle (Scherle, 1970). A tíbia esquerda foi dissecada e retirada, tendo seu comprimento medido com paquímetro, desde o côndilo ao ápice do maléolo medial. A sua medida foi utilizada para corrigir a massa do fígado, rins e ventrículo esquerdo, pelo fato de suas massas corporais serem díspares entre os grupos, estas poderiam transformar os parâmetros absolutos em dados inconcludentes, dessa forma, foi possível realizar o estudo comparativo entre os grupos (Yin et al., 1982). Os órgãos foram fixados em formaldeído 1.27 mol/l em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 para posterior preparação técnica e microscopia de luz (Carson et al., 1973).

### **3.4 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

Foi realizada a glicemia de jejum e, após a administração por gavagem de solução 25% de glicose (1g/kg camundongo), nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos. No dia da aferição, os camundongos permaneceram em jejum de 6 horas (01 - 07h). As concentrações da glicemia de jejum foram determinadas pelo método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (Accu-Chek Go, Roche Diagnostic, Germany).

### **3.5 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)**

Foi realizada a glicemia de jejum e, após a injeção de insulina intraperitoneal (i.p.) (1U/kg camundongo), foram determinadas as glicemias nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos. No dia da aferição, os camundongos permaneceram em jejum de 4 horas. (01 - 05h). As concentrações da glicemia de jejum foram determinadas pelo

método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (Accu-Chek Go, Roche Diagnostic, Germany).

### 3.6 Radioimunoensaio para insulina e corticosterona

As concentrações plasmáticas foram reconstituídas com 1ml de solução tampão gelatina-fosfato (TGF). Destes, 100µl foram utilizados em duplicatas para a execução do radioimunoensaio. A insulina de jejum e a corticosterona foram mensuradas utilizando os anticorpos anti-insulina (IMMUCHEM™ DOUBLE ANTIBODY, MP BIOMEDICALS, CALIFORNIA, E.U.A., CAT. 07-260121) e anti-corticosterona (IMMUCHEM™ DOUBLE ANTIBODY, MP BIOMEDICALS, CALIFORNIA, E.U.A., CAT. 07-120121) que foram utilizados em solução TGF. O triciado (1,2,6-7-3H-cortisol, Amersham, EUA), com atividade específica de 2,29 TBq/mmol, foi mantido a -20°C até a sua utilização na proporção 15:10,000 em TGF. Desta solução, 100µl foram empregados no ensaio. Depois foram adicionados 200µl a cada amostra de carvão dextran, e mantidos em agitação contínua a 4°C. Após a homogeneização e subsequente repouso por 15min a 4°C, as amostras foram submetidas à centrifugação (3000 RPM, 30 min a 4°C) em centrífuga refrigerada. A contagem foi realizada num contador de radiação beta (Packard, modelo 1900 TR, EUA). O cálculo do 21DF, em ng/dl, foi realizado pelo programa RIACALC (Wallac Oy, Turku, Finlândia). A curva de calibração foi determinada com 7 diferentes concentrações: 39, 78, 156, 313, 625, 1.250 e 2.500 pg/0,1 ml e foram preparadas em TGF a partir do padrão de 21DF (100µg/ml). Os resultados obtidos foram corrigidos em função do volume inicial e da diluição das amostras, para o qual o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,4% para insulina e de 4,4% para a corticosterona.

O índice HOMA-IR (*“homeostasis model assessment-insulin resistance”*) para avaliação da resistência à insulina foi calculado através da seguinte fórmula:  $HOMA-IR = [\text{fasting serum glucose} \times \text{fasting serum insulin} / 22.5]$  (Vogeser et al., 2007) para avaliar resistência à insulina.

### 3.7 Análise bioquímica

Amostras de sangue foram rapidamente obtidos por punção cardíaca do átrio direito e imediatamente após a coleta do sangue, o plasma foi separado por centrifugação em temperatura ambiente ( $2,4 \times 10^3$  rpm por 15 minutos) e estocado individualmente a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização das análises bioquímicas.

O colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram dosados pelo método enzimático colorimétrico, enquanto, que a lipoproteína de alta densidade (HDL) foi mensurada utilizando o método cinético-colorimétrico, de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). O cálculo estimado da concentração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi realizado através da fórmula de Friedwald (Friedewald et al., 1972).

Quanto às enzimas de função hepática, foram dosadas a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e a concentração de fosfatase alcalina (FA) pelo método cinético colorimétrico (Frankel-Reitman).

### 3.8 Estereologia

Os pâncreas foram cuidadosamente dissecados e removidos, estes foram mantidos no mesmo fixador citado acima durante 48h em temperatura ambiente, logo após, estes foram desidratados em alcoóis de concentração crescente até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A). O material embocado foi exaustivamente cortado em série ( $5 \mu\text{m}$ ) e então corados com Hematoxilina-Eosina.

O método “*fractionator*” foi utilizado para estimar o número ilhotas pancreáticas. Em resumo, um número aleatório entre 1 e 50 foi sorteado e a partir deste número os demais cortes foram determinados, por exemplo 10. Neste caso, os cortes 10, 60, 110, 160 etc, foram denominados em cortes primários, e os cortes 18, 68, 118, 168, etc, foram denominados cortes de referência. Estes cortes foram utilizados para quantificar o número total e o diâmetro de ilhotas por pâncreas (para detalhes ver (Gundersen et al., 1988)). Os cortes intermediários foram usados para análise de imunohistoquímica (descrita abaixo).

O diâmetro da ilhota é cerca de  $120 \mu\text{m}$  nos camundongos, e segundo o método do “*fractionators*”, a distância de  $40 \mu\text{m}$  foi estabelecida entre os cortes de

primários e os cortes de referência, uma vez que esta representa cerca de 1/3 a 1/4 do diâmetro das ilhotas pancreáticas. Assim, foram contadas as ilhotas vistas nos cortes primários, por exemplo no 60, e que não eram visualizadas nos cortes de referência, neste caso, no corte 68. (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

O diâmetro da ilhota foi facilmente determinado pela média entre o maior e menor diâmetro, considerando apenas cortes de ilhotas no plano equatorial, sendo analisadas em todos os 7 cortes primários e centrais do pâncreas de forma a uniformizar a amostra. As imagens digitais foram adquiridas em um sistema de vídeo microscópio (formato TIFF, 36-bits de cor, 1280x1024 pixels) com uma câmera LC Evolution acoplada a um microscópio Olympus BX51, todas as imagens foram analisadas com o software Image Pro-Plus versão 5.0 (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, E.U.A.). Pelo menos 40 ilhotas foram medidas por camundongo, totalizando 240 ilhotas por grupo.

### 3.9 Imunohistoquímica

Foram utilizados cortes em Paraplast (5 µm) obtidos a partir de tecido de pâncreas em diferentes níveis, onde foi realizado a recuperação antigênica com tampão citrato em pH 6,0, e a peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio 3%. Os cortes foram lavados com tampão fosfato (PBS). Seguido de incubação com o anticorpo primário anti-glucagon (DakoCytomation, código A0565) e anticorpo anti-insulin (DakoCytomation, código A0564) por 2 horas. As lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS). Anticorpo biotinilado (K0679, Universal DakoCytomation LSAB+ Kit, Peroxidase) foi utilizado como anticorpo secundário e a reação foi detectada com o complexo biotina-estreptavidina-peroxidase. Imunoreação positiva foi identificada após incubação com 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (K3466, DAB, DakoCytomation) e contra corado com hematoxilina de Mayer.

Imagens digitais das ilhotas imunomarcadas foram obtidas com vídeo microscopia (descrito previamente). Com o uso da ferramenta de seleção, foi possível marcar as áreas das ilhotas que foram positivas na imunomarcção para glucagon ou insulina. Esta área selecionada foi segmentada em uma nova imagem digital em preto e branco, onde a cor branca representou o glucagon ou insulina imunomarcados e a cor preta representou o restante tecido. As ilhotas pancreáticas



foram delimitadas usando a ferramenta AOI irregular, e dentro da área selecionada, a porcentagem da área da imagem ocupada por cor branca foi quantificada através da ferramenta histograma. Estas medidas foram obtidas a partir de três cortes não consecutivos de pâncreas de cada camundongo e foram expressas como percentual de células  $\alpha$  e de células  $\beta$ .

O conteúdo total de células em média para os cortes transversos dos anéis de ilhotas pancreáticas foi calculado como densidade de volume celular de células  $\alpha$  e de células  $\beta$  e foi expressa em porcentagem.

### 3.10 Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram analisadas com o teste-t (Student) e os dados são mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e  $P$ -value  $< 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o software de estatística GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórnia, E.U.A.).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Massa corporal e depósitos de gordura

Com relação à massa corporal, todos os animais alimentados com a dieta ADE tiveram ganho ponderal significativamente maior quando comparado ao grupo controle ( $P < 0.0001$ , figura 4, tabela 7) e a diferença da massa corporal foi observada a partir da 2ª semana até a 16ª semana, apresentando ao final do experimento massa corporal 33% maior (figura 2). A área sob a curva (ASC) aumentou 20% em comparação com o grupo controle ( $P = 0.002$ ).

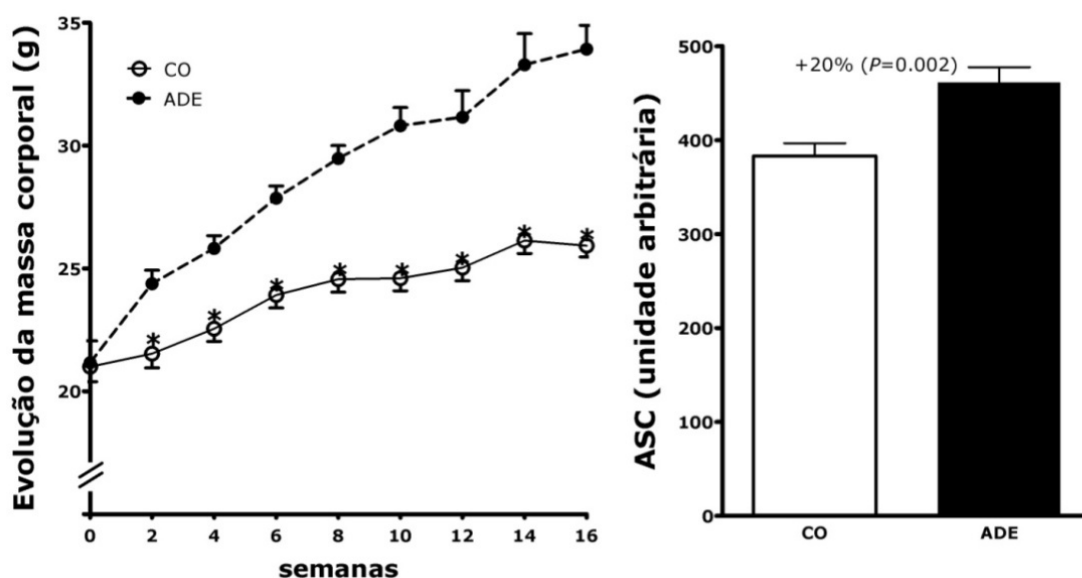


Figura 4 – Evolução da massa corporal durante o estudo e a área sob a curva (ASC) mostrando significantes diferenças entre a massa corporal do grupo alimentado com dieta padrão (CO) e o alimentado com dieta de alta densidade energética (ADE). Valores em média±EPM, n=10.

Na 16ª semana, a massa do fígado (25%,  $P<0.0001$ ) e do pâncreas (19%,  $P=0.01$ ) foram significativamente maiores no grupo ADE quando comparado ao grupo CO (Figura 5).

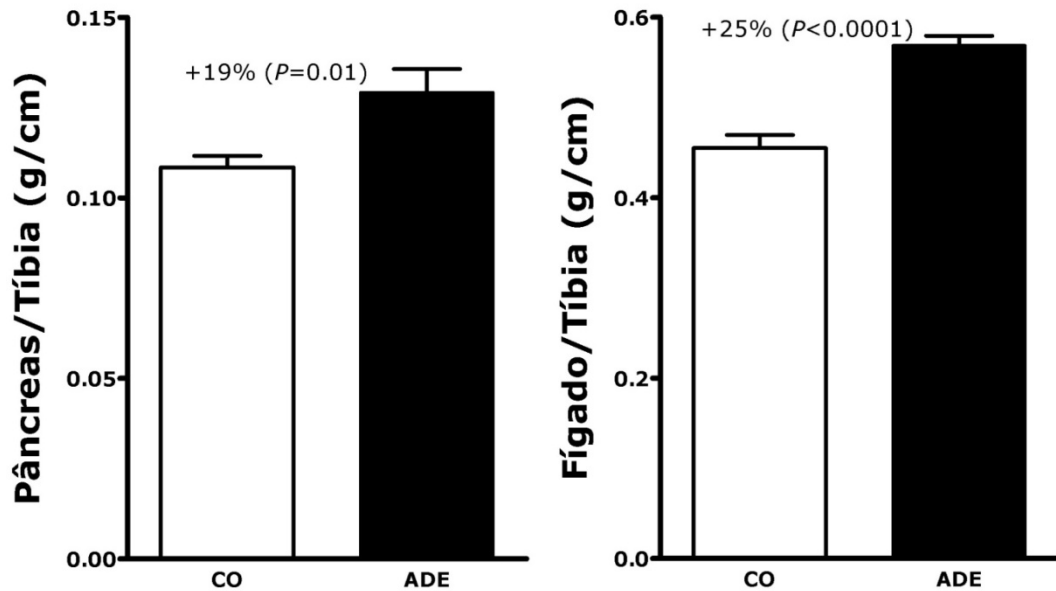


Figura 5 – Massa do fígado e do pâncreas (em gramas) corrigidas pelo comprimento da tíbia (centímetro) mostrando diferenças significativas entre o grupo alimentado com dieta de alta densidade energética (ADE) e o alimentado com dieta padrão (CO). Valores em média $\pm$ EPM, n=10.

A massa total de tecido adiposo visceral (+110%,  $P<0.01$ ), as gorduras retroperitoneal (+124%,  $P<0.01$ ) e epididimária (+90%,  $P<0.01$ ) foram significativamente maiores nos camundongos alimentados com dieta ADE (Figura 6).

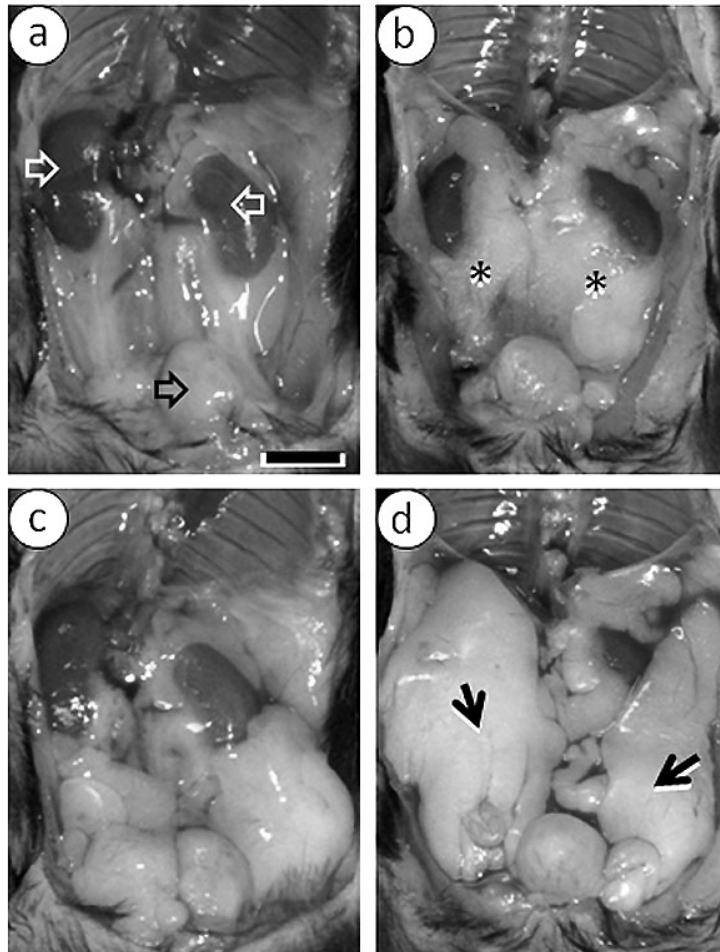


Figura 6 – Vista ventro abdominal do camundongo dissecado mostrando os depósitos de gordura (barra = 25 mm): Gordura retroperitoneal: (a) Grupo CO, os rins (seta branca aberta) estão envoltos por pequenos depósitos de gordura estendidos até a bexiga urinária (seta preta aberta); (b) Grupo ADE, os depósitos de gordura (asterisco) são maiores que o grupo Co, cobrindo parcialmente os rins. Gordura Epididimária: (c) Grupo CO – cobrem toda a parte inferior da cavidade abdominal, mas são muito mais desenvolvidas no grupo ADE (d) (seta).

## 4.2 Dieta e eficiência alimentar

A ingestão de alimento não foi diferente entre os grupos, entretanto, a ingestão de energia (+38%,  $P<0.05$ ) e a ingestão de lipídios por animal (+729%,  $P<0.001$ ) foram maiores no grupo ADE (tabela 7).

A eficiência alimentar foi aumentada (ganho de massa corporal por quilocalorias consumidas) no grupo ADE quando comparado ao grupo CO ( $P<0.01$ , Figura 7). A área sob a curva foi significativamente maior no grupo ADE (+110%,  $P<0.001$ , Figura 7).

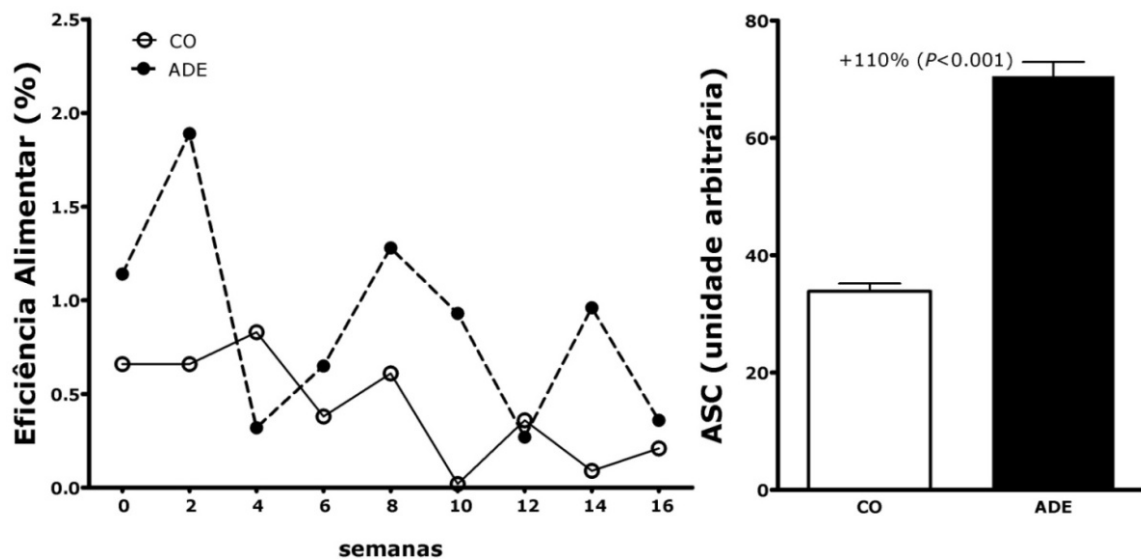


Figura 7 – Eficiência Alimentar (valores em média) mensurada no grupo dieta padrão (CO) e no grupo de alta densidade energética (ADE). A área sob a curva (ASC) mostra a diferença entre os grupos. Valores em  $\text{media} \pm \text{EPM}$ ,  $n=10$ .

### 4.3 Análise bioquímica

Comparando o grupo CO ao grupo ADE, a dieta aumentou os níveis plasmáticos de TG ( $P<0.001$ ), HDL-c ( $P=0.01$ ) e LDL-c ( $P=0.002$ ), mas não houve diferença no colesterol total. Houve diferença significativa nas concentrações de enzimas hepáticas como ALT ( $P=0.01$ ), AST ( $P<0.001$ ) e fosfatase alcalina ( $P<0.001$ ), que foram significativamente aumentadas no grupo ADE quando comparado ao grupo CO (Tabela 7).

Com relação à glicose ( $P=0.01$ ) e a insulina ( $P=0.02$ ) plasmática de jejum, estas foram aumentadas no grupo ADE quando comparados ao grupo CO, com consequente aumento do HOMA-IR nos camundongos alimentados com dieta ADE, que mostrou também elevados níveis de corticosterona plasmática ( $P=0.03$ ) (Tabela 7).

Tabela 7. Composição corporal, alimento e lipídios ingeridos e eficiência alimentar em camundongos alimentados com dieta padrão (CO) e de alta densidade energética (ADE). Valores em média $\pm$ EPM (n=8). Dados analisados por *t*-test (Student).

Biometria e Dados alimentares	Grupos		COxADE
	CO	ADE	<i>P</i>
Massa corporal final, g	25.9 $\pm$ 0.4	33.9 $\pm$ 0.7	<0.001
Ganho de peso, g/semana	0.3 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.1	0.01
% gordura corporal	3.9 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.8	<0.001
Ingestão alimentar, g/dia/animal	2.4 $\pm$ 0.06	2.2 $\pm$ 0.1	ns
Energia ingerida, Kcal/dia/animal	8.4 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 0.1	<0.001
Lipídio ingerido, Kcal/dia/animal	0.8 $\pm$ 0.02	7.1 $\pm$ 0.2	<0.001
Eficiência Alimentar, %	0.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.01

Tabela 8. Análise bioquímica (média±EPM, n=5). LDL-c, LDL-colesterol; HDL-c, HDL-colesterol; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; FA, fosfatase alcalina; CO, dieta padrão; ADE, alta densidade energética.

Parâmetros	Grupos		COxADE
	CO	ADE	<i>P</i>
Glicose, mmol/L	8,3 ± 0,3	9,8 ± 0,4	0,01
Insulina, pmol/L	120,8 ± 1,1	219,8 ± 38,7	0,02
HOMA-IR <sup>1</sup>	44,6 ± 5,3	95,7 ± 10,2	<0,001
Costicosterona (ng/mL)	68,7 ± 14,0	148,4 ± 30,6	0,03
Colesterol, mg/dl	95,7 ± 3,5	104,0 ± 4,3	ns
LDL-c, mg/dl	40,6 ± 3,4	60,6 ± 4,1	0,002
HDL-c, mg/dl	55,1 ± 1,5	63,0 ± 2,2	0,01
Triglicerídeos, mg/dl	23,9 ± 2,6	43,9 ± 4,0	<0,001
AST, UI/l	245,2 ± 16,2	321,4 ± 6,2	<0,001
ALT, UI/l	47,4 ± 5,2	67,4 ± 4,6	0,01
FA, UI/l	37,5 ± 5,7	76,0 ± 6,2	<0,001

<sup>1</sup> concentração de insulina de jejum (pmol/L) x concentração de insulina de jejum (mmol/L)/22.5

#### 4.4 TOTG e TITI

A glicose plasmática de jejum aumentou ao máximo após 15 minutos da administração oral de glicose em ambos os grupos. Entretanto o nível de glicose nos animais alimentados com a dieta ADE foi maior que no grupo CO ( $P < 0.0001$ ). O clearance de glicose nos animais ADE mostrou um atraso na captação desta glicose, permanecendo elevado após 120 minutos da administração da glicose ( $P < 0.001$ ), caracterizando desta forma um retardo no clearance de glicose no grupo ADE quando comparado aos animais do grupo CO (Figura 8). A ASC de glicose nos animais alimentados com a dieta ADE foi significativamente maior (+19%,  $P = 0.003$ ) (Figura 8).

O TITI demonstrou uma rápida redução nos valores da glicose plasmática aos 15 minutos de administração da insulina (i.p) em ambos os grupos, mas a glicose plasmática permaneceu significativamente elevada em camundongos alimentados com dieta ADE quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão (CO) ( $P < 0.0001$ ) em todos os tempos até os 120 minutos (Figura 9). A área sob a curva do TITI foi significativamente maior nos animais alimentados com dieta de alta densidade energética (+67%,  $P = 0.002$ ) (Figura 9).



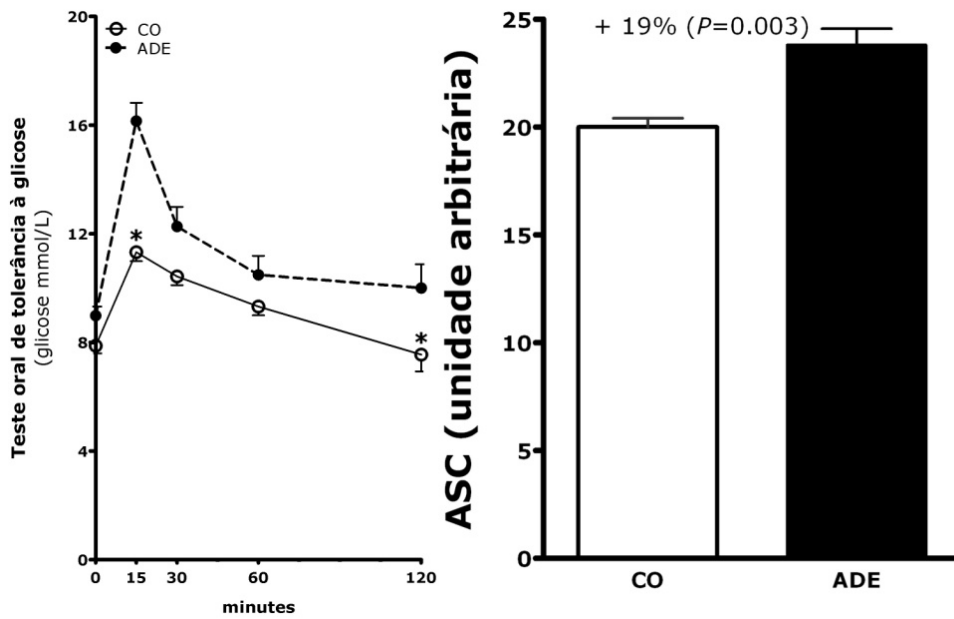


Figura 8 – Curva do teste oral de tolerância à glicose na 14ª semana. A área sob a curva mostra uma significativa diferença entre o grupo alimentado com dieta padrão (CO) e o grupo alta densidade energética (ADE). Valores em média±EPM, n=5.

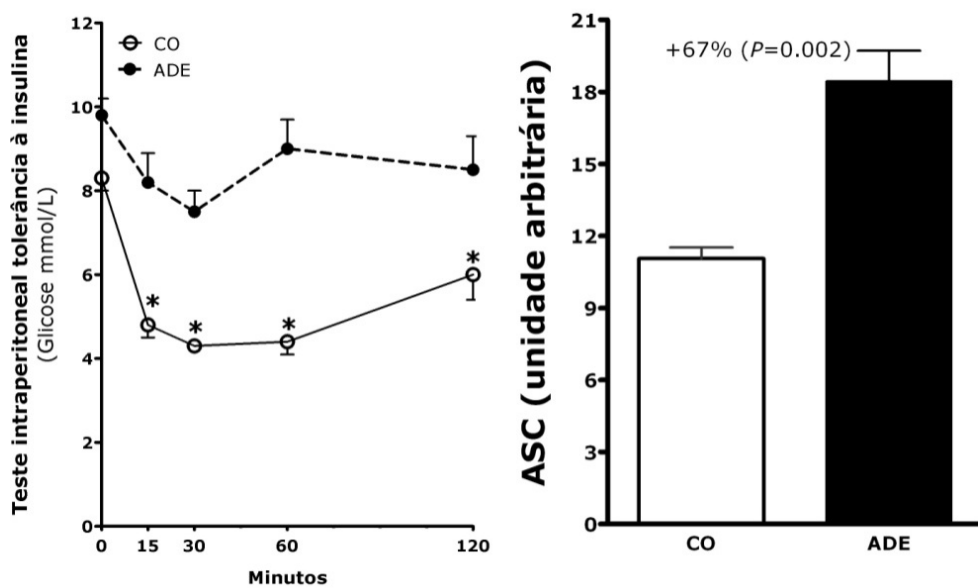


Figura 9 – Curva do teste intraperitoneal de tolerância à insulina na 15ª semana. A área sob a curva mostra uma significativa diferença entre o grupo alimentado com dieta padrão (CO) e o grupo alta densidade energética (ADE). Valores em média±EPM, n=5.

#### 4.5 Densidade de células $\alpha$ e $\beta$ das ilhotas pancreáticas

Os animais do grupo ADE apresentaram ilhotas pancreáticas maiores, a média do diâmetro da ilhota variou de  $115.2 \pm 4.2 \mu\text{m}$  no grupo CO para  $151.3 \pm 5.3 \mu\text{m}$  no grupo ADE (+30%,  $P < 0.01$ ) (figura 10). Quanto ao número de ilhotas pancreáticas, não houve diferença entre os animais do grupo alimentado com dieta de alta densidade energética e os animais alimentados com dieta padrão (figura 10).

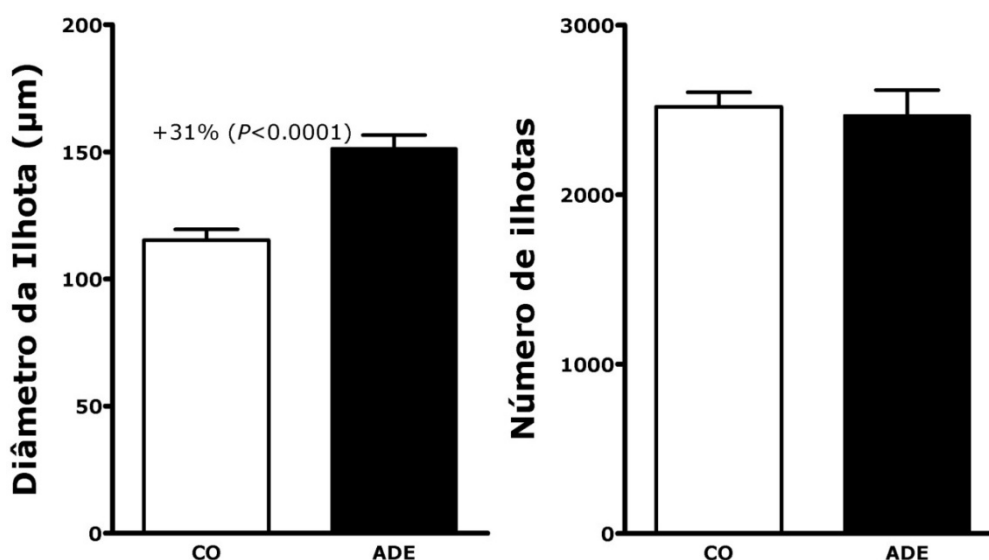


Figura 10 - Diâmetro da Ilhota: grupo alimentado com dieta padrão (CO) e o alimentado com dieta de alta densidade energética (ADE). Valores em média  $\pm$  EPM,  $n=5$ . Número de ilhotas: grupo alimentado com dieta padrão (CO) e o alimentado com dieta de alta densidade energética (ADE). Valores em unidades,  $n=5$ .

O grupo ADE apresentou ainda um aumento significativo na imunodensidade de células alfa e de células beta quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão (CO) (Figuras 11 e 12). De forma comum, a positiva imunomarcagem para glucagon (células alfa) foi maior na periferia das ilhotas (Figura 11), enquanto que a imunomarcagem para insulina (células beta) foi maior na região central da ilhota (Figura 12).

Fotomicrografias representativas da avaliação histológica de cortes de pâncreas do grupo CO e do grupo ADE também são mostradas nas figuras 11 e 12.

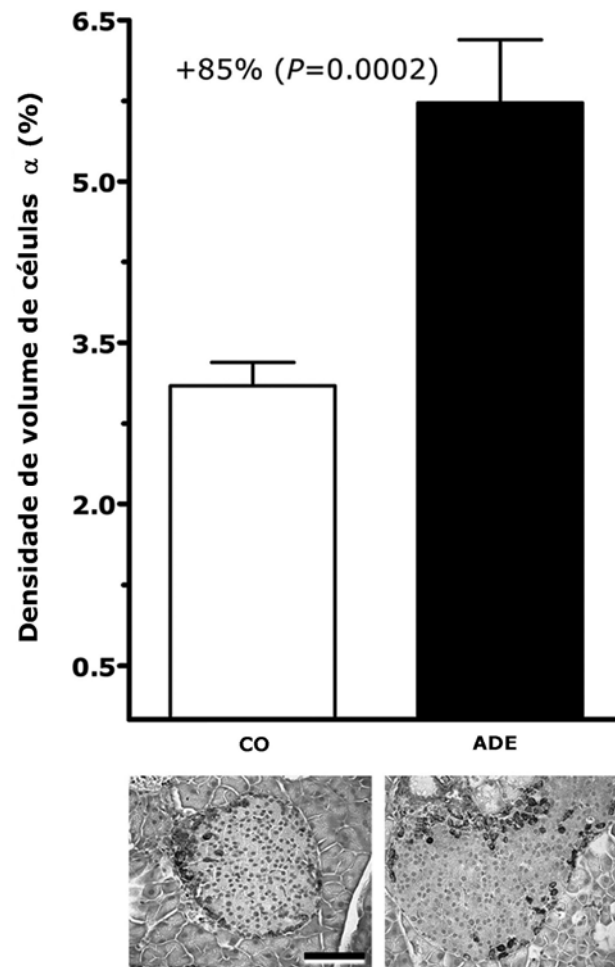


Figura 11 – A densidade de volume de células alfa nas ilhotas pancreáticas dos grupos alimentados com dieta padrão (CO) e com dieta de alta densidade energética (ADE) foi mensurada por análise de imagens. Esta foi significativamente maior no grupo ADE. Fotomicrografias abaixo das colunas mostram as ilhotas de ambos os grupos com marcação positiva para glucagon (mesma calibração, barra = 40  $\mu$ m). Os valores são dados em média $\pm$ EPM, n = 10.

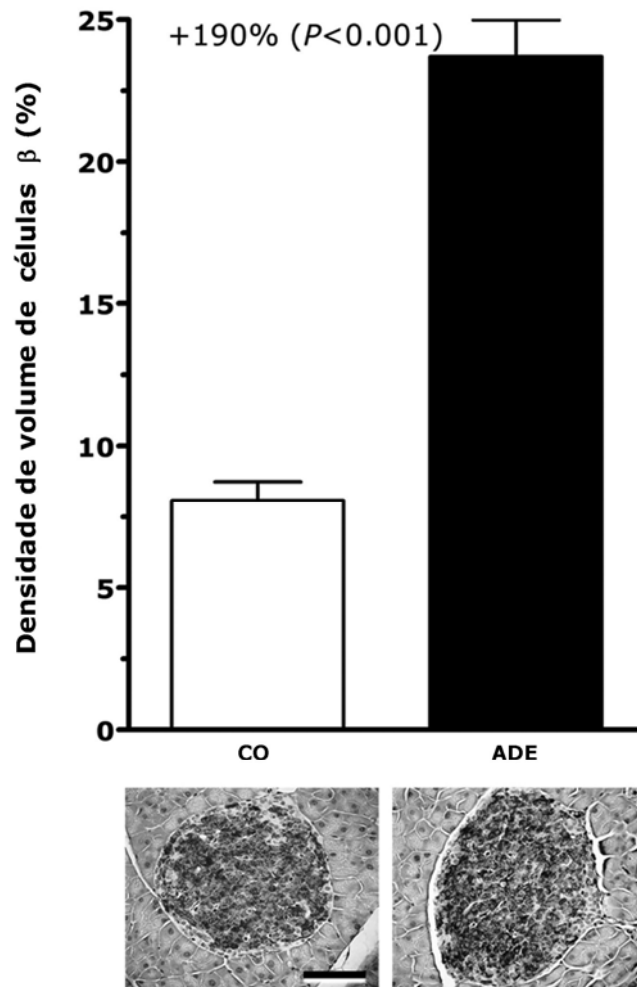


Figura 12 – A densidade de volume de células beta nas ilhotas pancreáticas dos grupos alimentados com dieta padrão (CO) e com dieta de alta densidade energética (ADE) foi mensurada por análise de imagens. Esta foi significativamente maior no grupo ADE. Fotomicrografias abaixo das colunas mostram as ilhotas de ambos os grupos com marcação positiva para insulina (mesma calibração, barra = 40  $\mu$ m). Os valores são dados em média $\pm$ EPM, n = 10.

#### 4.6 Histologia do pâncreas

No presente estudo encontramos no grupo de animais alimentados com dieta ADE, alterações na morfometria das ilhotas pancreáticas como descrito anteriormente, acompanhadas de deposição de gordura interlobular e presença de esteatose microvesicular em ácidos de animais alimentados com dieta ADE, o mesmo não ocorreu no grupo CO (figura 13).

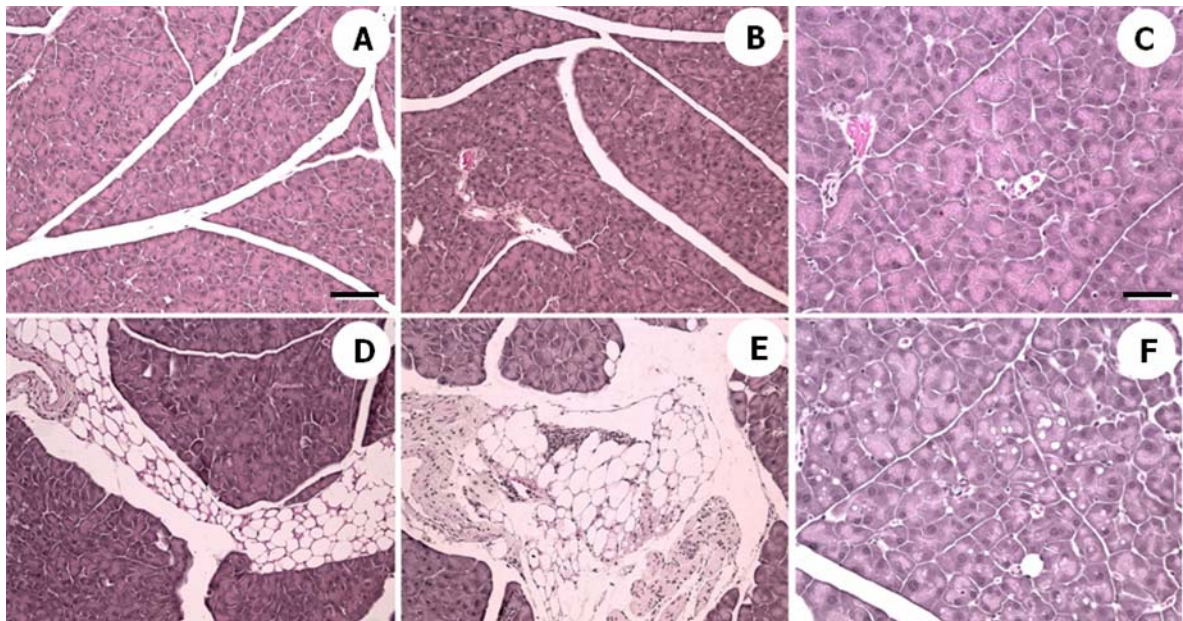


Figura 13 – Fotomicrografia da morfologia do pâncreas visualizadas através da coloração de Hematoxilina e Eosina. (A) e (B) Visualização típica dos lóbulos pancreáticos do grupo controle (aumento de 20x, barra=100  $\mu$ m). (C) Histologia pancreática em maior aumento (aumento de 40x, barra=50  $\mu$ m) com observação dos ácidos do grupo controle. (D) e (E) Visualização dos lóbulos pancreáticos de animais alimentados com dieta ADE, com presença de gordura interlobular (aumento de 20x). (F) Presença de esteatose microvesicular em ácidos de animais alimentados com dieta ADE (aumento de 40x).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que há desenvolvimento de obesidade com resistência à insulina em camundongo C57BL/6 submetido cronicamente à dieta rica em gordura. Além disso, os animais apresentam dislipidemia e alterações estruturais pancreáticas que fazem deles um modelo experimental adequado à comparações com a síndrome metabólica humana.

Os camundongos das linhagens B6 ganham mais peso quando alimentado com uma dieta rica em gordura com aumento de eficiência alimentar. O aumento da massa corporal no camundongo B6 alimentado com uma dieta de alta densidade energética se caracteriza por aumento na gordura visceral. A massa de gordura epididimária pode ser usada para o cálculo do percentual de gordura corporal, pois está fortemente correlacionado com a gordura corporal total. O uso da dieta rica em gordura aumenta o tamanho de adipócitos no tecido adiposo epididimário, e está associada com a obesidade hiperplásica (Strissel et al., 2007).

O tecido adiposo é um órgão ativo da síndrome metabólica. A gordura visceral é conhecida por desempenhar importante papel nas disfunções metabólicas que ocorrem como consequência da obesidade. O tecido adiposo produz adipocinas, quimiocinas e citocinas, que são referidos coletivamente como adipocitocinas (Juge-Aubry et al., 2005; Greenberg e Obin, 2006). Em adultos magros, as adipocinas, como a leptina e adiponectina, desempenham papel normal no metabolismo corporal. No entanto, em indivíduos obesos há aumento da leptina e redução da produção de adiponectina pelas células adiposas, estas adipocinas alteradas levam à infiltração de monócitos e macrófagos na gordura (Greenberg e Obin, 2006).

Em geral, o tecido adiposo intra-abdominal de roedores e humanos é suscetível à infiltração por macrófagos e é a maior fonte de mediadores inflamatórios. Desta forma, contribui de maneira intensa para algumas complicações metabólicas da obesidade, mais do que o tecido adiposo subcutâneo (Strissel et al., 2007).

Neste trabalho vimos que o pâncreas dos camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura é mais pesado do que o dos animais controle, o que está em acordo com estudo recente da literatura (Mathur et al., 2007). No presente estudo encontramos maior deposição de gordura interlobular

pancreática nos animais alimentados com dieta rica em gordura, chegando à esteatose microvesicular.

Roedores alimentados com dieta rica em gordura sofrem de aumento da massa do fígado e esteatose hepática não alcoólica (dados de nosso laboratório) (Souza-Mello et al., 2007). O aumento da infiltração de gordura no pâncreas associado à obesidade foi relatado em humanos (estudo em cadáveres) (Ogilvie, 1933), e foi visto no presente estudo em camundongos C57Bl/6 como resultado da alimentação crônica com dieta rica em gordura. O perfil lipídico desses camundongos mostrou níveis plasmáticos elevados de triglicérides e LDL-c, mas não no colesterol total. As enzimas hepáticas estavam alteradas. Este dado é importante porque a presença de esteatose hepática não alcoólica é um achado frequente e que aumenta a morbidez da síndrome metabólica humana (den Boer et al., 2004; Adams et al., 2006), principalmente o risco de doenças cardiovasculares (Vozarova et al., 2002; Hanley et al., 2005). A coexistência de valores elevados de ALT (próximo ao limite superior da normalidade) e de HOMA-IR elevado é um preditor independente de risco cardiovascular (Salazar et al., 2007).

O aumento da gordura pancreática e de ácidos graxos livres parece ter um papel na progressão da esteatose pancreática ao câncer. Esta hipótese é firmada pelos estudos que demonstram que uma dieta rica em gordura aumenta o risco de câncer de pâncreas, tanto em humanos, quanto em modelos animais (Birt et al., 1989; Ghadirian et al., 1991).

Os resultados do presente estudo mostram que dieta rica em gordura é capaz de levar à resistência à insulina, associada com obesidade e aumento da gordura pancreática. Estudos clínicos demonstram que a resistência à insulina é associada com o desenvolvimento de doenças nas artérias coronárias, sendo um fator de risco independente (Fujiwara et al., 2005).

O glucagon, também secretado pelo pâncreas, é conhecido por ter função na manutenção da glicose circulante, principalmente através da regulação da produção de glicose hepática (Jiang e Zhang, 2003). O hormônio glucagon se liga à receptores específicos sobre os hepatócitos e ativa as vias de glicogenólise e gliconeogênese, aumentando assim a produção hepática de glicose (Beuers e Jungermann, 1990). A ação do glucagon se opõe à insulina, sendo a relação entre a insulina e o glucagon um fator determinante na manutenção dos níveis de glicose circulante (Sloop et al., 2005). Vários estudos têm sugerido que o glucagon está relacionado ao

desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Unger e Orci, 1975; Unger, 1978). O aumento da secreção de glucagon prediz à intolerância à glicose em humanos (Larsson e Ahren, 2000). A supressão alterada da secreção de glucagon está associada à intolerância à glicose, e os níveis plasmáticos de glucagon são elevadas em indivíduos com diabetes tipo 2 (Ohneda et al., 1978). O presente estudo mostra que camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura (de alta densidade energética) sofrem com aumento na imuno densidade de células alfa e aumento da glicemia de jejum.

A regulação de longo prazo da massa de células beta pancreáticas é determinada pela diferença entre a proliferação dessas células (incluindo replicação e neogênese), e a perda das células (através de apoptose, necrose e senescência) (Finegood et al., 1995; Corbett et al., 1997). A redução da massa de células beta ocorre em seres humanos e em modelos animais de diabetes tipo 2 (Kaneto et al., 1996; Pick et al., 1998).

O diabetes Tipo 2 é a consequência da progressiva incapacidade de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, normalmente associada à obesidade e à resistência à insulina. Dois diferentes cenários têm sido propostos como mecanismo fisiopatológico deste processo. Em primeiro lugar, danos à célula beta podem resultar de estresse oxidativo e também decorrentes a elevados níveis de glicose (Yki-Jarvinen, 1992). É importante salientar que a obesidade induzida por acúmulo de gordura ectópica no pâncreas provoca apoptose das células beta (Lee et al., 1994; Unger, 2003).



## 6 CONCLUSÃO

Camundongos C57BL/6 alimentados cronicamente com dieta de alta densidade energética mimetizam sinais e sintomas comparáveis ao da síndrome metabólica humana, sendo, por isso, um modelo experimental interessante para estudar esta síndrome. As principais Características dos animais após a ação da dieta são:

- Elevado ganho de massa corporal acompanhado de aumento nos depósitos de gordura visceral;
- Dislipidemia com aumento principalmente de triglicérides e LDL-colesterol;
- Intolerância à glicose, e resistência à insulina;
- Aumento na massa do pâncreas, com maior diâmetro médio de ilhotas pancreáticas, mas sem alteração em seu número;
- Deposição de gordura pancreática interlobular e presença de esteatose microvesicular nos ácinos pancreáticos;
- Maior imuno densidade de células alfa e beta nas ilhotas pancreáticas.

## REFERÊNCIAS

- Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22:1129-1133.
- Adams LA, Angulo P, Abraham SC, Torgerson H, Brandhagen D. The effect of the metabolic syndrome, hepatic steatosis and steatohepatitis on liver fibrosis in hereditary hemochromatosis. *Liver Int* 2006; 26:298-304.
- Adeghate E, Christopher Howarth F, Rashed H, Saeed T, Gbewonyo A. The effect of a fat-enriched diet on the pattern of distribution of pancreatic islet cells in the C57BL/6J mice. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084:361-370.
- Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarin-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23:363-370.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:413-437.
- Akbar DH, Kawther AH. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: what we know and what we don't know. *Med Sci Monit* 2006; 12:RA23-26.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120:1640-1645.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059-1062.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23:469-480.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15:539-553.
- Allison DB, Egan SK, Barraj LM, Caughman C, Infante M, Heimbach JT. Estimated intakes of trans fatty and other fatty acids in the US population. *J Am Diet Assoc* 1999; 99:166-174; quiz 175-166.
- Beuers U, Jungermann K. Relative contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to basal, glucagon- and nerve stimulation-dependent glucose output in the perfused liver from fed and fasted rats. *Biochem Int* 1990; 21:405-415.
- Birt DF, Julius AD, White LT, Pour PM. Enhancement of pancreatic carcinogenesis in hamsters fed a high-fat diet ad libitum and at a controlled calorie intake. *Cancer Res* 1989; 49:5848-5851.
- Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2000; 129:823-834.
- Bonora E. The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann Med* 2006; 38:64-80.

Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 1990; 322:1477-1482.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R943-949.

Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289:R181-186.

Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY, Wong WP. Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:73-79.

Brunt E, Janney C, Di Bisceglie A, Neuschwander-Tetri B, Bacon B. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroent* 1999; 94:2467-2474.

Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005; 33:68-71.

Bueno AA, Oyama LM, de Oliveira C, Pisani LP, Ribeiro EB, Silveira VL, Oller do Nascimento CM. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch* 2008; 455:701-709.

Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J* 2005; 19:136-138.

Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:365-373.

Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Giudicelli Y, Ribiere C. Gender difference in diet-induced obesity hypertension: implication of renal alpha2-adrenergic receptors. *Am J Hypertens* 2002; 15:143-149.

Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Giudicelli Y, Ribiere C. Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305:362-367.

Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Ribiere C, Giudicelli Y. Hypertension in cafeteria-fed rats: alterations in renal alpha2-adrenoceptor subtypes. *Am J Hypertens* 2000; 13:529-534.

Colandré M, Diez R, Bernal C. Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model. *Br J Nutr* 2003; 89:631-638.

Corbett J, Serup P, Bonner-Weir S, Nielsen JH. Beta-cell ontogeny: growth and death. *Diabetologia* 1997; 40 Suppl 3:B27-32.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111:1448-1454.

Darsow T, Kendall D, Maggs D. Is the metabolic syndrome a real clinical entity and should it receive drug treatment? *Curr Diab Rep* 2006; 6:357-364.

de Wilde J, Mohren R, van den Berg S, Boekschoten M, Dijk KW, de Groot P, Muller M, Mariman E, Smit E. Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Physiol Genomics* 2008; 32:360-369.

den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:644-649.

Despres JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006; 38:52-63.

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444:881-887.

Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodes-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008.

Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33:138-144.

Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 2000; 35:1009-1015.

Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* 2001; 37:554-560.

Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F619-628.

Engeli S, Negrel R, Sharma A. Physiology and Pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35:1270-1277.

Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004; 5:27-42.

Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 1995; 44:249-256.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.

Fujiwara T, Saitoh S, Takagi S, Takeuchi H, Isobe T, Chiba Y, Miura T, Shimamoto K. Development and progression of atherosclerotic disease in relation to insulin resistance and hyperinsulinemia. *Hypertens Res* 2005; 28:665-670.

Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, Tome D, Jais JP, Junien C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15:1996-2005.

Ghadirian P, Simard A, Baillargeon J, Maisonneuve P, Boyle P. Nutritional factors and pancreatic cancer in the francophone community in Montreal, Canada. *Int J Cancer* 1991; 47:1-6.

- Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; 106:453-458.
- Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:461S-465S.
- Grisk O, Rettig R. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2004; 61:238-246.
- Grundy SM, Abate N, Chandalia M. Diet composition and the metabolic syndrome: what is the optimal fat intake? *Am J Med* 2002; 113 Suppl 9B:25S-29S.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:857-881.
- Haag M, Dippenaar NG. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med Sci Monit* 2005; 11:RA359-367.
- Hall J, Brands M, Henegar J, Shek E. Abnormal kidney function as a cause and a consequence of obesity hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25:58-64.
- Hall J, Hildebrandt D, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypert* 2001; 14:103S-115S.
- Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 2003; 41:625-633.
- Hall JE, Kuo JJ, da Silva AA, de Paula RB, Liu J, Tallam L. Obesity-associated hypertension and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12:195-200.
- Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Jr., Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2005; 54:3140-3147.
- Haynes W, Sivitz W, Morgan D, Walsh S, Mark A. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 1997; 30:619-623.
- Holmes MC, Yau JL, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain: two enzymes two roles. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1007:357-366.
- Holness MJ, Sugden MC. Antecedent protein restriction exacerbates development of impaired insulin action after high-fat feeding. *Am J Physiol* 1999; 276:E85-93.
- Hu FB, Manson JE, Willett WC. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J Am Coll Nutr* 2001; 20:5-19.
- Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330:280-289.
- IBGE. Pesquisas de orçamentos familiares 2002-2003: primeiros resultados: Brasil e grandes regiões. *IBGE / Coordenação de Índices de Preços* 2004.
- Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:E671-678.
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19:547-566.

Julius S, Valentini M, Palatini P. Overweight and hypertension : a 2-way street? *Hypertension* 2000; 35:807-813.

Jurgens HS, Neschen S, Ortmann S, Scherneck S, Schmolz K, Schuler G, Schmidt S, Bluher M, Klaus S, Perez-Tilve D, Tschop MH, Schurmann A, Joost HG. Development of diabetes in obese, insulin-resistant mice: essential role of dietary carbohydrate in beta cell destruction. *Diabetologia* 2007; 50:1481-1489.

Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Taniguchi N. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 1996; 320 ( Pt 3):855-863.

Kassab S, Kato T, Wilkins FC, Chen R, Hall JE, Granger JP. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension* 1995; 25:893-897.

Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E1-E14.

Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1272-1282.

Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21:89-104.

Kovanlikaya A, Mittelman SD, Ward A, Geffner ME, Dorey F, Gilsanz V. Obesity and fat quantification in lean tissues using three-point Dixon MR imaging. *Pediatr Radiol* 2005; 35:601-607.

Kris-Etherton PM, Yu S, Etherton TD, Morgan R, Moriarty K, Shaffer D. Fatty acids and progression of coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1088-1090.

Landsberg L. Feast or Famine: The Sympathetic Nervous System Response to Nutrient Intake. *Cell Mol Neurobiol* 2006.

Larsson H, Ahren B. Glucose intolerance is predicted by low insulin secretion and high glucagon secretion: outcome of a prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetologia* 2000; 43:194-202.

Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:10878-10882.

Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Almeras N, Bergeron J, Gaudet D, Tremblay G, Prud'homme D, Nadeau A, Despres JP. Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation* 2000; 102:179-184.

Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:502-509.

Lu LG, Zeng MD, Li JQ, Hua J, Fan JG, Fan ZP, Qiu DK. Effect of lipid on proliferation and activation of rat hepatic stellate cells (I). *World J Gastroenterol* 1998; 4:497-499.

- Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension* 1999; 34:724-728.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75:469-486.
- Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1513-1517.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50:1844-1850.
- Mathur A, Marine M, Lu D, Swartz-Basile DA, Saxena R, Zyromski NJ, Pitt HA. Nonalcoholic fatty pancreas disease. *HPB (Oxford)* 2007; 9:312-318.
- Matsumoto S, Mori H, Miyake H, Takaki H, Maeda T, Yamada Y, Oga M. Uneven fatty replacement of the pancreas: evaluation with CT. *Radiology* 1995; 194:453-458.
- Messier C, Whately K, Liang J, Du L, Puissant D. The effects of a high-fat, high-fructose, and combination diet on learning, weight, and glucose regulation in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 2007; 178:139-145.
- Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14:1118-1123.
- Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:767-772.
- Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 2004; 84:623-647.
- Natarajan SK, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: Role of mitochondria and peroxisomes. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:1240-1249.
- NCEP. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) *National institute of health* 2002.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-1219.
- NIH. Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults: The evidence report. *National Institutes of Health* 1998; Publication N°98-4083.
- Ogilvie RF. The islands of Langerhans in 19 cases of obesity. *J Pathol Bact* 1933; 37:473-481.
- Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S. Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 46:504-510.

Osei K. Insulin resistance and systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1999; 84:33J-36J.

Papachristou GI, Papachristou DJ, Avula H, Slivka A, Whitcomb DC. Obesity increases the severity of acute pancreatitis: performance of APACHE-O score and correlation with the inflammatory response. *Pancreatology* 2006; 6:279-285.

Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 1998; 47:358-364.

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

Popkin B. The nutrition transition and obesity in developing world. *J Nutr* 2001; 131:871S-873S.

Rahmouni K, Mark AL, Haynes WG, Sigmund CD. Adipose depot-specific modulation of angiotensinogen gene expression in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E891-895.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 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* 1993; 123:1939-1951.

Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:319-326.

Rocchini AP. Obesity hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15:50S-52S.

Salazar MR, Carbajal HA, Curciarello JO, Aizpurua M, Adrover RE, Riondet B. Alanine-aminotransferase: an early marker for insulin resistance? *Medicina (B Aires)* 2007; 67:125-130.

Schaefer JH. The normal weight of the pancreas in the adult human being: a biometric study. *Anat Rec* 1926; 32: 119-132.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26:57-60.

Segersvard R, Sylvan M, Herrington M, Larsson J, Permert J. Obesity increases the severity of acute experimental pancreatitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:658-663.

Sloop KW, Michael MD, Moyers JS. Glucagon as a target for the treatment of Type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9:593-600.

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

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

Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; 56:2910-2918.



Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A Model of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Treatment on Liver Injury. *Am J Pathol* 2006; 169:846-860.

Unger RH. Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of the controversy. *Metabolism* 1978; 27:1691-1709.

Unger RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 2003; 144:5159-5165.

Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1975; 1:14-16.

Vega GL. Results of Expert Meetings: Obesity and Cardiovascular Disease. Obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Am Heart J* 2001; 142:1108-1116.

Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* 2001; 170:323-332.

Vogeser M, Konig D, Frey I, Predel HG, Parhofer KG, Berg A. Fasting serum insulin and the homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR) in the monitoring of lifestyle interventions in obese persons. *Clin Biochem* 2007; 40:964-968.

Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1889-1895.

Walters MN. Adipose atrophy of the exocrine pancreas. *J Pathol Bacteriol* 1966; 92:547-557.

Walz HA, Harndahl L, Wierup N, Zmuda-Trzebiatowska E, Svennelid F, Manganiello VC, Ploug T, Sundler F, Degerman E, Ahren B, Holst LS. Early and rapid development of insulin resistance, islet dysfunction and glucose intolerance after high-fat feeding in mice overexpressing phosphodiesterase 3B. *J Endocrinol* 2006; 189:629-641.

Wang D, Wei Y, Pagliassotti M. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006; 147:943-951.

WHO. 2004. In: The World Health Report, 2003 - Shaping the Future.

Williams TD, Chambers JB, Roberts LM, Henderson RP, Overton JM. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:769-778.

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 243:H941-947.

Yki-Jarvinen H. Glucose toxicity. *Endocr Rev* 1992; 13:415-431.

## APÊNDICE A – Comitê de ética em pesquisa



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES**  
**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/016/2007** sobre “**Alterações no metabolismo, moleculares e estruturais na síndrome metabólica induzida experimentalmente (camundongos C57BL/6J): efeito de diferentes tratamentos**” sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda** 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 **14/05/2007**. Este certificado expira em **14/05/2009**.

Rio de Janeiro, 14 de Maio de 2007.

Prof. Antonio Carlos da Silva  
 Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ

*Antonio Carlos da Silva*  
 Prof. Adjunto - Mat. 4592-2  
 ICB - Inst. Biologia UERJ

**APÊNDICE B** – (Artigo) - A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010;**46**:212-223

*Original Article*

*J. Clin. Biochem. Nutr.*, **46**, 212–223, May 2010

## **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**

**Julio C. Fraulob, Rebeca Ogg-Diamantino, Caroline Fernandes-Santos, Marcia Barbosa Aguilã and Carlos A. Mandarim-de-Lacerda\***

*Laboratory of Morphometry and Cardiovascular Morphology, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro, 87 (fds) – CEP 20551-030, Rio de Janeiro, Brazil*

Received 20 August, 2009; Accepted 23 December, 2009; Published online 10 April, 2010

**Summary** Diet-induced obesity in C57BL/6 mice triggers common features of human metabolic syndrome (MetS). The purpose is to assess the suitability of a diet-induced obesity model for investigating non-alcoholic fatty pancreatic disease (NAFPD), fatty liver and insulin resistance. Adult C57BL/6 mice were fed either high-fat chow (HFC, 60% fat) or standard chow (SC, 10% fat) during a 16-week period. We evaluated in both groups: hepatopancreatic injuries, pancreatic islets size, alpha and beta-cell immunodensities, intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) and oral glucose tolerance test (OGTT). The HFC mice displayed greater mass gain ( $p < 0.0001$ ) and total visceral fat pads ( $p < 0.001$ ). OGTT showed impairment of glucose clearance in HFC mice ( $p < 0.0001$ ). IPITT revealed insulin resistance in HFC mice ( $p < 0.0001$ ). The HFC mice showed larger pancreatic islet size and significantly greater alpha and beta-cell immunodensities than SC mice. Pancreas and liver from HFC were heavier and contained higher fat concentration. In conclusion, C57BL/6 mice fed a high-fat diet develop features of NAFPD. Insulin resistance and ectopic accumulation of hepatic fat are well known to occur in MetS. Additionally, the importance of fat accumulation in the pancreas has been recently highlighted. Therefore, this model could help to elucidate target organ alterations associated with metabolic syndrome.

**Key Words:** metabolic syndrome, insulin resistance, fatty liver, non-alcoholic fatty pancreatic disease, high-fat diet

### **Introduction**

Obesity leads to the infiltration of fat in multiple organs including the heart, kidneys, liver, and pancreas. When accompanied by insulin resistance or type 2 diabetes (T2D), hypertension and dyslipidemia significantly increase the risk for cardiovascular disease [1]; in patients suffering from metabolic syndrome (MetS), this risk is even greater [2].

High-fat diet (HFD) is a nutritional condition that accounts

for the largest incidence of MetS in the world [3]. A major cause of steatosis, also known as fatty liver disease, is increased fatty acid flux to the liver, which is promoted by a high availability of plasma free fatty acids (FFAs) in relation to peripheral oxidative requirements. Several conditions increase fatty acid flux to the liver, pancreas and adipose tissue [4–6]. Consequently, elevated insulin levels generate oxidative stress and organ injuries [5, 7]. The pathophysiological consequence of fat infiltration is an increase in cellular FFAs and decreased beta-oxidation, ultimately resulting in triglyceride accumulation. This accumulation manifests as an increase in dietary FFAs and lipolysis in peripheral fat tissue [4, 8].

In general, there is continuous cycling and redistribution

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: (+55.21) 2587-6416 Fax: (+55.21) 2587-6133

E-mail: mandarim@uerj.br

of non-oxidized fatty acids between different organs. An early event in the development of obesity is an increase in visceral adipose tissue, particularly in the size of the white adipocytes. This transformation is seen to precede the development of fatty liver and insulin resistance, which are marked on a cellular level by hepatic fat infiltration and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression [6].

Infiltration of the liver by fat, or nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), is a major form of chronic liver disease in adults and children. NAFLD is one consequence of the current obesity epidemic, and can progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which is characterized by steatosis, inflammation, and progressive fibrosis, ultimately leading to cirrhosis and end-stage liver disease [9, 10]. Likewise, infiltration of the pancreas by fat or NAFLD, is characterized by a heavier pancreas due to more pancreatic fat, consisting of a high composition of triglycerides and FFAs, as well as increased cytokine production [5, 11]. Pancreatic fat accumulation can compromise normal pancreatic function. Under conditions of oxidative stress, fat-derived cytokines are released locally and may result in inflammatory processes associated with organ dysfunction. In addition, elevated levels of circulating FFAs alone are implicated in beta-cell dysfunction, leading to increased basal insulin release and impaired glucose-stimulated insulin secretion by beta-cells [12–14].

In T2D, beta-cells eventually fail to meet the demand created by insulin resistance, leading to hyperglycemia. However, in most of these disorders, the beta-cells compensate for the insulin resistance for long periods with an increase in secretory capacity, an increase in beta-cell mass, or both. However, the factors that contribute to beta-cell hyperplasia in insulin resistant states remain poorly understood [12].

In the present study, we sought to evaluate structural adaptations in pancreas, liver and fat storage in response to an increased dietary supply of fat using a C57BL/6 mouse model of high-fat diet-induced insulin resistance, a model that displays several correlations to human MetS.

## Materials and Methods

### Animals and diets

Eight-week-old male C57BL/6 mice were used in this study, housed in a temperature-controlled ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) room on a 12:12 h dark-light cycle with free access to food and water. All procedures were carried out in accordance with conventional guidelines for experimentation with animals (NIH Publication N°. 85-23, revised in 1996) and experimental protocols were approved by the local Committee.

Mice were separated into two groups ( $n = 10$  for each group) and fed different diets during a 16 week period: high-fat chow (HFC, 26% of calories from carbohydrates, 60% from fat, and 14% from protein), or standard chow (SC,

Table 1. Composition and energy content of the standard chow (SC) and high-fat chow (HFC).

Content (g/Kg)	Diets	
	SC	HFC
Casein ( $\geq 85\%$ de protein)	140	190
Cornstarch	620.7	250.7
Sucrose	100	100
Soybean oil	40	40
Lard		320
Fiber	50	50
Vitamin mix*	10	10
Mineral mix*	35	35
L-Cystin	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5
Antioxidant	0.008	0.008
Total grams	1,000	1,000
Energy content (Kcal/Kg)	3,573	5,404
Carbohydrates (%)	76	26
Protein (%)	14	14
Lipids (%)	10	60

\*Mineral and vitamin mixtures.

76% of calories from carbohydrates, 10% from fat, and 14% from protein). The mineral and vitamin content of the two diets were identical and in accordance with the American Institute of Nutrition's recommendation (AIN 93M) [15] (details in Table 1). Fresh chow was provided daily and any chow remaining from the previous day was discarded. Food intake was evaluated daily (1 p.m.), and body mass was measured weekly. Caloric content of food intake was determined based on 5.404 kcal/g for high-fat and 3.573 kcal/g for standard chow diets. The feed efficiency (FE) [(weight gained/kcal consumed)  $\times$  100] was determined after 16 weeks on the respective diets.

### Oral glucose tolerance test (OGTT)

Fasting blood glucose was measured (6 h fast, blood taken from the tail vein) according to manufacturers' recommendations using an Accu-Chek glucometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Glucose was then administered by gavage (25% glucose solution, 1 g/kg mice) and blood glucose was measured again at time points of 15, 30, 60 and 120 min, post gavage.

### Intraperitoneal Insulin tolerance test (IPITT)

Fasting blood glucose was measured (4 h fast, blood taken from the tail vein) using a glucometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Insulin was then injected intraperitoneally (1 U/kg) and blood glucose was measured again at time points of 15, 30, 60 and 120 min, post injection.

of non-oxidized fatty acids between different organs. An early event in the development of obesity is an increase in visceral adipose tissue, particularly in the size of the white adipocytes. This transformation is seen to precede the development of fatty liver and insulin resistance, which are marked on a cellular level by hepatic fat infiltration and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression [6].

Infiltration of the liver by fat, or nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), is a major form of chronic liver disease in adults and children. NAFLD is one consequence of the current obesity epidemic, and can progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which is characterized by steatosis, inflammation, and progressive fibrosis, ultimately leading to cirrhosis and end-stage liver disease [9, 10]. Likewise, infiltration of the pancreas by fat or NAFLD, is characterized by a heavier pancreas due to more pancreatic fat, consisting of a high composition of triglycerides and FFAs, as well as increased cytokine production [5, 11]. Pancreatic fat accumulation can compromise normal pancreatic function. Under conditions of oxidative stress, fat-derived cytokines are released locally and may result in inflammatory processes associated with organ dysfunction. In addition, elevated levels of circulating FFAs alone are implicated in beta-cell dysfunction, leading to increased basal insulin release and impaired glucose-stimulated insulin secretion by beta-cells [12–14].

In T2D, beta-cells eventually fail to meet the demand created by insulin resistance, leading to hyperglycemia. However, in most of these disorders, the beta-cells compensate for the insulin resistance for long periods with an increase in secretory capacity, an increase in beta-cell mass, or both. However, the factors that contribute to beta-cell hyperplasia in insulin resistant states remain poorly understood [12].

In the present study, we sought to evaluate structural adaptations in pancreas, liver and fat storage in response to an increased dietary supply of fat using a C57BL/6 mouse model of high-fat diet-induced insulin resistance, a model that displays several correlations to human MetS.

## Materials and Methods

### Animals and diets

Eight-week-old male C57BL/6 mice were used in this study, housed in a temperature-controlled ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) room on a 12:12 h dark-light cycle with free access to food and water. All procedures were carried out in accordance with conventional guidelines for experimentation with animals (NIH Publication N°. 85-23, revised in 1996) and experimental protocols were approved by the local Committee.

Mice were separated into two groups ( $n = 10$  for each group) and fed different diets during a 16 week period: high-fat chow (HFC, 26% of calories from carbohydrates, 60% from fat, and 14% from protein), or standard chow (SC,

Table 1. Composition and energy content of the standard chow (SC) and high-fat chow (HFC).

Content (g/Kg)	Diets	
	SC	HFC
Casein ( $\geq 85\%$ de protein)	140	190
Cornstarch	620.7	250.7
Sucrose	100	100
Soybean oil	40	40
Lard		320
Fiber	50	50
Vitamin mix*	10	10
Mineral mix*	35	35
L-Cystin	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5
Antioxidant	0.008	0.008
Total grams	1,000	1,000
Energy content (Kcal/Kg)	3,573	5,404
Carbohydrates (%)	76	26
Protein (%)	14	14
Lipids (%)	10	60

\*Mineral and vitamin mixtures.

76% of calories from carbohydrates, 10% from fat, and 14% from protein). The mineral and vitamin content of the two diets were identical and in accordance with the American Institute of Nutrition's recommendation (AIN 93M) [15] (details in Table 1). Fresh chow was provided daily and any chow remaining from the previous day was discarded. Food intake was evaluated daily (1 p.m.), and body mass was measured weekly. Caloric content of food intake was determined based on 5.404 kcal/g for high-fat and 3.573 kcal/g for standard chow diets. The feed efficiency (FE) [(weight gained/kcal consumed)  $\times$  100] was determined after 16 weeks on the respective diets.

### Oral glucose tolerance test (OGTT)

Fasting blood glucose was measured (6 h fast, blood taken from the tail vein) according to manufacturers' recommendations using an Accu-Chek glucometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Glucose was then administered by gavage (25% glucose solution, 1 g/kg mice) and blood glucose was measured again at time points of 15, 30, 60 and 120 min, post gavage.

### Intraperitoneal Insulin tolerance test (IPITT)

Fasting blood glucose was measured (4 h fast, blood taken from the tail vein) using a glucometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Insulin was then injected intraperitoneally (1 U/kg) and blood glucose was measured again at time points of 15, 30, 60 and 120 min, post injection.

### *Euthanasia*

After 16 weeks on a diet, mice were deeply anesthetized (intraperitoneal sodium pentobarbital, 45 mg/kg) and blood samples were rapidly obtained by cardiac puncture of the right atrium. Plasma was then obtained by centrifugation (120 g for 15 min) at room temperature and stored individually at  $-20^{\circ}\text{C}$  until biochemical analyses were performed.

Pancreas, liver and fat pads (epididymal, retroperitoneal and perirenal fat pads) were carefully removed and weighed. Organ masses were then analyzed relative to tibia length in order to standardize body biometry (we used the left tibia length for this standardization because body masses varied within the groups; the left tibia was dissected and the distance between the condyle to the tip of the medial malleolus was measured) [16]. Tissue was then rapidly fixed in freshly prepared fixative solution (formaldehyde 4% w/v, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for analysis by light microscopy.

### *Biochemical analysis*

Total cholesterol and triglycerides (TG) were assayed by the colorimetric enzymatic method. The high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) was measured using the kinetic-colorimetric method, according to the manufacturer's instructions (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brazil). The low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) was obtained via the Friedwald's formula [17, 18]. The enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALK) were also measured.

### *Radioimmunoassay for insulin and corticosterone and HOMA-IR*

Plasma insulin concentrations were measured using an insulin RIA (radioimmunoassay) kit (Linco Research, St. Charles, MO, Cat. RI-13K) and plasma corticosterone concentrations were measured using a corticosterone RIA kit (Immuchem Double Antibody, MP Biomedicals, Orangeburg, NY). All samples were analyzed in a double assay format, for which the intra-assay coefficient of variation was 1.4% for insulin and 4.4% for corticosterone. The HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) index was calculated as  $[\text{fasting serum glucose} \times \text{fasting serum insulin}/22.5]$  to assess insulin resistance [17].

### *Liver, pancreas and adipose tissue*

Small pieces of liver, pancreas and epididymal fat pads were embedded in Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sectioned at  $5\ \mu\text{m}$  and then stained with hematoxylin-eosin. The liver sections were observed under light microscopy (Olympus BX51 microscope), in order to investigate the structure of the hepatic lobule and hepatocyte steatosis.

The pancreatic islet is nearly circular, allowing for deter-

mination of the mean islet diameter based on the greatest and smallest diameters in the equatorial islet plane. These measurements were made with the software Image-Pro Plus version 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) with a sample size of at least 200 islets per group (digital images TIFF format, 36-bit color,  $1280 \times 1024$  pixels, LC Evolution camera and Olympus BX51 microscope).

The pancreas islet number was estimated with the physical disector-fractionator method (for details see [19–21]). Briefly, in a consecutive series of sections, starting with a random section, for example number 10, and leaving an interval of 50 sections, we determined the primary sections (sections numbers 60, 110, 160 etc.). From the intervals between these primary sections, we separated the reference sections (e.g. section numbers 18, 68, 118, 168, and so on) used to quantify the total number of pancreatic islet by the physical fractionator method. The distance between primary and reference sections was  $40\ \mu\text{m}$  for each step. This represents about 1/4 of the islet diameter in this animal. Thus, islets seen at primary sections (e.g. section 10) but not in the reference sections (e.g. section 18) were counted. The remaining sections were used for immunohistochemical analysis and observation of interlobular and intralobular fat deposits.

To estimate the cross-sectional area of adipocytes, at least 50 adipocytes per animal were measured with the software Image-Pro Plus version 5.0 (Media Cybernetics—digital images TIFF format, 36-bit color,  $1280 \times 1024$  pixels, LC Evolution camera and Olympus BX51 microscope).

### *Immunohistochemistry*

Antigen retrieval was performed using citrate buffer pH 6.0, and endogenous peroxidase was quenched by hydrogen peroxide 3%. Sections were then incubated with rabbit anti-glucagon (A0565, Dako) and guinea pig anti-insulin (A0564, Dako) antibodies for 2 h. Subsequently, samples were treated with a biotinylated secondary antibody (K0679, Universal DakoCytomation LSAB + Kit, Peroxidase, Glostrup, Denmark), which was detected by reaction with horseradish peroxidase-streptavidin-biotin complex. Positive immunoreactions were identified following incubation with 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (K3466, DAB, DakoCytomation) and sections were then counterstained with Mayer hematoxylin.

Digital images of the stained slices were obtained (LC Evolution camera, Olympus BX51 microscope, TIFF format, 36-bit color,  $1280 \times 1024$  pixels) and analyzed with the software Image-Pro Plus version 5.0 (Media Cybernetics). The density threshold selection tool was used to select the areas of the pancreatic islet marked with insulin and glucagon, which was then expressed as a percentage of the islet mean cross-sectional area (immuno-density). The average of 10 islets per animal was calculated for each group.

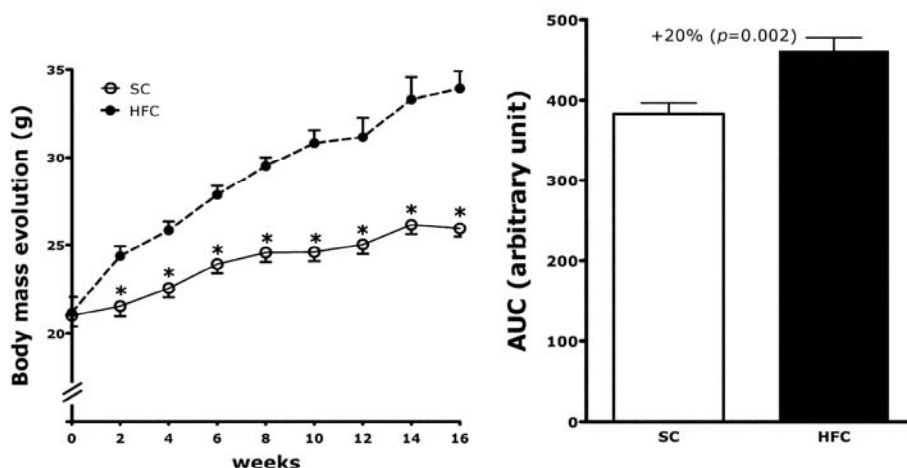


Fig. 1. Body mass. Body mass evolution and respective areas under the curve (AUC) show significant differences between the body mass gain in the standard chow (SC) group and in the very high-fat chow (HFC) group. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ /group. \* $p < 0.05$ , different from HFC Group.

Table 2. Body composition, food and fat intakes and feed efficiency in mice fed standard chow (SC) and high-fat chow (HFC).

Biometry and Nourishment data	Groups		SC vs HFC
	SC	HFC	<i>p</i>
Final body weight, g	25.9 $\pm$ 0.4	33.9 $\pm$ 0.7	<0.001
Body weight gain, g/week	0.3 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.1	0.01
Pancreas/Tibial, g/cm	0.11 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.03
Liver/Tibial, g/cm	0.44 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	<0.001
Total visceral fat	1.1 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.4	<0.001
Food intake, g/day/mice	2.4 $\pm$ 0.06	2.2 $\pm$ 0.1	ns
Energy intake, Kcal/day/mice	8.4 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 0.1	<0.001
Lipid intake, Kcal/day/mice	0.8 $\pm$ 0.02	7.1 $\pm$ 0.2	<0.001
Feed efficiency, %	0.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.01

Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ /group). Data were analyzed by Student's *t* test.

#### Data analysis

The data are displayed as mean and standard error of the mean (SEM). Differences between the groups were analyzed with the Student *t* test and a *p* value  $\leq 0.05$  was considered as statistically significant (GraphPad Prism 5.1, GraphPad Software, La Jolla, CA).

## Results

#### Body mass, fat pads and adipocyte morphometry

HFC mice had greater mass gain compared to SC mice (Fig. 1, Table 2). Significant body mass differences were observed from the second week. At the 16th week, body mass was more than 30% greater in HFC mice than in SC ( $p = 0.002$ ). Likewise, the fat pads were significantly larger

in HFC mice than in SC mice: total visceral fat pads (+143%,  $p = 0.003$ ), retroperitoneal fat (+124%,  $p < 0.01$ ), epididymal fat (+90%,  $p < 0.01$ ) (Fig. 2). The morphometry of adipocytes showed adipocyte hypertrophy in HFC mice when compared to SC mice (adipocyte diameter varied from  $56.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$  in SC mice to  $86.5 \pm 0.9 \mu\text{m}$  in HFC mice, +52%,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 2).

#### Food intake and feed efficiency

Food intake was not different between the groups, but both the energy (+38%,  $p < 0.05$ ) and fat intake per animal (+729%,  $p < 0.001$ ) were greater in HFC mice than in SC (Table 2). Feed efficiency (body mass gain in grams per kilocalories consumed) was therefore greater in HFC mice than in SC mice (Fig. 3).

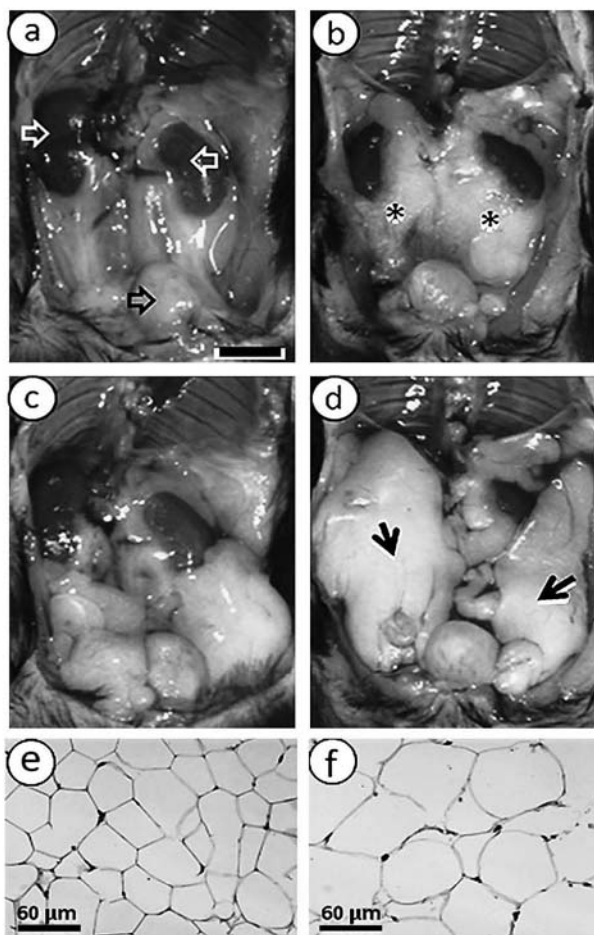


Fig. 2. Fat pads. Abdominal ventral view of dissected mice showing the fat pads (bar = 2.5 mm): Retroperitoneal fat pads: (a) SC group, the kidneys (white open arrows) are surrounded by small fat pads extending until the urinary bladder (black open arrow); (b) HFC group, the fat pads (asterisks) are greater than in SC group, covering partially the kidneys. Epididymal fat pads: (c) SC group—they cover up the inferior abdominal cavity but are much more developed in HFC group (d) (arrows). Photomicrographs of adipocytes (hematoxylin and eosin stain—bar = 60 μm). (e) shows typical epididymal fat adipocytes from lean mice fed SC and (f) shows adipocytes for the HFC group, with greater diameter.

#### Blood biochemistry

Plasma levels of TG ( $p = 0.001$ ), HDL-c ( $p = 0.002$ ) and LDL-c ( $p = 0.02$ ), but not total cholesterol, were higher in HFC mice than in SC mice. Plasma ALT ( $p = 0.01$ ), AST ( $p < 0.001$ ) and ALK ( $p < 0.001$ ) concentrations were also significantly elevated in the HFC mice when compared to SC mice (Table 3).

#### Homeostasis model assessment of insulin resistance and plasma corticosterone

Both the fasting plasma glucose ( $p = 0.01$ ) and insulin ( $p = 0.02$ ) were increased in HFC mice in comparison with SC mice. Therefore, HFC mice presented higher HOMA-IR ( $p < 0.001$ ) and higher levels of plasma corticosterone than SC mice (Table 3).

#### OGTT and IPITT

In the OGTT, the plasma glucose increased to a maximum after 15 min of oral administration of glucose in both groups, but this maximum was higher in HFC mice than in SC mice ( $p < 0.0001$ ). The time-course of glucose clearance in HFC mice was delayed compared to SC mice, remaining elevated for 120 min ( $p < 0.001$ ) after glucose administration, qualifying for characterization as glucose intolerance (Fig. 4).

The IPITT demonstrated a quick decline in plasma glucose after 15 min of insulin administration in both groups, but plasma glucose remained higher in HFC mice than in SC mice ( $p < 0.0001$ ) at all time-points up to 120 min (Fig. 5), characterizing the HFC mice as insulin resistant.

#### Structure of liver and pancreas

Liver was heavier (+25%,  $p = 0.03$ ) and showed macro- and microvesicular steatosis in HFD fed mice. Pancreas was also heavier (+19%,  $p = 0.03$ ) and had greater ectopic fat deposition within pancreatic tissue, characterized by intralobular and interlobular fatty deposition in HFC mice compared to SC mice (Fig. 6).

The HFC mice showed larger pancreatic islets (islet diameter varied from  $115.2 \pm 4.2 \mu\text{m}$  in SC mice to  $151.3 \pm 5.3 \mu\text{m}$  in HFC mice, +30%,  $p < 0.01$ ), and significantly greater alpha and beta-cell immune-densities than SC mice (Fig. 7, 8). As usual, positive immunostaining for glucagon (alpha-cells) was found primarily at the islet periphery (Fig. 7), while immunostaining for insulin (beta-cells) was found primarily at the islet central zone (Fig. 8).

#### Discussion

This study demonstrates that adult C57BL/6 mice fed a high-fat diet (60% fat) developed glucose intolerance, insulin resistance and hepatopancreatic structural alterations characterized by macro- and micro-steatosis, islet hypertrophy and increased alpha and beta-cell immune-densities, beyond that expected from simply having increased body biometry and fat storage. We also observed dyslipidemia and expected high HDL-c levels in C57BL/6 mice [22], with altered high plasma levels of ALT, AST and ALK. Plasma glucose, insulin and corticosterone were also enhanced by HFD administration, characterizing insulin resistance in the animals.

Pancreatic ectopic fat accumulation in the interlobular



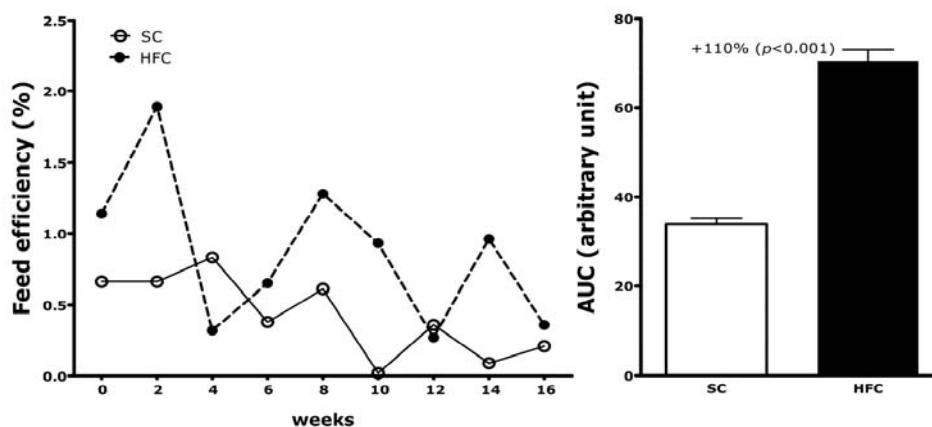


Fig. 3. Feed efficiency. Feed efficiency (values are means) measured in standard chow (SC) group and in very high-fat chow (HFC) group. The areas under the curve (AUC) show the differences between the groups. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ /group.

Table 3. Blood biochemistry

Parameter	Groups		SC vs HFC
	SC	HFC	<i>p</i>
Glucose, mmol/L	8.3 $\pm$ 0.3	9.8 $\pm$ 0.4	0.01
Insulin, pmol/L	120.8 $\pm$ 1.1	219.8 $\pm$ 38.7	0.02
HOMA-IR index <sup>1</sup>	44.6 $\pm$ 5.3	95.7 $\pm$ 10.2	<0.001
Costicosterone (ng/mL)	68.7 $\pm$ 14.0	148.4 $\pm$ 30.6	0.03
Cholesterol, mg/dl	95.7 $\pm$ 3.5	104.0 $\pm$ 4.3	ns
LDL-c, mg/dl	41.8 $\pm$ 3.5	54.0 $\pm$ 2.5	0.02
HDL-c, mg/dl	54.0 $\pm$ 1.5	63.0 $\pm$ 2.2	0.002
Triglycerides, mg/dl	23.9 $\pm$ 2.6	43.9 $\pm$ 4.0	<0.001
AST, UI/l	245.2 $\pm$ 16.2	321.4 $\pm$ 6.2	<0.001
ALP, UI/l	47.4 $\pm$ 5.2	67.4 $\pm$ 4.6	0.01
ALK, UI/l	37.5 $\pm$ 5.7	76.0 $\pm$ 6.2	<0.001

<sup>1</sup>fasting insulin concentration (pmol/L)  $\times$  fasting glucose concentration (mmol/L)/22.5

Values are mean  $\pm$  SEM;  $n$  of 5–7 mice/group. LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALK, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; SC, standard chow; HFC, high-fat chow.

space (around the great vessels and ducts) and in the intralobular space (within the exocrine pancreas) was observed after chronic HFD intake, suggesting NAFLD, which may result in chronic pancreatitis. This observation is important because experimental evidence supports the notion that high-fat intake can induce hyperlipidemia and lead to pancreatic endocrine and exocrine alterations [23], with increased pancreatic FFA, lipid peroxidation and collagen synthesis by activated pancreatic stellate cells [24], and histopathological alterations resulting from an acute inflammatory response in the early stages of secondary pancreatic acinar cell atrophy and fibrosis [11, 25].

Fatty acid intake displays time-dependent and deposit-

specific effects in mice [26]. In addition, it impairs the regulation of pancreatic beta-cell cAMP production, a signaling pathway important for adequate islet adaptation to a perturbed metabolic environment. Normally this process is protective against the development of glucose intolerance and insulin resistance [12, 27]. C57BL/6 mice responded to oversupply of dietary fat with adipose tissue remodeling, through adipocyte hyperplasia and hypertrophy in agreement with a previous report [28]. This is an important issue because adipose tissue expresses various secretory proteins, including leptin, TNF-alpha and adiponectin, which may be involved in the regulation of energy expenditure, lipid metabolism and insulin resistance [29].

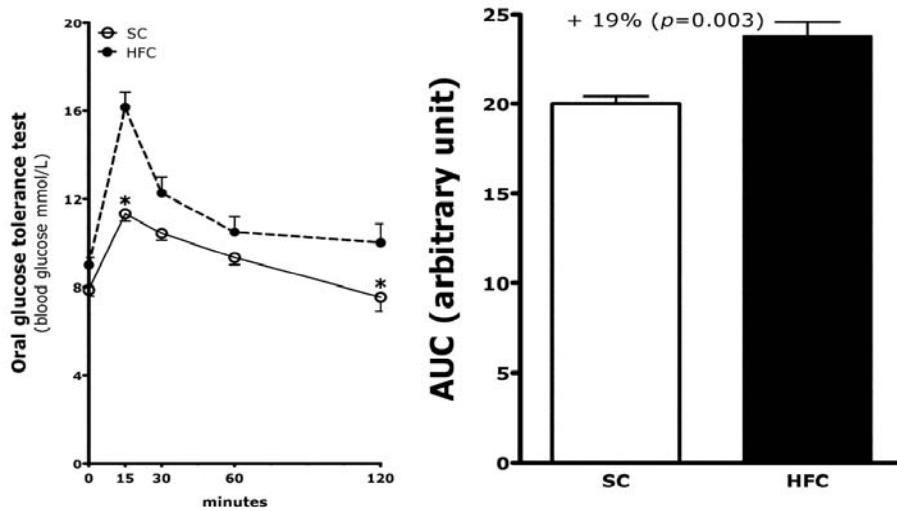


Fig. 4. Oral glucose tolerance test. Oral glucose tolerance test curve at 14th week. The areas under the curve show significant differences between the standard chow (SC) group and the very high-fat chow (HFC) group. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ /group. \* $p < 0.05$ , different from HFC Group.

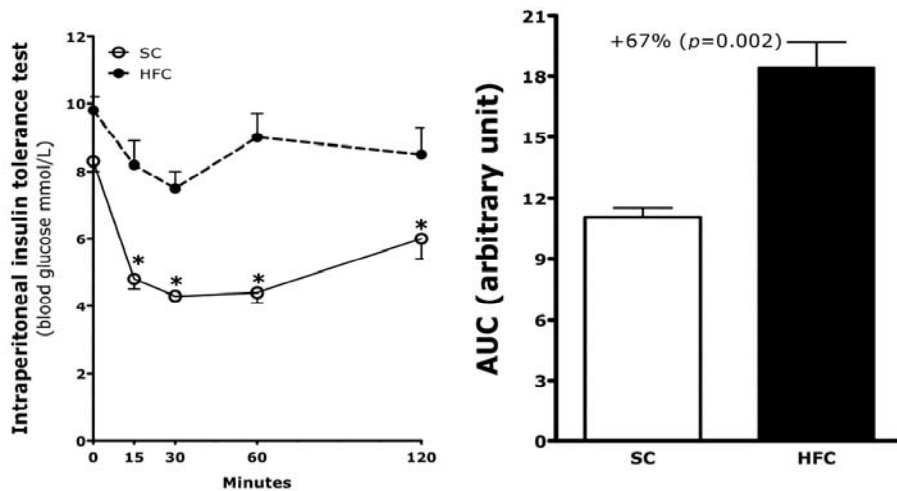


Fig. 5. Intraperitoneal insulin tolerance test. Intraperitoneal insulin tolerance test curve at 15th week. The areas under the curve show significant differences between the standard chow (SC) group and the very high-fat chow (HFC) group. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ /group. \* $p < 0.05$ , different from HFC Group.

Plasma adiponectin levels decrease during obesity, and are negatively associated with plasma insulin, positively associated with plasma triglycerides, and correlate with increases in HOMA-IR [6]. Low levels of adiponectin decrease fatty acid oxidation in the muscle, and this effect is mediated by the interaction with muscle and hepatic receptors through activation of AMP kinase, the cellular "fuel gauge", which, in turn, inhibits acetyl CoA carboxylase and increases fatty acid beta-oxidation [30]. Additionally,

decreased adiponectin levels have been implicated in the development of steatosis in mouse models of obesity and lipodystrophy [31].

The HOMA-IR index is associated with myocardial ischemia, independent of established risk factors [32]. Severe insulin resistance may impair glucose-stimulated insulin secretion, thereby undermining beta-cell compensation and leading to hyperglycemia. Moreover, because insulin stores are intact, the secretory defects reflect an

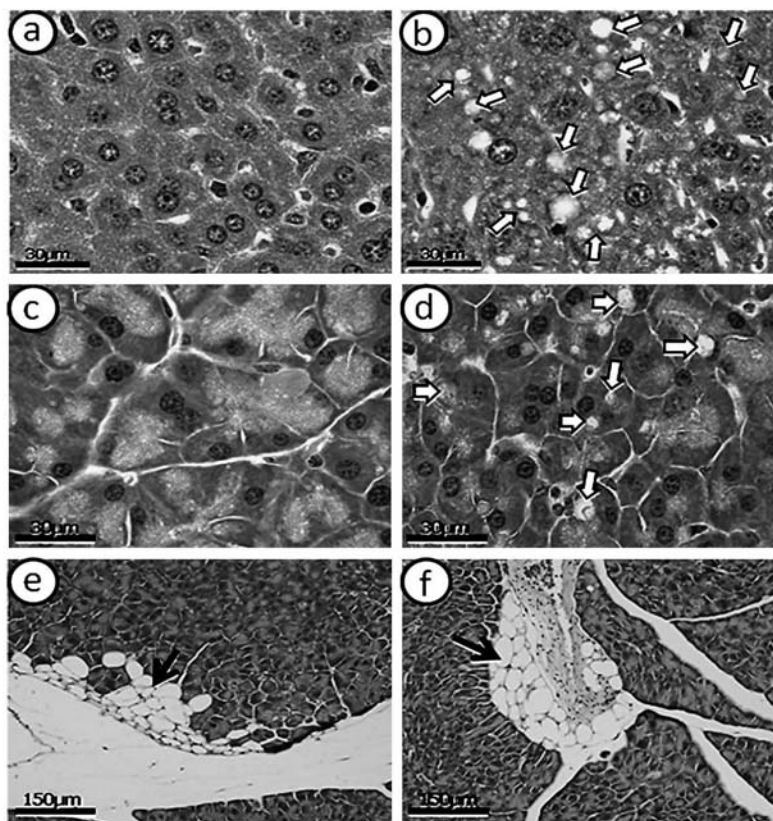


Fig. 6. Photomicrographs of liver and pancreas. Photomicrographs of liver and pancreas (hematoxylin and eosin stain): (a) typical liver of a lean mice fed SC and (b) liver of high-fat fed mice with macro- and microvesicular steatosis (arrows); (c) typical pancreas of a lean mice fed SC and (d) pancreas of high-fat fed mice showing intracellular lipid vesicles in acinar cells (arrows); (e) adipose infiltration in pancreas of high-fat fed mice (black arrow) and (f) ectopic deposition of the interlobular fat of high-fat fed mice (black arrow).

early stage of beta-cell dysfunction [33]. The mice fed HFD clearly displayed an elevated HOMA-IR index that is compatible with the presence of insulin resistance in these animals. One mechanism by which dietary overload of lipids appears to lead to the development of insulin resistance and T2D in C57BL/6J mice is by an increased saturation of phospholipids of the mitochondrial membrane, leading to decreased mitochondrial function [34]. In addition, the failure of islet beta-cells to compensate for impaired insulin-stimulated glucose disposal is one of the main mechanisms underlying the onset of hyperglycemia and overt T2D [35].

The fatty liver is insulin resistant [36]. Liver fat is highly and linearly correlated with all components of the MetS, independent of obesity [2]. Therefore, NAFLD is emerging as component of the MetS [9, 37]. NAFLD markers ALT and AST predict MetS independently of potential confounding variables [38]. Serum ALT elevations have been used as a surrogate biomarker for NAFLD and steato-

hepatitis in the clinical setting. ALT activity is normally present at low levels in the circulation of standard chow fed mice. In high fat/cholesterol fed mice, the incidence and severity of elevated plasma ALT levels increased significantly as a function of the time the animals were maintained on this diet [22, 39]. Clinical evidence demonstrates that fatty pancreas is associated with higher levels for visceral fat, AST, ALT, total cholesterol, triglyceride, insulin, and the HOMA-IR [40]. Likewise, C57BL/6 mice fed a HFD showed elevated ALT, AST and ALK plasma concentrations indicating alteration of the hepatic and pancreatic function.

Chronic stress is associated with derangement of metabolic homeostasis, a process that contributes to the clinical presentation of visceral obesity, T2D, atherosclerosis and MetS. Obesity constitutes a chronic stressful state that may cause hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunction [41]. Basal HPA axis activity and expression of its central regulatory markers are age-dependent in mice [42].

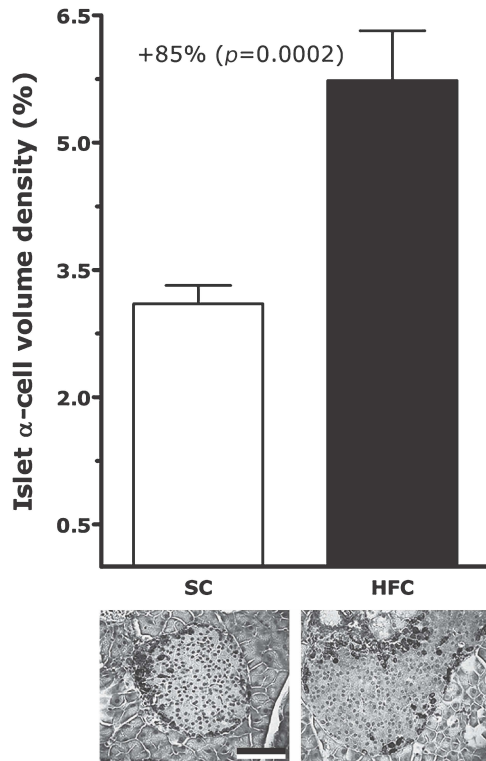


Fig. 7. Pancreatic islet alpha-cell. The pancreatic islet alpha-cell volume densities in the standard chow (SC) group and in the very high-fat chow (HFC) group were measured by image analysis. It was significantly greater in the HFC group. Photomicrographs under the column bars show typical islets of the two groups with positive stain for glucagon (same magnification, bar = 40  $\mu$ m). Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ /group.

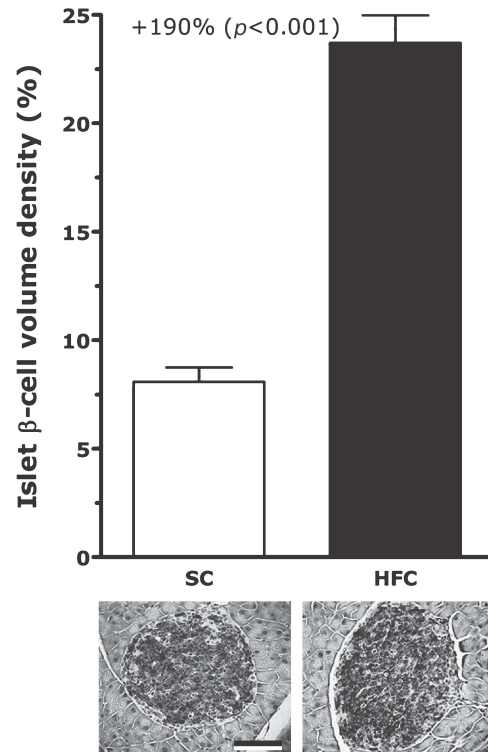


Fig. 8. Pancreatic islet beta-cell. The pancreatic islet beta-cell volume densities in the standard chow (SC) group and in the very high-fat chow (HFC) group were measured by image analysis. It was significantly greater in the HFC group. Photomicrographs under the column bars show typical islets of the two groups with positive stain for insulin (same magnification, bar = 40  $\mu$ m). Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$ /group.

Furthermore, dietary fat intake acts as a background form of chronic stress, elevating basal corticosterone levels and enhancing HPA response to stress [43]. The combination of stress and MetS increases the risk of cardiovascular disease [1]. In the present study, in spite of having carefully controlled for effects of age, mice fed HFD had significantly higher levels of plasma corticosterone than control mice. This corticosterone index could be correlated with an increase in both obesity and symptoms of metabolic syndrome [43].

By feeding mice a HFD, this study has arrived at several striking observations. In addition to observing the development of insulin resistance in mice fed a chronic HFD, we observed structural alterations such as liver macro and micro steatosis, larger pancreatic islets, greater alpha and beta-cell immuno-densities and ectopic fat deposition within pancreatic tissue. These observations seem to be alterations due to oversupply of lipids and are independent of the aging process in mice. Increased islet size and pancreatic insulin content in old non-obese (21–25-month-old) C57BL/6J

male mice have already been reported [44]. A nearly twofold increase in islet size was correlated with a twofold increase of glucose-stimulated insulin secretion from perfused islets from 25-month-old males compared with 5-month-old males. Thus, the findings that glucose tolerance did not deteriorate with age, coupled with the lack of evidence for impaired beta-cell responsiveness to glucose in old males, suggest that the deterioration in glucose homeostasis seen in this study is not an inevitable consequence of aging in mice.

We found greater alpha and beta-cell immuno densities in mice fed HFD, but no differences in the islet distribution of these cells. Adeghate and co-workers found a similar percentage of insulin-positive (around 80%) and glucagon-positive cells (around 10%) in C57BL/6 mice fed fat-enriched diet compared to mice fed control diet [45]. It is also possible to demonstrate this effect by analyzing the density of immunolabeled cells, as measured by image analysis. By examining this in both groups, significant variations in densities of both cell types were found.

Insulin and glucagon are all secreted from the endocrine

pancreas, and both participate in the regulation of energy homeostasis. Increased expression of glucagon in the islets is proportionally related to an increase of its concentration in the blood [46–47]. By using a differential energetic base in age matched animals fed a diet higher in fat and carbohydrates (C57BL/6 mice fed a high-fat-high-sucrose diet, consisting of 44% carbohydrates with 16% sucrose and 42% fat), had increased pancreatic insulin and lower glucagon content [11, 13]. Thus, pancreatic glucagon content appears to be influenced by food composition [48].

The liver is also simultaneously influenced by competing signals with regard to glucose secretion, since glucagon both stimulates insulin secretion and increases hepatic glucose output. Glucagon acts mainly in the liver, where it increases glucose production, while generating signals to reduce energy intake. Insulin acts directly at the liver to suppress the synthesis and secretion of glucose, and some plasma insulin is transported into the brain where it provides an important and indeed necessary input for the appropriate regulation of both stored energy and glucose secretion by the liver [49]. This analysis is important because the pancreatic beta-cell function is regulated by insulin signaling pathways. Insulin receptor substrate 2-dependent signaling in pancreatic islets is required not only for the maintenance of normal alpha and beta-cell mass, but is also involved in the regulation of insulin secretion [50, 51].

Currently, many studies have reported that C57BL/6 mice develop obesity, insulin resistant, diabetes mellitus, hypertriglyceridemia [11, 13] and advanced fatty liver disease when fed a high-fat diet, mimicking human metabolic syndrome. Compared with other animal models, such as Zucker obese rats, ob/ob or db/db mice or other gene deletion animal models, these HFD mice more closely resemble human obesity, serving as a model of exogenous obesity, which arises via a higher dietary caloric intake (fat overload) [52].

We now report, using stereological methods, that the pancreas of high-fat fed mice develops intracellular lipid vesicles in acinar cells, adipose infiltration and ectopic deposition of the interlobular fat, in addition to macro- and microvesicular steatosis in liver.

The HFD mouse model may promote a better experimental system in which to investigate MetS, by providing a model to examine interventions that prevent progression of fatty liver and fatty pancreas disease and to correlate the degree of liver and pancreatic steatosis with metabolic syndrome.

In conclusion, C57BL/6 mice fed a high fat diet develop features of both non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic fatty pancreatic disease, a condition that is closely related to MetS. Ectopic accumulation of fat in liver and pancreas is a well-known symptom of MetS. However, only recently has the importance of fat accumulation in these

tissues been highlighted. Therefore, the HFD animal model could help us to better understand the target organ alterations associated with metabolic syndrome and engender the possibility of developing novel treatments.

### Acknowledgments

This work was supported by the agencies CNPq (Brazilian Council of Science and Technology, www.cnpq.br) and FAPERJ (Rio de Janeiro State Foundation for Scientific Research, www.faperj.br).

The authors are grateful to Mrs. Thatiany Marinho and Leonardo Mendonça for their technical assistance.

### Abbreviations

AIN93, American Institute of Nutrition's recommendation; ALK, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; T2D, type 2 diabetes; FE, feed efficiency; FFAs, free fatty acids; TNF-alpha, tumor necrosis factor alpha; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol; HFC, high fat chow; HOMA-IR, homeostasis model assessment-insulin resistance; LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol; IPITT, intraperitoneal insulin tolerance test; MetS, metabolic syndrome; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD, nonalcoholic fatty pancreas disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; OGTT, oral glucose tolerance test; SC, standard chow; SEM, standard error of the mean; TG, triglycerides.

### References

- [1] Bonora, E.: The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann. Med.*, **38**, 64–80, 2006.
- [2] Kotronen, A. and Yki-Jarvinen, H.: Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 27–38, 2008.
- [3] Buettner, R., Scholmerich, J., and Bollheimer, L.C.: High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, **15**, 798–808, 2007.
- [4] den Boer, M., Voshol, P.J., Kuipers, F., Havekes, L.M., and Romijn, J.A.: Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 644–649, 2004.
- [5] Mathur, A., Marine, M., Lu, D., Swartz-Basile, D.A., Saxena, R., Zyromski, N.J., and Pitt, H.A.: Nonalcoholic fatty pancreas disease. *HPB (Oxford)*, **9**, 312–318, 2007.
- [6] Akagiri, S., Naito, Y., Ichikawa, H., Mizushima, K., Takagi, T., Handa, O., Kokura, S., and Yoshikawa, T.: A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue precedes the development of fatty liver and insulin resistance in high-fat diet-fed male KK/Ta mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **42**, 150–157, 2008.
- [7] Chitturi, S., Abeygunasekera, S., Farrell, G.C., Holmes-

- Walker, J., Hui, J.M., Fung, C., Karim, R., Lin, R., Samarasinghe, D., Liddle, C., Weltman, M., and George, J.: NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*, **35**, 373–379, 2002.
- [8] Pessayre, D.: Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **22** Suppl. 1, S20–27, 2007.
- [9] Jiang, J. and Torok, N.: Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, **6**, 1–7, 2008.
- [10] Gentile, C.L. and Pagliassotti, M.J.: The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 567–576, 2008.
- [11] Fernandes-Santos, C., Evangelista Carneiro, R., Mendonca, L.S., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A.: Rosiglitazone aggravates nonalcoholic Fatty pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet. *Pancreas*, **38**, e80–86, 2009.
- [12] Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F., and Nawata, H.: Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha or pancreatic/duodenal homeobox. *Metabolism*, **50**, 613–618, 2001.
- [13] Nascimento, F.A., Barbosa-da-Silva, S., Fernandes-Santos, C., Mandarim-de-Lacerda, C.A., and Aguila, M.B.: 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.*, **62**, 17–25, 2010.
- [14] Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., and Unger, R.H.: Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 10878–10882, 1994.
- [15] Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. Jr.: 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.*, **123**, 1939–1951, 1993.
- [16] Yin, F.C., Spurgeon, H.A., Rakusan, K., Weisfeldt, M.L., and Lakatta, E.G.: Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am. J. Physiol.*, **243**, H941–947, 1982.
- [17] Friedewald, W.T., Levy, R.I., and Fredrickson, D.S.: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, **18**, 499–502, 1972.
- [18] Fukuyama, N., Homma, K., Wakana, N., Kudo, K., Suyama, A., Ohazama, H., Tsuji, C., Ishiwata, K., Eguchi, Y., Nakazawa, H., and Tanaka, E.: Validation of the Friedewald equation for evaluation of plasma LDL-cholesterol. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 1–5, 2008.
- [19] Vogeser, M., Konig, D., Frey, I., Predel, H.G., Parhofer, K.G., and Berg, A.: Fasting serum insulin and the homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR) in the monitoring of lifestyle interventions in obese persons. *Clin. Biochem.*, **40**, 964–968, 2007.
- [20] Bock, T., Pakkenberg, B., and Buschard, K.: Genetic background determines the size and structure of the endocrine pancreas. *Diabetes*, **54**, 133–137, 2005.
- [21] Mandarim-de-Lacerda, C.A.: Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **75**, 469–486, 2003.
- [22] Zheng, S., Hoos, L., Cook, J., Tetzloff, G., Davis, H. Jr., van Heek, M., and Hwa, J.J.: Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **584**, 118–124, 2008.
- [23] Chowdhury, P., Nishikawa, M., Blevins, G.W. Jr., and Rayford, P.L.: Response of rat exocrine pancreas to high-fat and high-carbohydrate diets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **223**, 310–315, 2000.
- [24] Zhang, X., Cui, Y., Fang, L., and Li, F.: Chronic high-fat diets induce oxidative injuries and fibrogenesis of pancreatic cells in rats. *Pancreas*, **37**, e31–38, 2008.
- [25] Yan, M.X., Li, Y.Q., Meng, M., Ren, H.B., and Kou, Y.: Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 192–199, 2006.
- [26] Bueno, A.A., Oyama, L.M., de Oliveira, C., Pisani, L.P., Ribeiro, E.B., Silveira, V.L., and Oller do Nascimento, C.M.: Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch.*, **455**, 701–709, 2008.
- [27] Walz, H.A., Harndahl, L., Wierup, N., Zmuda-Trzebiatowska, E., Svennelid, F., Manganiello, V.C., Ploug, T., Sundler, F., Degerman, E., Ahren, B., and Holst, L.S.: Early and rapid development of insulin resistance, islet dysfunction and glucose intolerance after high-fat feeding in mice over-expressing phosphodiesterase 3B. *J. Endocrinol.*, **189**, 629–641, 2006.
- [28] Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W. 2nd., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S.: Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, **56**, 2910–2918, 2007.
- [29] Ahima, R.S.: Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*, **14** Suppl 5, 242S–249S, 2006.
- [30] Gil-Campos, M., Canete, R.R., and Gil, A.: Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin. Nutr.*, **23**, 963–974, 2004.
- [31] Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., and Kadowaki, T.: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.*, **7**, 941–946, 2001.
- [32] Gazzaruso, C., Solerte, S.B., De Amici, E., Mancini, M., Pujia, A., Fratino, P., Giustina, A., and Garzaniti, A.: Association of the metabolic syndrome and insulin resistance with silent myocardial ischemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *The American journal of cardiology*, **97**, 236–239, 2006.

- [33] Asghar, Z., Yau, D., Chan, F., Leroith, D., Chan, C.B., and Wheeler, M.B.: Insulin resistance causes increased beta-cell mass but defective glucose-stimulated insulin secretion in a murine model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, **49**, 90–99, 2006.
- [34] de Wilde, J., Mohren, R., van den Berg, S., Boekschoten, M., Dijk, K.W., de Groot, P., Muller, M., Mariman, E., and Smit, E.: Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Physiol. Genomics*, **32**, 360–369, 2008.
- [35] Ahren, B. and Pacini, G.: Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes Obes. Metab.*, **7**, 2–8, 2005.
- [36] Lautamaki, R., Borra, R., Iozzo, P., Komu, M., Lehtimaki, T., Salmi, M., Jalkanen, S., Airaksinen, K.E., Knuuti, J., Parkkola, R., and Nuutila, P.: Liver steatosis coexists with myocardial insulin resistance and coronary dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, E282–290, 2006.
- [37] Machado, M. and Cortez-Pinto, H.: Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **9**, 637–642, 2006.
- [38] Hanley, A.J., Williams, K., Festa, A., Wagenknecht, L.E., D'Agostino, R.B. Jr., and Haffner, S.M.: Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, **54**, 3140–3147, 2005.
- [39] Tipoe, G.L., Ho, C.T., Liong, E.C., Leung, T.M., Lau, T.Y., Fung, M.L., and Nanji, A.A.: Voluntary oral feeding of rats not requiring a very high fat diet is a clinically relevant animal model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Histol. Histopathol.*, **24**, 1161–1169, 2009.
- [40] Lee, J.S., Kim, S.H., Jun, D.W., Han, J.H., Jang, E.C., Park, J.Y., Son, B.K., Jo, Y.J., Park, Y.S., and Kim, Y.S.: Clinical implications of fatty pancreas: correlations between fatty pancreas and metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.*, **15**, 1869–1875, 2009.
- [41] Kyrou, I. and Tsigos, C.: Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm. Metab. Res.*, **39**, 430–438, 2007.
- [42] Dalm, S., Enthoven, L., Meijer, O.C., van der Mark, M.H., Karssen, A.M., de Kloet, E.R., and Oitzl, M.S.: Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology*, **81**, 372–380, 2005.
- [43] Tannenbaum, B.M., Brindley, D.N., Tannenbaum, G.S., Dallman, M.F., McArthur, M.D., and Meaney, M.J.: High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am. J. Physiol.*, **273**, E1168–E1177, 1997.
- [44] Leiter, E.H., Premdas, F., Harrison, D.E., and Lipson, L.G.: Aging and glucose homeostasis in C57BL/6J male mice. *Faseb J.*, **2**, 2807–2811, 1988.
- [45] Adeghate, E., Christopher Howarth, F., Rashed, H., Saeed, T., and Gbewonyo, A.: The effect of a fat-enriched diet on the pattern of distribution of pancreatic islet cells in the C57BL/6J mice. *Am. N.Y. Acad. Sci.*, **1084**, 361–370, 2006.
- [46] Ferrannini, E., Muscelli, E., Natali, A., Gabriel, R., Mitrakou, A., Flyvbjerg, A., Golay, A., and Hojlund, K.: Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia*, **50**, 2342–2347, 2007.
- [47] Winzell, M.S., Brand, C.L., Wierup, N., Sidelmann, U.G., Sundler, F., Nishimura, E., and Ahren, B.: Glucagon receptor antagonism improves islet function in mice with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Diabetologia*, **50**, 1453–1462, 2007.
- [48] Bonnevie-Nielsen, V.: Different effects of high glucose and high fat diet on pancreatic insulin and glucagon in female and male mice. *Diabete Metab.*, **8**, 271–277, 1982.
- [49] Woods, S.C., Lutz, T.A., Geary, N., and Langhans, W.: Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **361**, 1219–1235, 2006.
- [50] Cantley, J., Choudhury, A.I., Asare-Anane, H., Selman, C., Lingard, S., Heffron, H., Herrera, P., Persaud, S.J., and Withers, D.J.: Pancreatic deletion of insulin receptor substrate 2 reduces beta and alpha cell mass and impairs glucose homeostasis in mice. *Diabetologia*, **50**, 1248–1256, 2007.
- [51] Weir, G.C. and Bonner-Weir, S.: A dominant role for glucose in beta-cell compensation of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, **117**, 81–83, 2007.
- [52] Gallou-Kabani, C., Vige, A., Gross, M.S., Rabes, J.P., Boileau, C., Larue-Achagiotis, C., Tome, D., Jais, J.P., and Junien, C.: C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*, **15**, 1996–2005, 2007.