

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação Lato Sensu
Especialização em biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos

Anny Gabrielly Pedroso Pego

**Estudo da correlação entre parâmetros inflamatórios e de obesidade em
modelo murino geneticamente selecionado**

São Paulo
2022

Anny Gabrielly Pedroso Pego

Estudo da correlação entre parâmetros inflamatórios e de obesidade em modelo murino geneticamente selecionado

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação Lato Sensu da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador(a): Dra. Aryene Góes Trezena

São Paulo

2022

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Pego, Anny Gabrielly Pedroso

Estudo da correlação entre parâmetros inflamatórios e de obesidade em modelo murino geneticamente selecionado / Anny Gabrielly Pedroso Pego ; orientador(a) Aryene Góes Trezena - São Paulo, 2022.

42 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Obesidade 2. Inflamação. 3. Citocinas. 4. Colesterol e Triglicérides I. Trezena, Aryene Góes . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Anny Gabrielly Pedrosa Pego aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 13 de fevereiro de 2023


.....

Aluno(a)

De acordo: 
.....

Orientador(a):

Aylene Goes Trezena
Pesquisador Científico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora Aryene Góes Trezena por ter me direcionado não somente na realização da pesquisa mas durante todo o trajeto do curso. Assim como também, quero agradecer a Nancy Starobinas pela revisão do trabalho e a técnica de laboratório Mara de Oliveira Irineu que me auxiliou em todos os meus experimentos. A vocês três, muito obrigada pela paciência, compreensão, dedicação, inspiração e carinho. Vocês são extremamente capacitadas e carregam a missão mais nobre que existe.

Agradeço a minha mãe Rosemere Soares Pedroso, obrigada pelo incentivo, amor e esforço todas as manhãs. E por fim, agradeço aos meus melhores amigos Henrique Hideki Hashiguti, Renata Hiromi Nagagima Gonçalves e Jéssica de Azevedo Pissolato que também foram muito importantes nessa trajetória. Muito obrigada pela companhia, transparência, respeito, amor e carinho.

みんなちがってみんな優勝

どうなったってさ 何度でも 君は君でいろ。

“Todos são diferentes, todos são vencedores, não importa o que aconteça, não importa quantas vezes tenha de ser você.”

(Tradução nossa)

フレデリック

RESUMO

PEGO, Anny Gabrielly. **Estudo da correlação entre parâmetros inflamatórios e de obesidade em modelo murino geneticamente selecionado**. 2022. 42 p.
Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde-Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de tecido adiposo que promove um estado inflamatório crônico de baixo grau no organismo. A inflamação impulsionada pelo excesso de peso é uma condição multifacetada que leva a propensão em desenvolver inúmeras comorbidades. Adipócitos secretam e expressam proteínas, hormônios e adipocinas, resultando na produção aumentada de moléculas de adesão que, juntamente com quimiocinas, estimulam a infiltração de células do sistema imune. Foram desenvolvidas pelo laboratório de Imunogenética, linhagens de camundongos fenotipicamente selecionadas com base na intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR) máxima ou mínima (AIRmax e AIRmin). Uma vez que esses animais acumulam peso de maneira espontânea e que o tecido adiposo, por sua vez, é descrito ter um estado de inflamação basal crônica, é interessante pesquisar a possível inter-relação entre essas duas características nas linhagens AIRmax e AIRmin. No presente estudo, objetivamos investigar a interferência de genes reguladores da resposta inflamatória aguda no ganho de peso de animais AIRmin e AIRmax, correlacionando os parâmetros do perfil lipídico do soro e da expressão de genes de citocinas no tecido adiposo viscerogonadal. Foi utilizado, para isso, camundongos AIRmax e AIRmin em grupos equivalentes de machos e fêmeas submetidos à dieta convencional ou à dieta hiperlipídica durante 06 meses. A análise dos resultados obtidos em relação ao perfil lipídico revelou que o acúmulo de gordura vicerogonadal apresentou um padrão diferente na DH em relação a DC nas fêmeas das duas linhagens. A DH aumentou mais os níveis de colesterol dos AIRmax machos que dos machos AIRmin, enquanto as fêmeas AIRmax submetidas à DC apresentam níveis maiores de triglicérides que as fêmeas AIRmin, as quais mostraram aumento desses níveis quando alimentadas com DH. Em relação as citocinas inflamatórias, os dados indicam que a DH houve uma tendência de aumento na expressão tanto de IL-6 quanto de CCL-2 em relação à DC nas fêmeas AIRmin, as quais mostraram maiores níveis de expressão de TNF- α . Sendo assim, nossos dados indicam, de maneira geral, que a DH teve um impacto diferente entre os sexos,

aumentando o acúmulo de gordura visceral, expressão de citocinas e triglicérides nas fêmeas, principalmente nas fêmeas AIRmin, as quais apresentavam, na DC, o menor ganho de peso em relação aos demais grupos.

Palavras-chave: Obesidade. Inflamação. Citocinas. Colesterol e Triglicérides

ABSTRACT

PEGO, Anny Gabrielly. **Study of the correlation between inflammatory and obesity parameters in a genetically selected murine model.** 2022. 42 p.

Coursework (Specialization in Biotechnology for Health-Vaccines and Biopharmaceuticals) - School of the Butantan Institute, São Paulo, 2022.

Obesity is defined as an excessive accumulation of adipose tissue that promotes a chronic low-grade inflammatory state in the body. The inflammation driven by excess weight is a multifaceted condition that leads to a propensity to develop numerous comorbidities. Adipocytes secrete and express proteins, hormones, and adipokines, resulting in the increased production of adhesion molecules that, together with chemokines, stimulate the infiltration of immune system cells. The Immunogenetics laboratory has developed mouse strains phenotypically selected on the basis of the intensity of the maximum or minimum acute inflammatory response (AIR) (AIRmax and AIRmin). Since these animals spontaneously accumulate weight and the adipose tissue is described to have a state of chronic basal inflammation, it is interesting to investigate the possible interrelation between these two characteristics in AIRmax and AIRmin strains. In the present study, we aimed to investigate the interference of acute inflammatory response regulatory genes in the weight gain of AIRmin and AIRmax animals, correlating the parameters of serum lipid profile and cytokine genes expression in viscerogonadal adipose tissue. For this, AIRmax and AIRmin mice were used in equivalent groups of males and females submitted to conventional diet or hyperlipidic diet for 06 months. The analysis of the results obtained in relation to the lipid profile revealed that the accumulation of viscerogonadal fat showed a different pattern in HD compared to CD in females of both strains. HD increased cholesterol levels more in AIRmax males than in AIRmin males, while AIRmax females fed HD showed higher triglyceride levels than AIRmin females, which showed increased triglyceride levels when fed HD. Regarding inflammatory cytokines, the data indicate that HD had a tendency to increase the expression of both IL-6 and CCL-2 relative to CD in AIRmin females, which showed higher levels of TNF- α expression. Thus, our data indicate, in general, that HD had a different impact between the sexes, increasing viscerogonadal fat accumulation, cytokine expression and triglycerides in females, especially in AIRmin females, who had the lowest weight gain in CD relative to the other groups.

Keywords: Obesity. Inflammation. Cytokines. Cholesterol and Triglycerides

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Obesidade e tecido adiposo (TA).....	12
1.2. Citocinas e inflamação do TA.....	12
1.3. Colesterol e Triglicérides.....	14
1.4. Camundongos AIRmax AIRmin como modelo experimental.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Camundongos.....	17
3.2. Regime alimentar com DC e DH.....	18
3.3. Coleta e pesagem das amostras de gordura.....	19
3.4. Extração de RNA.....	19
3.5. Nanovue.....	20
3.6. Bioanalyzer.....	20
3.7. cDNA.....	22
3.8. RT-PCR.....	22
3.9. Colesterol e Triglicérides... ..	23
3.10. Análise Estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1. Coleta e pesagem da gordura viscerogonadal.....	26
4.2. Análise dos dados Nanovue.....	27
4.3. Pureza (RNA Integrity Number RIN) dos ácidos nucleicos	29
4.4. Análise dos dados RT-PCR dos genes TNF- α , IL-6 e CCL-2.....	31
4.5. Análise dos dados Colesterol.....	35
4.6. Análise dos dados Triglicérides	36
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade e tecido adiposo (TA)

Ao longo dos últimos 50 anos as taxas de obesidade têm aumentado rapidamente, com mais de um terço da população global classificada com excesso de peso (BLÜHER, 2019). O peso corporal humano é controlado por um equilíbrio entre a ingestão e gasto de energia. Em vista disso, a ingestão abundante de calorias sem o ajuste apropriado das calorias usadas nas atividades diárias colabora para o desenvolvimento da obesidade (PINHO et al., 2022). A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de tecido adiposo que promove um estado inflamatório crônico de baixo grau no organismo. Geralmente é um progresso lento, a longo prazo, que envolve fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e comportamentais. Essa disfunção em células do tecido adiposo induz a perda da homeostase corporal e propensão em desenvolver inúmeras comorbidades como dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, doenças cardíacas, doença hepática gordurosa e alguns tipos de câncer (GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS, 2017).

Além de ser conhecido como um órgão endócrino, o tecido adiposo (TA) pertence à classe dos tecidos conjuntivos no qual se encontra o predomínio de adipócitos, pré-adipócitos, linfócitos e macrófagos especificamente do tipo M1. No que diz respeito às suas funções, sabe-se que essas células realizam a síntese e armazenamento de lipídeos na forma de triacilglicerol (TAG), também conhecido como triglicéride (TG), colaboram para o metabolismo de esteroides e produzem uma gama variada de fatores inflamatórios (leptina, IL-1 β , IL-6, TNF- α , e MCP-1) e anti-inflamatórios (adiponectina e resistina) (LAFONTAN, 2004).

O TA pode ser classificado face as suas propriedades metabólicas e funcionais em marrom (TAM), e tecido adiposo branco (TAB). O TAM é capaz de oxidar rapidamente suas próprias reservas de gordura e substratos circulantes, produzindo calor e aumentando a taxa metabólica, dando proteção à hipotermia e à obesidade já que secreta efetivamente baixos níveis de adipocinas e citocinas inflamatórias (VILLARROYA et al., 2017). Já o TAB é capaz de sintetizar triglicérides para armazenamento a longo prazo e liberar ácidos graxos livres de triglicérides em momentos de demanda de energia (ROSEN et al., 2014). Além de seu papel como

fonte de energia, possui células com capacidade endócrina muito ativas. Ademais, o TAB pode ser classificado de acordo com a sua localização anatômica em subcutâneo (TAS), epicardial (TAE), perivascular (TAPV) e visceral (TAV) (RONSKA et al., 2012).

Em especial, o TAV é dividido em mesentérico, omental e retroperitoneal compreendendo todo o tecido adiposo localizado no compartimento visceral (KWOK et al., 2016). É caracterizado por ser mais sensível à lipólise bem como o mais resistente à ação da insulina, pois libera maior descarga de ácidos graxos livres de modo direto na veia porta hepática (CHAIT et al., 2020; SAELY et al., 2012) além de secretar maiores concentrações de adipocinas relacionadas à processos pró-inflamatórios (TRZECIAK-RYCZEK et al., 2011). Nesse sentido, o acúmulo excessivo de gordura nas vísceras causa disfuncionalidade do tecido adiposo que contribui fortemente para o aparecimento de comorbidades relacionadas à obesidade.

1.2. Citocinas e inflamação do TA

A inflamação impulsionada pela obesidade é uma condição multifacetada que atinge numerosos órgãos como TA, fígado, coração, pâncreas e entre outros (ELLULU et al., 2017). A resposta inflamatória que advém da obesidade é distinta do padrão clássico. Nesse cenário, a inflamação advém da expansão do tecido adiposo através de hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos tendo início com estes adipócitos disfuncionais que secretam e expressam proteínas, hormônios e adipocinas, resultando na produção aumentada de moléculas de adesão que, juntamente com quimiocinas, estimulam a infiltração de células do sistema imune (células mieloides, e linfoides) (ELLULU et al., 2017).

Em indivíduos acima do peso, algumas das moléculas com maior expressão são; fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa (PCR), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1 ou CCL2) e leptina, ao contrário do que ocorre em indivíduos magros onde não são tão expressas. As adipocinas e quimiocinas citadas acima induzem a infiltração de macrófagos no TA e possuem capacidade ou de ativar enzimas que inibem o receptor de insulina causando resistência à mesma, ou de reduzir a sensibilidade à insulina mediante a inibição do transportador de glicose-4 (GLUT-4) (FRANCISQUETI et al., 2015; ALEXANDRAKI

2006; DLUDLA et al., 2018; SILVA JR et al., 2017; LACERDA et al., 2016).

Dentre outras ações destas moléculas, o TNF- α e a IL-6 por exemplo, tem capacidade de diminuir a expressão de adiponectina e reduzir a atividade da lipase lipoproteica, enzima responsável por degradar os triglicerídeos das lipoproteínas quilomícron e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) para armazenamento dentro do tecido adiposo, gerando um aumento na circulação dos ácidos graxos livres (FONSECA et al., 2007). Além do mais, o TNF- α está envolvido na apoptose de células β do pâncreas podendo provocar disfunção contribuindo para a RI (REHMAN et al., 2016), na citotoxicidade, apoptose, inibição da diferenciação de adipócitos, na síntese de IL-1 e IL-6 (LACERDA et al., 2016).

A IL-6 age de forma sistêmica e local, além de macrófagos e linfócitos, outros diversos tipos células são atraídas pela secreção desta molécula. Ela estimula a produção de PCR pelos hepatócitos e é um dos mediadores de proteínas de fase aguda da inflamação, assim como a própria PCR.

Uma das principais mediadoras da resposta inflamatória de fase aguda é a proteína C reativa (PCR), esta molécula possui atribuições imunorreguladoras como por exemplo a ativação e o recrutamento do sistema complemento, e o estímulo à liberação de citocinas como o TNF- α , IL-1, IL-18, e até mesmo da IL-6 (BASTARD et al., 2006). Associadamente ao posto de defesa, também possui diversas execuções envolvidas na patogênese de doenças cardiovasculares, intolerância à glicose, síndrome metabólica, e diabetes melito 2 (INDULEKHA, 2011).

Já a proteína quimioatraente de monócitos 1 MCP-1/CCL-2 é conhecida por sua capacidade de conduzir a quimiotaxia de células mieloides e linfoides, sua expressão é induzível, desencadeada após exposição a estímulos inflamatórios, como IL-1, IL-4, IL-6, TNF α etc (YOSHIMURA, 2018).

A leptina tem capacidade de agir no hipotálamo promovendo saciedade. Contudo, na obesidade há intolerância à insulina e à leptina o que leva a perdas no controle do apetite e comportamento alimentar, ocasionando mais discrepância no ganho de peso. A leptina possui capacidade de suprimir a expressão de adiponectina, modular a produção de TNF-a, além de estimular expressão da mesma e a de IL-6 (SILVA JR, 2017; LACERDA et al., 2016).

Quando o excesso de peso corporal é suprimido, há uma maior expressão nas adipocinas anti-inflamatórias e uma redução das pró-inflamatórias. Adipócitos e

diversas outras células produzem adipocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e a adiponectina (AdipoQ), que por sua vez, são capazes de reduzir os níveis séricos de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8.

A IL-10 é uma citocina de ação anti-inflamatória, que predominantemente no TA, é gerada por células imunes como linfócitos T e B (RAJBHANDARI et al., 2019) além de ser indispensável na regulação da homeostase tecidual, sobretudo no intestino (OUYANG et al., 2019).

Secretada pelo endotélio onde desempenha funções vasoprotetoras, a adiponectina também é expressa quase que exclusivamente no tecido adiposo. Sua concentração plasmática atua positivamente aumentando a sensibilidade à insulina e desempenhando efeitos anti-inflamatórias (KATSIKI et al., 2017). Os efeitos metabólicos da adiponectina no fígado elevam a sensibilidade à insulina, restringe o influxo de ácidos graxos não esterificados, eleva a oxidação dos ácidos graxos e reduz o fluxo de glicose (SILVA JR, 2017; BALSAN et al., 2015).

Perante ao exposto, fica claro que a inflamação crônica induzida pela obesidade favorece uma desregulação na expressão de citocinas, acarretando diversas complicações na saúde do organismo. Sendo assim, nota-se que as citocinas pró e anti-inflamatórias são fundamentais para o controle da resposta inflamatória e imunológica pois estão intrinsecamente relacionadas às atividades e regulação de diferentes células, como também de outras citocinas.

1.3. Colesterol e Triglicérides

O colesterol é um esteroide importante para o funcionamento do organismo, porém, em níveis mais altos formam placas nas paredes das artérias e dificultam a passagem da circulação sanguínea. A maior parte que o organismo necessita é biosintetizado de forma endógena no fígado, mas também é proveniente de alimentos ingeridos na dieta. Por ser solúvel apenas em gorduras, o colesterol é transportado pelo sangue por meio de lipoproteínas: lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). O HDL é caracterizado por recolher o colesterol na parede das artérias, é capaz de realizar a transferência de colesterol dos tecidos extra-hepáticos devolvendo-o ao fígado (SHAH et al., 2001) ao passo que o LDL forma um depósito

de gordura nas artérias e diminui o fluxo de sangue. Já o VLDL tem a capacidade de transportar porções maiores de triglicerídeos por conta de sua composição de diferentes porcentagens de proteína, triglicerídeos e colesterol. O colesterol total é definido pela soma do colesterol HDL, LDL e VLDL.

Quem representa a maior parte das gorduras ingeridas são os triglicerídeos. Após sua ingestão, o colesterol é absorvido pelas células intestinais, e passando pelo sistema linfático, estas moléculas alcançam a circulação sanguínea. Os ácidos graxos são recolhidos especialmente por células musculares, também pelas células adiposas e outra parte é recolhida pelo fígado.

Distúrbios no metabolismo de ácidos graxos e colesterol são perceptíveis na obesidade e naturalmente estão ligados ao desenvolvimento e/ou manutenção da inflamação metabólica e RI. A ascensão da produção hepática de LDL e VLDL e atenuação de HDL, é um problema grave que acompanham a obesidade. As consequências mais custosas da resistência à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, giram em torno da incapacidade de suprimir a produção hepática de glicose, a absorção e oxidação de glicose muscular e a incapacidade de suprimir a liberação de ácidos graxos livres do TA. Essas irregularidades são impulsionadas pela combinação da maior entrega de ácidos graxos livres ao fígado a partir do aumento da adiposidade total, principalmente visceral, resistência à insulina e um estado pró-inflamatório.

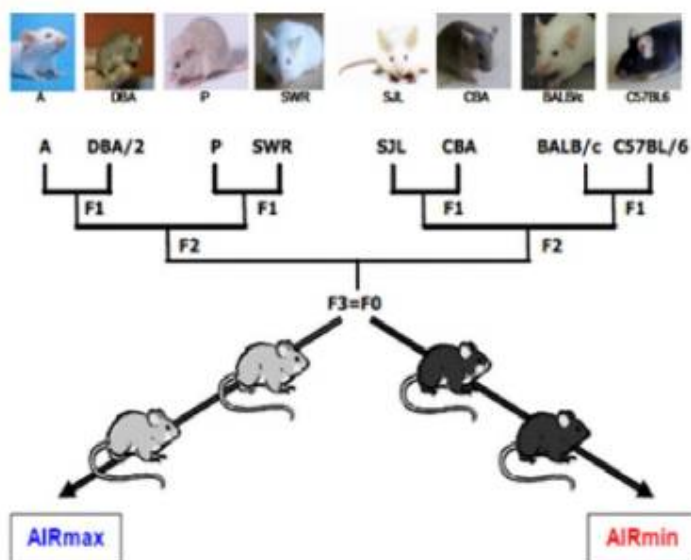
1.4. Camundongos AIRmax AIRmin como modelo experimental

Estas linhagens foram criadas e desenvolvidas pelo equipe do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os camundongos AIRmax (máxima reatividade inflamatória aguda) e AIRmin (mínima reatividade inflamatória aguda) foram fenotipicamente selecionados baseado na intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR).

A seleção foi iniciada a partir de cruzamentos balanceado entre oito linhagens isogênicas (CBA, A, SWR, SJL, C57Bl6, P, BALB/c e DBA/2) que deram origem à população (F0), geneticamente heterogênea (STIFFEL et al., 1990). O critério aplicado levou em consideração os extremos de máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda (AIR) gerada pela injeção subcutânea de microesferas de

poliacrilamida (Biogel).

Figura 1 – Esquema de obtenção das linhagens AIRmax e AIRmin por seleção fenotípica.



Fonte: Laboratório de Imunogenética, 2022

Após 24 hs da injeção de Biogel através da lavagem do exsudato inflamatório com heparina a 20U, a avaliação da AIR era realizada. O fenótipo foi definido mediante a avaliação, no exsudato inflamatório, da concentração de proteínas plasmáticas por espectrofotometria a 280 nm e do número de leucócitos por contagem em câmara hemocitométrica de Malassez (IBANEZ et al., 1992; STIFFEL et al., 1990).

A cada geração os animais que apresentavam máxima reatividade inflamatória aguda eram cruzados entre si enquanto, por outro lado, os animais que apresentavam mínima reatividade inflamatória aguda também eram cruzados entre si. Todos os cruzamentos eram feitos evitando-se a consanguinidade para preservar um background genético heterogêneo fixando-se apenas os genes de resposta inflamatória aguda.

Vale pôr em evidência que as respostas inatas e específicas apresentam regulações genéticas independentes, como já certificado em Araujo et al. (1998). AIRmax e AIRmin não manifestam diferenças na resposta humoral a antígenos

complexos ou celular em ensaios de hipersensibilidade tardia (ARAUJO et al., 1998).

Dados anteriores do laboratório mostraram que os camundongos selecionados para a reatividade inflamatória aguda (AIR) acumularam de maneira diferenciada entre as linhagens Max e Min e que o tecido adiposo, por sua vez, é descrito ter um estado de inflamação basal crônica, é interessante investigar a possível inter-relação entre essas duas características nas linhagens AIRmax e AIRmin.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar a interferência de genes reguladores da resposta inflamatória aguda no ganho de peso de animais AIRmin e AIRmax ao longo do tempo de vida, correlacionando parâmetros do ganho de peso (gordura viscerogonadal e perfil lipídico do soro) e da expressão de genes de citocinas inflamatórias nesses animais submetidos à dieta convencional ou à dieta hiperlipídica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos AIRmax e AIRmin, em grupos equivalentes de machos e fêmeas, a partir do desmame com 28 a 30 dias de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Imunogenética. Os animais AIRmax e AIRmin foram mantidos no biotério de Imunogenética do Instituto Butantan sob regime convencional, água ad libitum e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos envolvendo os animais atenderam aos princípios éticos de experimentação animal aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (CEUAIB 3268080319)

3.2. Regime alimentar com dieta Convencional (DC) e dieta Hiperlipídica (DH)

Em 2020, grupos de animais AIRmax e AIRmin, machos e fêmeas, foram mantidos sob dieta convencional (DC) ou dieta hiperlipídica (DH) durante 12 meses e tiveram seus parâmetros antropométricos, de ganho de peso analisados aos 3, 6 e 12 meses.

Composição da ração Convencional (DC)

A ração convencional foi obtida da empresa Nuvilab CR-1 e apresenta a seguinte composição: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Composição da ração Hiperlipídica (DH)

A ração Hiperlipídica foi obtida da empresa Pragsoluções Biociências e é composta por amido milho (15,95%), caseína (20%), amido dextrinizado (10%), sacarose (10%), Banha (30%), óleo de soja (4%), fibra (Celulose de Microcristalina) (5%), L-cistina

(0,3%), Bitartarato de colina (0,25%), BHT (0,01%), Mix mineral AIN 93G (3,5%) e Mix vitamínico AIN 93 (1,0%).

Os dados obtidos da análise desses animais indicaram diferenças no ganho de peso e acúmulo de gordura viscerogonadal nos grupos AIRmin e AIRmax com 6 meses de DC e DH. Desse modo, em 2021 animais AIRmax e AIRmin, em grupos equivalentes de machos e fêmeas foram colocados sob o regime de dieta DC ou DH no momento do desmame. Com 6 meses de dieta, foram sangrados para avaliação do perfil lipídico do soro, eutanasiados e tiveram suas gorduras vicerogonadais extraídas, pesadas e estocadas em tampão "Later" para avaliação da expressão de citocinas produzidas nestes tecidos.

3.3. Coleta e pesagem das amostras de gordura

Para realizar a extração de RNA das amostras de gordura viscerogonadal foram coletadas, pesadas e estocadas a -20°C em tampão "Later". Do material estocado, foram pesados 100 a 150 mg dessas amostras, as quais foram transferidas para tubos eppendorfs contendo "beads" de aço inoxidável para extração de RNA.

3.4. Extração de RNA

Esta etapa foi realizada utilizando o kit GE Healthcare. Para isso, foram adicionados 350 µl da solução de lise + 3,5 µl de β-Mercaptoetanol nas amostras contidas nos eppendorfs, as quais foram colocadas no TissueLyzer durante 5 minutos. O lisado foi aplicado em eppendorfs contendo filtros de limpeza (RNAspin mini filter) e centrifugados a 11.000 x g durante 5 minutos. O filtro utilizado foi descartado e acrescentou-se 350 µl de etanol 70% ao filtrado que foi submetido ao vórtex durante 5 segundos. A seguir os filtrados foram transferidos para novos eppendorfs contendo um filtro para retenção do RNA e DNA e centrifugados a 11.000 x g durante 5 minutos. Em seguida, houve a transferência desse filtro para novos eppendorfs e o descarte do que sobrou (filtrado).

Para a dessalinização, foi adicionado 350 µl de tampão dessalinizador e em

seguida centrifugados a 11.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os filtros foram colocados em novos eppendorfs. Para a digestão do DNA, preparou-se um mix de 10 µl de DNase I reconstituído + 90 µl de tampão de DNase. Foi aplicado 95 µl do mix nos filtros. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente em 15 minutos e então submetidas as 3 etapas de lavagem e secagem. A seguir, o RNA foi eluído adicionando 100 µl de RNase-free H₂O e centrifugado a 11.000 x g durante 5 minutos.

3.5. Nanovue

A fim de garantir com segurança maiores índices de pureza das amostras obtidas na etapa de extração de RNA, foi utilizado o aparelho Nanovue para medir a concentração e pureza dos ácidos nucleicos. Para RNA, o coeficiente de extinção é 40 (ng/µl RNA) / A₂₆₀, ou seja, 1 unidade OD = 40 (fator de conversão) em um caminho de 10 mm. Portanto, concentração µg/ml = Abs 260 x 40. O Nanovue tem um amplo alcance linear.

A revisão das configurações de parâmetros do equipamento foram verificadas, onde o comprimento do caminho foi 'Automático', o plano de fundo 'Ligado', o fator de diluição de 1.000 (para as amostras de RNA o fator foi 40,0). Evitando bolhas ou espalhamento da amostra, foi pipetado 2 µl de cada amostra de referência limpa na placa de amostragem. A concentração das amostras foi exibida em ng/ml e os dados foram anotados.

3.6. Bioanalyzer

O Bioanalyzer RNA 6000 Nano faz uma medição da qualidade do RNA denominada RNA integrity number (RIN), proporcionando uma caracterização segura e reprodutível de RNA total e mRNA de diversos tipos de amostras (5ng de RNA total). O procedimento foi baseado em uma corrida das amostras em gel sobre o "RNA nano chip".

É utilizado como controle um padrão de peso molecular (RNA Ladder). Para o preparo das amostras, foi pipetado 1,2 µl de cada amostra e também do RNA Ladder (previamente aliquoteado a -80°C) em eppendorfs de 0,2 mL.

Para realizar o preparo do gel, o priming station do equipamento foi montado e uma seringa foi acoplada no aparato já com o êmbolo suspenso. No preparo do gel, foi pipetado 550 µl de RNA 6000 nano gel matrix em um tubo contendo filtro. Em seguida, o tubo foi posto na centrífuga a 1.500 g durante 10 minutos à temperatura ambiente e aliqotado em eppendorfs contendo 65 µl do gel filtrado e 0,5 ml de água RNase-free. O frasco de corante RNA 6000 Dye foi homogeneizado no vórtex (10 segundos) e adicionou-se 1 µl do Dye no eppendorf com 65 µl de gel filtrado com a água para se ter a mistura do corante (Dye) no gel. Em seguida a mistura foi passada no vórtex novamente e centrifugada à 13.000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Após colocar o “RNA nano chip” no “Priming Station”, foi pipetado 9,0 µl da mistura do gel no poço G. A seringa foi posicionada em 1 ml e o chip foi fechado no Priming Station. O êmbolo da seringa foi pressionado para espalhamento do gel em todos os poços do chip, e após a abertura do Priming Station, foi pipetado 9,0 µl do gel nos demais poços marcados com G (primeiro e segundo). Depois de centrifugar brevemente o eppendorf contendo Agilent RNA 6000 Nano Marker foi pipetado 5 µl do reagente em todos os 12 poços de amostras junto ao poço do Padrão. Logo após, houve a aplicação o Ladder e das amostras no chip. Foi pipetado 1 µl do ladder no poço do Padrão, e 1 µl das amostras em cada um dos 12 poços. O chip foi posto na posição horizontal no adaptador do vórtex IKA durante 1 minuto à 2.200 rpm. A seguir, rapidamente o chip foi colocado no Bioanalyzer, para a realização da análise e os dados foram salvos em PDF.

3.7. cDNA

Na capela de fluxo laminar ligada previamente por 15 minutos (com lâmpada uv), foi feito o preparo do material. No Mix 1 foi utilizado 1 µl de oligo DT e 1 µl de mix dNTP a 10 mM. Enquanto no Mix 2 foi utilizado 4 µl de first stand, buffer 5x, 1 µl de DTT, e 1 µl de enzima super script III. Em seguida, foi pipetado 250 µl de RNA total nos eppendorfs contendo o Mix 1, complementado com H₂O RNase free (máximo de 14 ul) em todas as amostras a quais foram levadas para o termociclador para a incubação de 5 minutos a 65⁰C, e em seguida submetidas ao resfriamento por 1 minuto. Após a centrifugação, foi adicionado 6 µl do Mix 2 em todas as

amostras e as mesmas foram colocadas novamente no termociclador a 50°C durante 1 hora e mais 70°C durante 15 minutos. Para a estocagem o cDNA foi diluído 1:4 em água, e em seguida acondicionados freezer a -80°C.

3.8. RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) mede os níveis de mRNA de alvos com baixos números de cópias de interesse. Os benefícios do procedimento incluem a sensibilidade, e o potencial para quantificação alta e precisa. Após as análises com o Bioanalyzer, o RNAm foi transcrito reversamente para amplificação e detecção de cDNA específico com emprego de RT-PCR, no sentido de avaliar a expressão dos genes de citocinas.

Dentre as técnicas empregadas para a medição e mudanças relativas na expressão gênica, o RT-PCR é o mais eficaz e preciso. Os resultados do RT-PCR são expressos como Ct (ponto inicial ou limiar do ciclo), os valores de Ct correspondem ao número do ciclo do PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto do RT-PCR amplificado do gene alvo e são inversamente proporcionais ao conteúdo de mRNA da amostras, ΔCt (delta Ct), o valor da variação de CT (ΔCT) é calculado subtraindo-se o valor do CT do gene de interesse (do valor do CT do gene constitutivo, usado como controle interno e $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct), normalização dos resultados pela média da variação do valor de CT (ΔCT) dos animais controle.

O ensaio foi feito em triplicatas em placas e os cálculos para diluição dos primers foram feitos. No fluxo, os primers foram diluídos e a placa foi aberta. Foi pipetado 5 μ l de Mastermix em todos os poços, assim como a H₂O e os primers também foram colocados em seus respectivos poços. Após deixar o fluxo, a placa foi selada e coberta com papel alumínio e levada até a geladeira. No computador acoplado ao aparelho de PCR, o desenho da placa foi transferido para o programa, as amostras em triplicatas foram adicionadas. Em seguida, as amostras de cDNA foram pipetadas nos poços da placa, a mesma foi selada, e centrifugada por 10 segundos. Após esse procedimento, a placa foi inserida na máquina de RT-PCR e a corrida foi realizada.

Nossos resultados foram expressos em ΔCt (delta Ct), uma vez que todos os animais, tanto submetidos à DC quanto submetidos à DH acumularam gordura, não

havendo nesses ensaios animais magros que pudessem compor um “grupo controle”.

3.9. Colesterol e Triglicérides

A Metodologia realizada foi um teste Enzimático Colorimétrico para a determinação do colesterol total em amostras de soro, por reação de ponto final.

Colesterol:

O ensaio foi preparado utilizando o kit Colesterol Liquiform da Labtest, referência 76, o qual continha os seguintes reagentes:

Reagente 1 - contém tampão 50 mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500 mol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 mol/L; colesterol esterase 250 U/L; colesterol oxidase 250 U/L e peroxidase 1000 U/L

Padrão: 200 mg/dL - contém azida sódica 15 mmol/L.

Nos tubos, foi colocado 0,01 mL das amostras ou 0,01 mL do padrão e 1,0 mL do reagente 1. Em seguida, a incubação foi feita em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos, onde o nível de água no banho estava superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. A seguir 100 µl de cada amostra foi transferida para uma microplaca de 96 poços. A absorbância das amostras e do padrão foi determinado em 490 nm em leitor de ELISA (µQuant – Biotek Instruments, INC).

O cálculo foi realizado levando em conta que: o fator de calibração é igual a 200 dividido pela absorbância do padrão, e que a resultado da dosagem do-Colesterol em mg/dL é igual a absorbância da amostra vezes o fator, têm-se a formula de cálculo final:

- Colesterol (mg/dL) = absorbância da amostra dividido pela absorbância do padrão x 200.

Triglicerídeos:

O ensaio foi realizado utilizando o kit Triglicérides Liquiform da Labtest, referência 87, o qual continha os seguintes reagentes:

Reagente 1: Contém tampão 50 mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 mol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lipase 1400 U/L; glicerolquinase 1000 U/L; glicerolfosfato oxidase 1500 U/L; peroxidase 900 U/L e azida sódica 0,095%.

Padrão: Contém triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 0,045%.

Nos tubos, foram colocados 0,01 mL de cada amostra ou 0,01 mL do padrão e 1,0 mL do reagente 1. Em seguida, a incubação foi feita em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos, onde o nível de água no banho estava superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. A seguir 100 µl de cada amostra foi transferida para uma microplaca 96 poços. A absorbância das amostras e do padrão foi determinado em 490 nm em leitor de ELISA (µQuant – Biotek Instruments, INC).

O cálculo foi realizado, levando em conta que o fator de calibração é igual a 200 dividido pela absorbância do padrão e que a resultado da dosagem dos Triglicérides em mg/dL é igual a absorbância da amostra vezes o fator, têm-se a formula de cálculo final:

- Triglicérides (mg/dL) = absorbância da amostra dividido pela absorbância do padrão x 200.

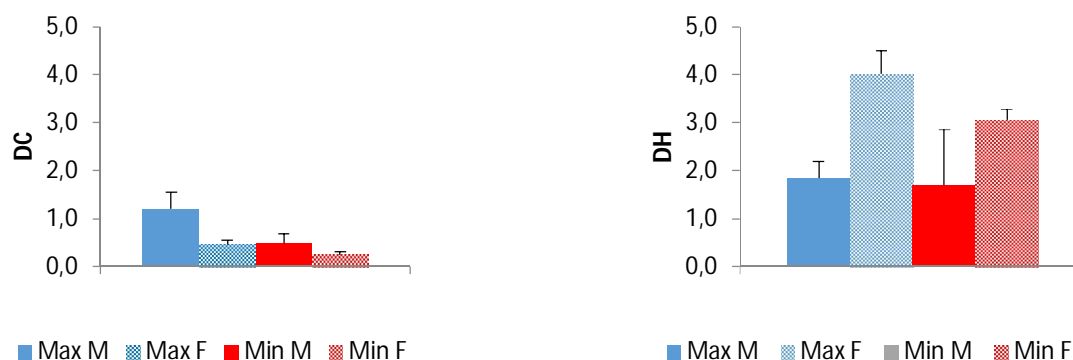
3.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados usando o teste Anova através do programa GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, California). Valores P < 0.05 foram considerados significantes. Os resultados representam a média e o erro padrão (± SEM).

4. RESULTADOS

4.1. Coleta e pesagem da gordura viscerogonadal

Figura 2 - Peso da gordura viscerogonadal retirada dos camundongos AIRmax e AIRmin machos e fêmeas submetidos à dieta convencional (DC) e hiperlipídica (DH) durante 6 meses.



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Na DH foram observadas diferenças significativas no peso da gordura entre machos e fêmeas AIRmax (***) $p \leq 0,005$ e AIRmin (*) $p \leq 0,05$.

Como visto na figura 2, na DC não foram observadas diferenças quanto o acúmulo de gordura na região viscerogonadal entre os grupos estudados. Na DH as fêmeas apresentaram maior acúmulo desse tipo de gordura que os machos. Fato observado tanto para a linhagem AIR Max (***) $p \leq 0,005$ quanto para linhagem AIR Min (*) $p \leq 0,05$. A comparação das duas dietas indica que a DH apresenta um padrão de acúmulo de tecido gorduroso abdominal diferente do padrão visto na DC nas fêmeas. Na linhagem AIR Max a DH aumenta a deposição abdominal de gordura em relação à DC (***) $p \leq 0,005$ e na linhagem AIR Min, o mesmo fenômeno é observado, com o mesmo nível de significância (***) $p \leq 0,005$.

4.2 Análise dos dados Nanovue

Tabela 1 – Concentração RNA extraído das amostras de gordura viscerogonadal de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos à dieta convencional (DC). Os camundongos AIRmax estão representados em azul e os AIRmin em vermelho.

DC	Gênero	[] RNA ng/μl	A (260/280)
5	M	596	1.822/1.294
6	M	245	1.97/17
7	M	179	1.990/1.52
12	F	370	1.96/2.27
13	F	70	1.92/1.19
14	F	264	1.96/1.97
19	M	116	1.99/0.60
20	M	107	1.94/0.72
21	M	122	1.94/1.32
26	F	178	1.97/0.42
27	F	313	1.95/1.62
28	F	306	1.95/1.02

Fonte: próprio autor, 2022.

Tabela 2 – Concentração RNA extraído das amostras de gordura viscerogonadal de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos à dieta hiperlipídica (DH). Os camundongos AIRmax estão representados em azul e os AIRmin em vermelho.

DH	Gênero	[] RNA ng/ul	A (260/280)
1	M	275	1.815/1.854
2	M	177	1.912/2.078
3	M	183	1.96/2.0
4	M	144	1.97/2.10
8	F	120	1.96/1.84
9	F	183	1.96/2.0
10	F	152	1.88/1.27
11	F	168	1.99/1.79
15	M	169	1.913/2.142
16	M	176	1.807/1.769
17	M	124	1.98/1.23
18	M	70	1.92/1.19
22	F	189	1.96/2.10
23	F	116	1.99/1.86
24	F	130	1.97/1.87
25	F	82	1.97/0.43

Fonte: próprio autor, 2022.

Conforme mostrado nas tabelas 1 e 2, após o processo de extração de RNA, foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanovue para a medição da concentração e da absorbância de amostras de ácidos nucleicos e proteínas.

Como referido, deve utilizar aproximadamente as mesmas quantidades de RNA nas diferentes amostras quando pretende-se compará-las (Bustin et al., 2009). A razão A260/A280 é usada para avaliar a pureza de DNA e RNA. Através desta razão, pode-se avaliar a contaminação da amostra ou dos reagentes. Segundo Asif et al. (2006) quando esses valores estiverem entre 1,8-2,1, respectivamente, indicam a descontaminação das amostras. Ressalta-se ainda que a relação de absorbância

A260/A280 não indica diretamente a pureza do RNA, pois a presença de DNA ou resíduos de fenol altera esta relação (Bustin et al., 2009). É possível observar na tabela 1 e 2 os valores da quantificação e das relações entre absorvâncias, evidenciando que as concentrações de RNA variam de 70 a 596 ng/ μ l, e a absorvância próximas a 2.0 sendo então, valores considerados adequados.

4.3 Pureza (RNA Integrity Number – RIN) dos ácidos nucleicos (Bioanalyzer)

Tabela 3 – Pureza RNA extraído das amostras de gordura viscerogonadal de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos à dieta convencional (DC).

DC	Gênero	RIN
5	M	6.60
6	M	7
7	M	7.90
12	F	8.20
13	F	7.60
14	F	7.90
19	M	8.10
20	M	7.20
21	M	6.80
26	F	8.40
27	F	8.20
28	F	7.80

Fonte: próprio autor, 2022.

Tabela 4 - Pureza RNA extraído das amostras de gordura viscerogonadal de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos à dieta hiperlipídica (DH).

DH	Gênero	RIN
1	M	8.30
2	M	6.50
3	M	8.80
4	M	8.60
8	F	7.80
9	F	8.30
10	F	8.90
11	F	8.30
15	M	8.30
16	M	6.80
17	M	7.50
18	M	7.40
22	F	8.30
23	F	6.90
24	F	7.70
25	F	8.80

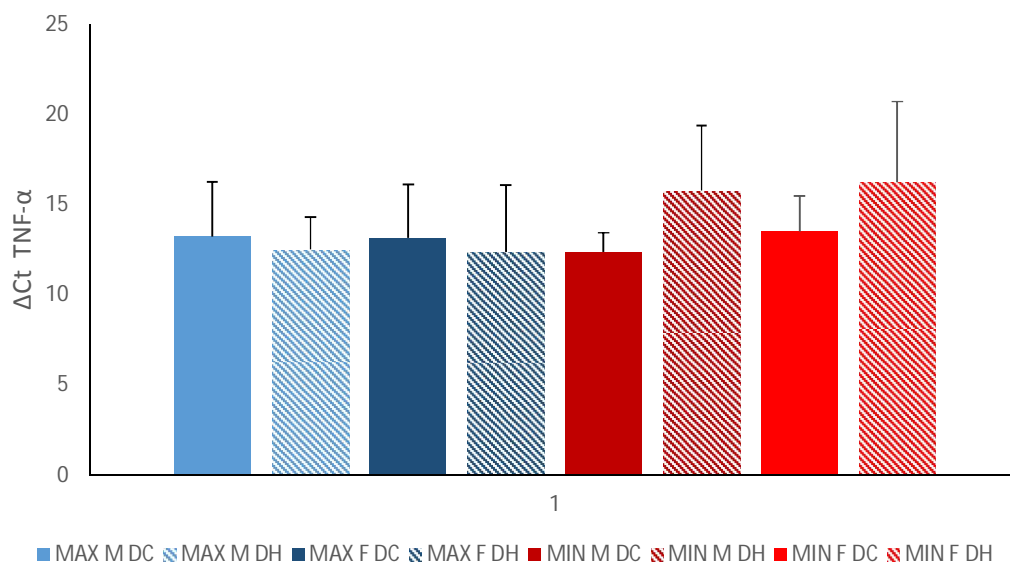
Fonte: próprio autor, 2022.

Nas tabelas 3 e 4, as amostras foram submetidas às análises pelo Bioanalyzer, com base em um sistema padronizado de numeração de qualidade crescente de 1 a 10, o RIN atribui valores de integridade às medições do RNA, sendo desejável ao redor de 7.0 ou maior. Os resultados desse ensaio tanto para camundongos submetidos à DC como mostra na tabela 3, quanto para camundongos submetidos à DH como mostra na tabela 4, variam de 6.90 a 8.90, indicando que a extração de RNA das amostras foi adequada. A obtenção dos dados de sequenciamento de qualidade desejáveis garantiu a replicabilidade e confiabilidade do experimento seguinte, o RT-PCR.

4.4 Análise dos dados RT-PCR da expressão dos genes TNF- α , IL-6 e CCL-2

O RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado. A amplificação do cDNA foi feita por RT-PCR com primers para os genes TNF- α , IL-6 e CCL-2 e para o gene constitutivo a Ciclofilina, como controle interno da reação. O valor da variação de Ct (Δ CT) foi calculado subtraindo-se o valor do Ct do gene de interesse do valor do Ct do gene da Ciclofilina e expressos nos gráficos a seguir.

Figura 3 – Expressão relativa de TNF- α (Δ Ct) em camundongos AIRmax (azul), AIRmin (vermelho) machos e fêmeas submetidos à dieta Convencional (DC) e Hiperlipídica (DH) durante 6 meses (média \pm SEM).

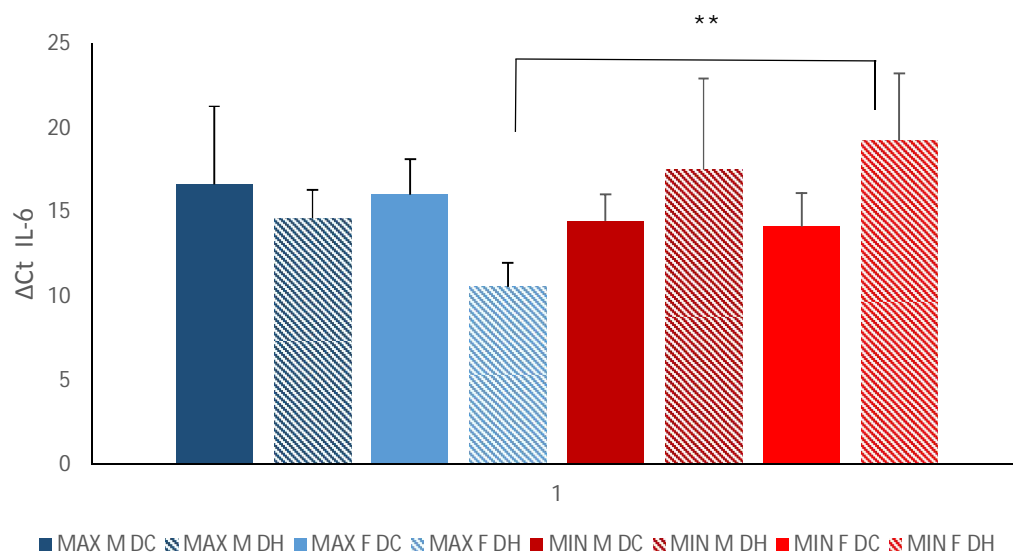


Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Houve expressão semelhante do gene de TNF- α em camundongos AIRmin e AIRmax machos e fêmeas submetidos à DC e a DH.

Como mostra a figura 3, foi observada expressão semelhantes do gene de TNF- α em camundongos AIRmin e AIRmax machos e fêmeas submetidos à DC e a DH, indicando que diferentes dietas não afetaram a produção de TNF- α .

Figura 4 - Expressão relativa de IL-6 (ΔCt) em camundongos longos AIRmax (azul), AIRmin (vermelho) machos e fêmeas submetidos à dieta Convencional (DC) e Hiperlipídica (DH) durante 6 meses (média \pm SEM).

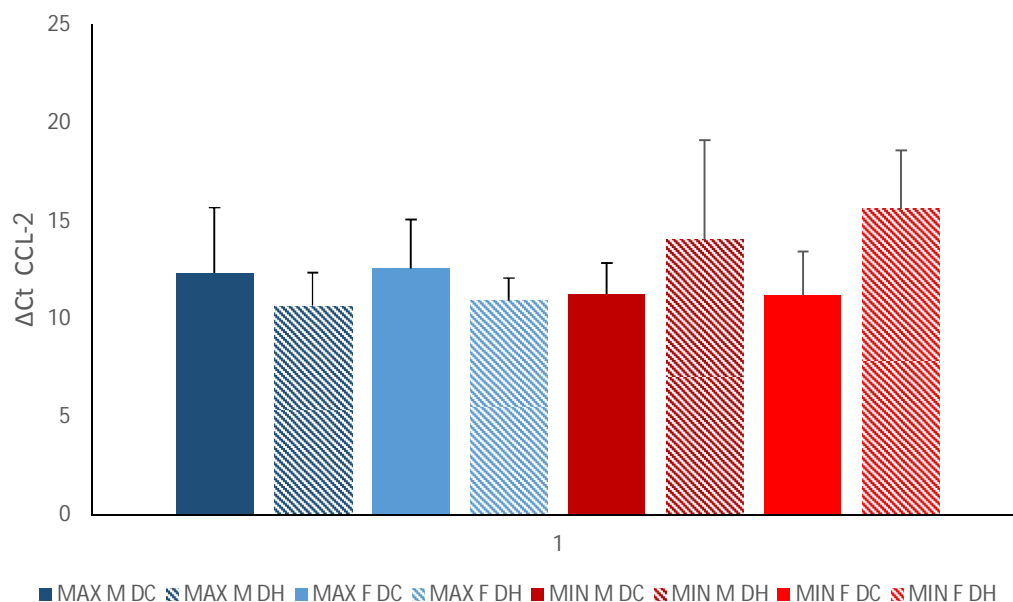


Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: A expressão do gene de IL-6 em camundongos AIRmin fêmeas foi maior que em camundongos AIRmax fêmeas quando submetidos a DH (* $p \leq 0,05$).

A figura 4 mostra que a expressão do gene de IL-6 em camundongos AIRmin fêmeas foi maior que em camundongos AIRmax fêmeas quando submetidos a DH (* $p \leq 0,05$). As fêmeas AIRmin submetidas a DH apresentaram também uma tendência maior expressão de IL-6 que as fêmeas AIRmin submetidas a DC, embora com um número de animais analisados até o momento essa diferença não tenha sido estatisticamente significante.

Figura 5 - Expressão relativa de CCL-2 (ΔCt) em camundongos AIRmax (azul), AIRmin (vermelho) machos e fêmeas submetidos à dieta Convencional (DC) e Hiperlipídica (DH) durante 6 meses (média \pm SEM).



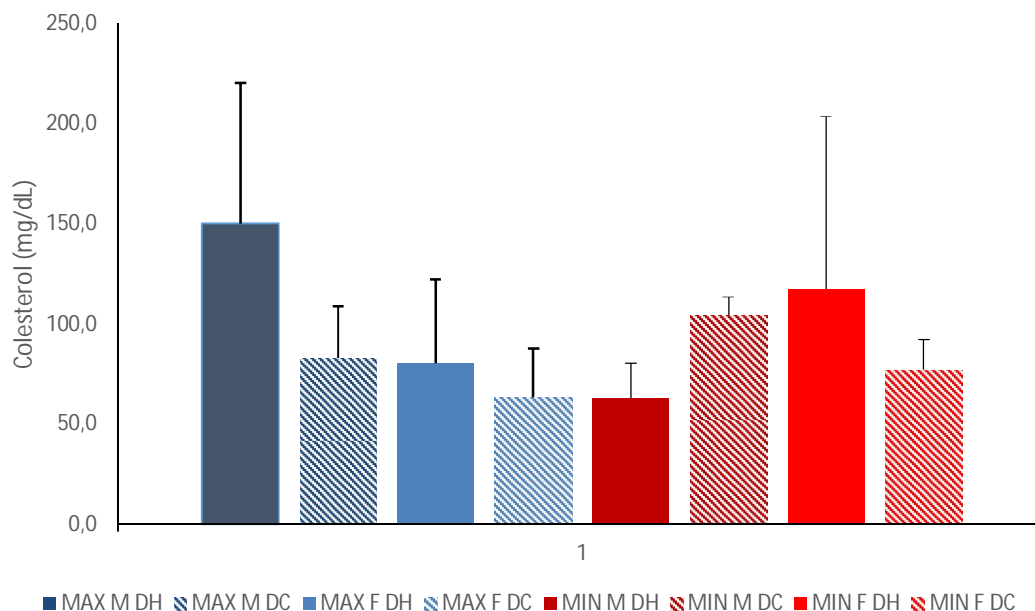
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Para a expressão do gene de IL-6, as fêmeas AIRmin submetidas a DH apresentaram uma tendência de maior expressão de CCL-2 que as fêmeas submetidas a DC.

Como observado nas figuras 5, não houve uma diferença expressiva em relação a expressão do gene de CCL-2 em camundongos AIRmin e AIRmax machos e fêmeas submetidos as duas dietas (DC e DH). Ainda que, como visto para IL-6 as fêmeas AIRmin submetidas a DH apresentaram uma tendência de maior expressão de CCL-2 que as fêmeas submetidas a DC.

4.5. Análise dos dados de Colesterol

Figura 6 - Níveis de Colesterol (média \pm SEM) dosados no soro dos camundongos AIRmax (azul), AIRmin (vermelho) machos e fêmeas submetidos à dieta Convencional (DC) e Hiperlipídica (DH) durante 6 meses.



Fonte: próprio autor, 2022.

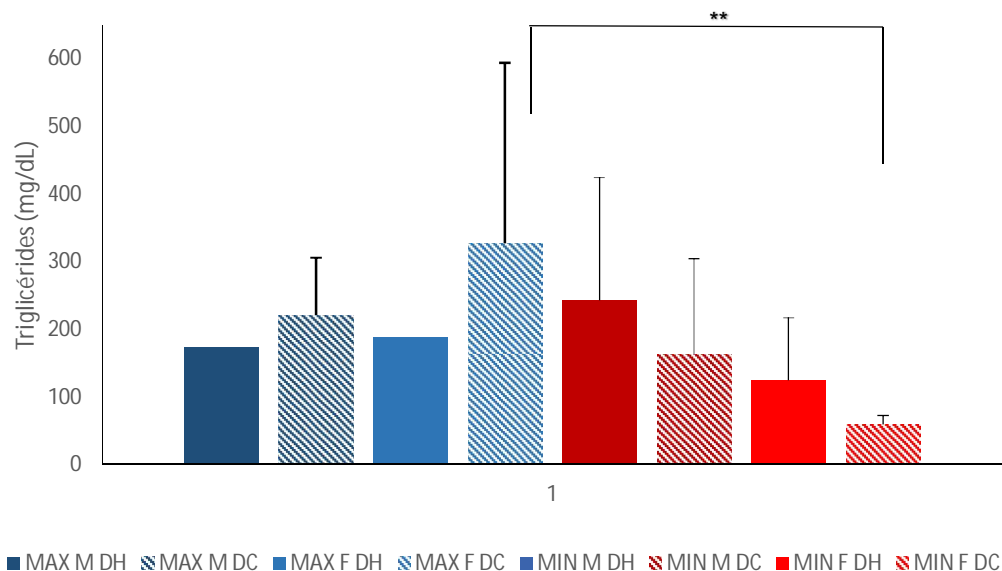
Legenda: Na DH, os AIRmax machos apresentaram níveis de colesterol mais altos que os machos AIRmin ($p \leq 0,01$).

Para avaliar o impacto das dietas sobre o perfil lipídico dos camundongos AIRmax e AIRmin, foram dosados os níveis de colesterol total no soro dos animais submetidos às dietas convencional (DC) e hiperlipídica (DH).

Conforme a figura 5, os resultados mostraram que, a DH não alterou os níveis de colesterol em relação à DC dentro das linhagens. No entanto a DH, aumentou mais os níveis de colesterol dos AIRmax machos que dos machos AIRmin. As fêmeas AIRmin mostraram uma tendência de aumento dos níveis na DH em relação à DC, porém, com o número de animais estudados, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

4.6 Análise dos dados de Triglicérides

Figura 7 - Níveis de Triglicérides (média \pm SEM) dosados no soro dos camundongos AIRmax (azul) AIRmin (vermelho) machos e fêmeas submetidos à dieta Convencional (DC) e Hiperlipídica (DH) durante 6 meses.



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Na DC, as AIRmax fêmeas apresentaram níveis de triglicérides mais altos que as fêmeas AIRmin (** $p \leq 0,01$).

Ainda para avaliação do impacto das dietas sobre o perfil lipídico dos camundongos AIRmax e AIRmin, foram dosados também os níveis de triglicérides no soro dos animais submetidos às dietas convencional (DC) e hiperlipídica (DH).

De acordo com a figura 7, é possível observar que os machos e fêmeas AIRmin mostram uma tendência a apresentar maiores níveis de triglicérides na DH em relação a DC, sendo essa tendência vista principalmente nas fêmeas. Nota-se ainda que as AIRmax fêmeas submetidas à DC, mostram níveis de triglicérides estatisticamente mais elevados que as fêmeas AIRmin ($p \leq 0,01$) submetidas à mesma dieta.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo objetivamos avaliar e comparar os impactos associados à obesidade derivada de uma dieta hiperlipídica e uma dieta convencional em camundongos selecionados para a máxima e mínima reatividade inflamatória aguda (AIR). Estes efeitos foram examinados através da coleta de gordura viscerogonadal, do perfil lipídico do soro, por expressão gênica de citocinas inflamatórias e dosagem de colesterol total e triglicérides. As citocinas selecionadas foram TNF- α , IL-6 e CCL-2. Foi pressuposto que houvesse uma tendência de aumento nos níveis de expressão do gene das citocinas escolhidas, como também nos níveis de colesterol total e triglicérides, dado que há resultados evidentes observados sobre o assunto.

Na coleta da gordura viscerogonadal, observou-se que as fêmeas AIRmax e AIRmin submetidas à DH tiveram maior acúmulo de gordura nesse local que os machos. Fato que não foi observado na DC. A comparação das duas dietas indica que a DH apresenta um padrão de acúmulo de tecido gorduroso abdominal diferente do padrão visto na DC nas fêmeas.

As análises da expressão de genes das citocinas inflamatórias indicaram tendência de maior expressão do gene de IL-6 e CCL-2 nas fêmeas AIRmin submetidas a DH em relação à expressão vista nas fêmeas DC. Esses dados indicam que a DH teve um impacto diferente na expressão tanto de IL-6 quanto de CCL-2 em relação à DC e são consistentes com o aumento de peso observado nesses animais e com achados em humanos, em que a expressão e secreção de IL-6 e CCL-2 tem um nível maior em um estado de obesidade, podendo contribuir para uma inflamação metabólica (SINDHU, 2015; EL-MIKKAWY, 2020; MASHIRO, 2016,).

Normalmente, a alta adiposidade está ligada ao aumento da produção de citocinas inflamatórias; aqui, observamos que a expressão de TNF- α , foi semelhante nas duas linhagens e dietas, indicando que essa citocina está presente tanto na obesidade induzida pela DC quanto a induzida por DH. De fato, dados na literatura, mostraram que a produção de TNF- α e CCL-2 em sobrenadante de adipócitos de camundongos C57/BL/6J submetidos a DC e DH, foram semelhantes nas duas dietas Liechocki (2018).

Quando observamos os resultados do perfil lipídico dos animais AIR Max e

AIRmin, observamos que a DH, aumentou mais os níveis de colesterol dos AIRmax machos em relação aos machos AIRmin, resultado não observado na DC e nas fêmeas. Notamos que para triglicérides, as fêmeas AIRmin mostraram uma tendência de aumento dos níveis na DH em relação à DC, corroborando o impacto dessa dieta neste grupo, já indicado nos resultados da expressão dos genes de IL-6 e CCL-2. Nota-se ainda que as AIRmax fêmeas submetidas à DC, mostram níveis de triglicérides mais elevados que as fêmeas AIRmin ($p \leq 0,01$), o que não foi observado na DH, mostrando que essa dieta elevou os níveis de triglicérides nessas fêmeas AIRmin.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos, é possível concluir que animais das linhagens AIRmin, especialmente as fêmeas submetidas a dieta hiperlipídica, tendem a ter um aumento nos níveis de triglicérides, da mesma forma que na expressão de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo IL-6 e CCL-2. Na linhagem AIRmax os parâmetros estudados foram semelhantes na DC e na DH, uma vez que dados anteriores mostraram que o acúmulo espontâneo de peso na DC nessa linhagem já era mais alto que na linhagem AIRmin e que a maioria das linhagens de camundongos isogênicos. Assim, nossos dados mostram que a DH teve maior impacto na linhagem AIRmin, a qual originalmente acumulava menos peso na DC, fato visto especialmente as fêmeas que sempre se mostraram mais magras em relação aos outros grupos estudados.

REFERÊNCIAS¹

- ALEXANDRAKI, K.; PIPERI, C.; KALOFOUTIS, C.; SINGH, J.; ALAVERAS, A.; KALOFOUTIS, A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1084, n 1, p. 89-117, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1196/annals.1372.039>>
- ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S. et. al. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.** v. 28, n. 9, p. 2913-2920, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4141\(199809\)28:09<2913::aid-immu2913>3.0.co;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-4141(199809)28:09<2913::aid-immu2913>3.0.co;2-3)>
- ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T.; TUCKER, M. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, n. 15, p.5227-5229, 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf053137n>>
- BALSAN, G. A.; VIEIRA, J. L.; OLIVEIRA, A. M; PORTAL, V. L. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, (1992). v. 61, n 1, p. 72-80, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.01.072>>
- BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J; CARON, M.; VIDAL, H.; et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16613757>>
- BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>>
- BUSTIN. A.; BENES. V.; GARSON. A.; HELLEMANS. J.; HUGGETT. J.; KUBISTA. M.; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.** v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Disponível em: <<https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762?login=false>>
- CHAIT, A.; DEN HARTIGH, L. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. **Front. Cardiovasc. Med.**, v. 7, n. 22, p. 1-41, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>>
- DLUDLA, P. V.; NKANDLA, B. B.; JACK, B.; MKANDLA, Z.; MUTIZE, T.; SILVESTRI, S.; et al. Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. **Nutrients**. v. 11, n. 1, p. 23, 2018. Disponível em:<<https://doi.org/10.3390/nu11010023>>

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – referências – elaboração Rio de Janeiro: ABNTM 2018.

EL-MIKKAWY, D. M. E.; EL-SADEK, M. A.; EL-BADAWY, M. A. SAMAHA. D. Circulating level of interleukin-6 in relation to body mass indices and lipid profile in Egyptian adults with overweight and obesity. **Egypt. Rheumatol. Rehabil.** 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s43166-020-00003-8>>

ELLULU, M. S.; PATIMAH, I.; KHAZA'AI, H.; RAHMAT, A.; ABED Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. **Arch. Med. Sci.**, v. 13, n. 4, p. 851-863, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>>

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J. Pediatr.** (Rio J.), v. 83, n 5, p. 192-203, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.2223/JPED.1709>>

FRANCISQUETI, F. V.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire: Rev. Soc. Aliment. Nutr.**, v. 40, n. 1, p. 81-89, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/141079>>

GBD 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **N. Engl. J. Med.**, v. 377, n.1, p. 13–27, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>>

IBANEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO et. al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 10, p. 2555-2563, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830221014>>

INDULEKHA, K.; SURENDAR, J.; MOHAN, V. High sensitivity C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and vascular cell adhesion molecule-1 levels in Asian Indians with metabolic syndrome and insulin resistance (CURES-105). **J. Diabetes Sci. Technol.**, v. 5, n. 4, p. 982-988, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/193229681100500421>>

JUNIOR, A. Adipocinas - A relação endócrina entre obesidade e diabetes tipo II. RBONE – **Rev. Bras. O. N. Emag.**, v. 11, n. 63, p. 135-144, 2017. Disponível em: <<http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/504/425>>

KATSIKI, N.; MANTZOROS, C.; MIKHAILIDIS, D. P. Adiponectin, lipids and atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 28, n. 4, p. 347-354, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000431>>

KWOK, K.; LAM, K. S.; XU, A. Heterogeneity of White adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Exp. Mol. Med.**, v. 48, n. 3, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26964831/>>

LACERDA, M. S.; MALHEIROS, G. C.; ABREU, A. Tecido adiposo, uma nova visão: as adipocinas e seu papel endócrino. **Rev. C. F. Med. Cam.**, v. 11, n. 2, p. 25–31, 2016. Disponível em: <<https://www.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/6>>

LIECHOCKI, S. **Avaliação do perfil inflamatório de diferentes depósitos de tecido adiposo na obesidade.** 2018. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

MASHIRO, I.; SHUNDUKE, A.; MOTOHIDE, G.; YUKIYO, Y.; KOICHI, K. CCL2 level is elevated with metabolic syndrome and CXCL10 level is correlated with visceral fat area in obese children. **Endocr. J.**, v. 63, n. 4, p. 795-804, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ15-0731>>

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity.**, v. 50, n. 4, p. 871-891, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>>

PINHO, K. H. dos S.; PAIVA, M. J. de; OLIVEIRA, R. A. de C. Leptin and adiponectin: role of these hormones in metabolic processes and its deregulation. **Res., Soc. Dev.**, v. 11, n. 2, p. e34711225144, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i2.25144. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25144>>

RAJBHANDARI, P.; ARNESON, D.; HART, S. K.; AHN I. S.; DIAMANTE, G., SANTOS L. C.; et al. Single cell analysis reveals immune cell-adipocyte crosstalk regulating the transcription of thermogenic adipocytes. **Elife.**, v. 23, n. 8, p. e49501. Disponível em: <<https://doi.org/10.7554/eLife.49501>>

REHMAN, K.; AKASH, M.S.H. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? **J. Biomed. Sci.**, v. 23, n. 87, p. 1-18, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0303-y>>

ROSEN, E.; SPIEGELMAN, B. What we talk about when we talk about fat. **Cell.**, v. 156, n. 1–2, p. 20–44, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>>

SAELY, C.; GEIGER, K.; DREXEL H. Browns versus white adipose tissue: a mini-review. **Gerontology.**, v. 58, n. 1, p.15-23, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000321319>>

SINDHU, S.; THOMAS, R.; SHIHAB, P.; SRIRAMAN, D.; BEHBEHANI, K.; AHMAD, R. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: significance for metabolic inflammation. **PLOS One.** v. 10, n. 7, 2015. Disponível em: <<https://10.1371/journal.pone.0133494>>

SHAH, P. K.; KAUL, S.; NILSSON, J., CERCEK, B. Exploiting the Vascular Protective Effects of High-Density Lipoprotein and Its Apolipoproteins. **Circulation.**, v. 104, n. 19, p. 2376–2383, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1161/hc4401.098467>>

STIFFEL, C.; IBANEZ, O.; RIBEIRO, O.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammation reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v. 7, n. 4, p. 221-233, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2083094>>

TRZECIAK-RYCZEK, A.; DEPTULA, B.; RYSTEWJ. P.; DEPTULA. W. Adipose tissue – component of the immune system. **Centr. Eur. J. Immunol.**, v. 36, v. 2, p. 95-99, 2011. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/289872212_Adipose_tissue_-_Component_of_the_immune_system>

VILLARROYA, F.; CEREIJO, R.; VILLARROYA, J.; GIRANLT, M. Brown adipose tissue as a secretory organ. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 13, n. 1, p. 26-35, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136>>

WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiol.**, v. 205, n. 2, p. 194-208, 2012. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x>>

YOSHIMURA T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? **Cell. Mol. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 335-345, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1038/cmi.2017.135>>