



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Análise da expressão de genes relacionados à
adipogênese e à inflamação em tecido adiposo de
mulheres com obesidade grau III**

Karine Lourenzone de Araujo Dasilio

Vitória-ES

2013

Karine Lourenzone de Araujo Dasilio

**Análise da expressão de genes relacionados à
adipogênese e à inflamação em tecido adiposo de
mulheres com obesidade grau III**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) - Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia de Paula.

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera.

Vitória-ES

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Dasilio, Karine Lourenzone de Araujo, 1983-

D229a Análise da expressão de genes relacionados à adipogênese e à
inflamação em tecido adiposo de mulheres com obesidade grau III /
Karine Lourenzone de Araujo Dasilio. – 2013.

144 f. : il.

Orientadora: Flávia de Paula.

Coorientadora: Flávia Imbroisi Valle Errera.

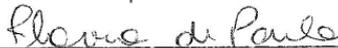
Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Obesidade. 2. Diabetes. 3. Inflamação. 4. Adipogênese. I.
Paula, Flávia de. II. Errera, Flavia Imbroisi Valle. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna KARINE LOURENZONE DE ARAUJO DASILIO Ao vigésimo nono dia do mês de abril do ano de dois mil e treze, às 13 horas, reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores Flávia de Paula, (Orientadora), Flávia Imbroisi Valle Errera, da Emescam, como Coorientadora, Iuri Drumond Louro, da Renorbio/Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Breno Valentim Nogueira, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Marco Cesar Cunegundes Guimarães, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Everlayny Fiorot Costalonga, da Universidade Vila Velha, como Titular, Thiago de Melo Costa Pereira, da Universidade Vila Velha, como Titular, perante a qual Karine Lourenzone de Araujo Dasilio, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal do Espírito Santo, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada “Análise da Expressão de Genes Relacionados à Adipogênese e à Inflamação em Tecido Adiposo de Mulheres com Obesidade Grau III”. A defesa da referida tese ocorreu, das 13 hrs às 16:30, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda aprovada por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito satisfatório. Eu, Flávia de Paula que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Registre-se que esta é a Nona Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Espírito Santo. Em Vitória, 29 de abril de 2013.



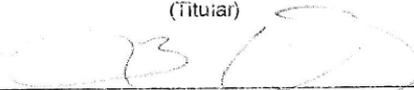
Prof.ª. Dr.ª. Flávia de Paula
(Orientadora)



Prof.ª. Dr.ª. Flávia Imbroisi Valle Errera
(Coorientadora)



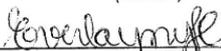
Prof. Dr. Iuri Drumond Louro
(Titular)



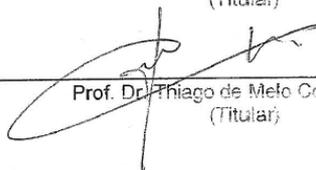
Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
(Titular)



Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
(Titular)



Prof.ª. Dr.ª. Everlayny Fiorot Costalonga
(Titular)



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
(Titular)

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de Artigos Científicos, composto por introdução, revisão de literatura, referências, os artigos e a seção de considerações finais, conforme orientações da RENORBIO. As listas de figuras e siglas contêm somente as ilustrações e siglas apresentadas na revisão de literatura.

Para as pessoas mais importantes da minha vida!

Do meu passado: minha mãe...

Do meu presente e futuro: Isadora...

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Flávia Imbroisi Valle Errera, por confiar em mim, quando todos duvidavam, por seu constante incentivo e exemplo de honestidade e dedicação.

À Profª Drª Flávia de Paula por me aceitar, quando não havia mais ninguém, por seu apoio e confiança.

Ao Dr. Gustavo Peixoto Soares por proporcionar a obtenção das amostras, além de fornecer ótimas sugestões para os artigos, principalmente os títulos!

À Profª Drª Elaine Cristina Viana por ser uma ótima companhia, assistir as pacientes e contribuir intelectualmente para os artigos.

À Profª Drª Nazaré Bissoli Souza por sempre estar à disposição e por estar sempre com alto astral!

À Profª Drª Maria Rita dos Santos e Passos Bueno por proporcionar a minha experiência e o desenvolvimento da minha tese em seu super laboratório: foi muito especial!

À Profª Drª Silvana do Santos Meyrelles e ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, por disponibilizarem o laboratório para os meus experimentos. Ainda ao Prof. Vasquez por toda a ajuda intelectual e pelos bons conselhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes, atual coordenador do ponto focal PPGBiotec-Renorbio/UFES, por todo o apoio durante a minha mudança de orientação e também pelos bons conselhos.

Aos queridos alunos do Laboratório de Genética do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo, principalmente ao Gerson, por me acolherem tão bem e fazerem a minha estadia em São Paulo ser inesquecível!

Aos amigos do Laboratório, principalmente à Aline, Agatha e ao Fabiano, por serem uma companhia tão agradável. Sentirei falta de vocês!

Ao meu marido Alex, pela paciência durante todos estes anos de pós-graduação!

Às agências de apoio e financiamento: Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

A todos que acreditaram e torceram por mim,

MUITO OBRIGADA!

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim, decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o **decidir.**”
Cora Coralina

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”
Martin Luther King

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excesso de gordura que prejudica a saúde do indivíduo, sendo um fator de risco importante para doenças com alta morbidade e mortalidade, tais como as doenças cardiovasculares, tolerância diminuída à glicose (IGT) e o diabetes mellitus tipo 2 (T2DM). Os principais depósitos do tecido adiposo branco (WAT), o subcutâneo (SAT) e o visceral (VAT), apresentam diferentes efeitos biológicos sobre a saúde. O WAT produz e secreta uma variedade de adipocinas, tais como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), adiponectina (ADIPOQ), *secreted frizzled-related protein 1* (SFRP1) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGFA), que são importantes em inúmeros eventos celulares, incluindo inflamação, angiogênese e adipogênese. A ativação da via *wingless-type* (WNT)/ β -catenina inibe a adipogênese por meio do bloqueio das proteínas ligantes ao amplificador CCAAT alfa (CEBPA) e do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PPARG), que são reguladores transcricionais essenciais da diferenciação dos adipócitos. A adipogênese também pode ser regulada por Alterações em genes da matriz extracelular estão implicadas na obesidade. A COL18A1, uma proteína da matriz extracelular, está envolvida na adipogênese. As alterações na expressão das adipocinas e a expansão máxima do tecido adiposo branco parecem contribuir para o aparecimento de comorbidades associadas à obesidade. O objetivo deste estudo foi avaliar, com a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa, a expressão de genes envolvidos na adipogênese e inflamação em SAT e VAT de mulheres com obesidade grau III submetidas à cirurgia bariátrica através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa. Os principais resultados obtidos mostraram que i) a expressão do gene CEBPA é maior em SAT que em VAT das mulheres com obesidade, ii) a expressão do gene CEBPA é maior no SAT das mulheres com obesidade e T2DM/IGT que nas mulheres com tolerância normal à glicose (NGT), iii) os genes SFRP1 e VEGFA estão menos expressos no VAT das mulheres com obesidade e T2DM/IGT que nas mulheres com NGT e iv) a expressão do gene COL18A1 em VAT foi associada aos níveis de HDL e à tolerância à glicose melhores. Esses resultados mostram que a expressão gênica difere nos distintos depósitos de WAT e está correlacionada aos parâmetros metabólicos de indivíduos com obesidade. Este trabalho contribui para a compreensão da expressão de genes relacionados a adipogênese e inflamação em SAT e VAT na obesidade grave.

Palavras-chave: Obesidade, Diabetes, Sinalização Wnt/ β -catenina, Adipogênese, Inflamação.

ABSTRACT

Obesity is a chronic condition defined as abnormal or excessive fat accumulation that impairs health. Overweight is an important risk factor for mortality and is a major risk factor for noncommunicable diseases, such as cardiovascular disease, impaired glucose tolerance (IGT) and type 2 diabetes mellitus (T2DM). Deposits of white adipose tissue (WAT), such as subcutaneous (SAT) and visceral (VAT), are biologically distinct, consequently, exhibited different biological effects on the health. WAT produces and secretes a variety of adipokines, such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), adiponectin (ADIPOQ), secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) and vascular endothelial growth factor (VEGFA), that are important in several cell functions, including angiogenesis, inflammation and adipogenesis. Alterations in adipokines expression might contribute to the onset of co-morbidities of obesity. The activation of *wingless-type* (WNT)/ β -catenin pathway inhibits of adipogenesis via the blockade of CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*) and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*), which are essential transcriptional regulators of adipocyte differentiation. Evidence showed that non-fibrillar collagen XVIII (COL18A1), a protein of the extracellular matrix, has been shown to be active in adipogenesis. The aim of this study was, through quantitative Polymerase Chain Reaction, evaluate the expression of genes involved in adipogenesis and inflammation in SAT and VAT of women with severe obesity. The main results showed that i) the expression of the gene *CEBPA* in SAT is higher than in VAT of women with obesity ii) SAT *CEBPA* gene expression is higher in obese women with T2DM/IGT than in obese women with normal tolerance glucose tolerance (NGT), iii) the expression of *SFRP1* gene in VAT was lower in women with T2D/IGT than those with NGT, iv) VAT *COL18A1* gene expression was associated with better HDL levels and tolerance glucose. These results showed that the expression of genes involved in adipogenesis and inflammation differs in distinct WAT deposits and the expression of these genes were correlated with the metabolic parameters in obese individuals. This work contributes to a better understanding of the expression of genes related to these biological processes in SAT and VAT of patients with severe obesity.

Keywords: Obesity, Diabetes, Wnt/ β -catenin signaling, Adipogenesis, Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Locos gênicos associados aos tipos de obesidade.....	23
Figura 2 - Genes associados com medidas antropométricas relacionadas à obesidade comum e seus respectivos locos.	27
Figura 3 - Principais diferenças na distribuição de gordura corporal entre os sexos.	29
Figura 4 - Prevalência do excesso de peso e obesidade na população adulta brasileira com 20 anos ou mais de idade, por sexo, entre os anos de 1974-1975 a 2008-2009	30
Figura 5 - Estrutura do adipócito unilocular (A) e do tecido adiposo branco (B)	34
Figura 6 - Esquema simplificado da síntese e degradação de triglicerídios nos adipócitos	37
Figura 7 - Localização anatômica dos maiores depósitos de tecido adiposo branco visceral e subcutâneo.....	40
Figura 8 - Expansão do tecido adiposo branco como um fator importante na prevenção de lipotoxicidade e complicações metabólicas associadas.	46
Figura 9 - Modelo mostrando a contribuição do tecido adiposo subcutâneo da região glúteo-femoral como um possível protetor metabólico	47
Figura 10 - Expansão saudável e inapropriada do tecido adiposo branco	48
Figura 11 - Uma visão geral dos estágios de diferenciação dos adipócitos.	54
Figura 12 - A via canônica WNT regula o direcionamento do comprometimento das células tronco-mesenquimais	55
Figura 13 - Um esquema geral das vias canônica (à esquerda) e não canônica (à direita) da sinalização Wnt	57

LISTA DE SIGLAS

AT	Tecido adiposo (do inglês adipose tissue)
ADA	American Diabetes Association
ADIPOQ	Adiponectin
AgRP	Proteína relacionada ao Agouti (do inglês Agouti related protein)
APC	Polipose adenomatose de colo (do inglês Adenomatous Polyposis Coli)
CART	Transcritos relacionados à cocaína e anfetamina (do inglês Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
CEBPA	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT alfa (do inglês CCAAT/enhancer binding protein alpha)
CEBPB	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT beta (do inglês CCAAT/enhancer binding protein beta)
CEBPD	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT gama (do inglês CCAAT/enhancer binding protein delta)
CEBPG	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT gama (do inglês CCAAT/enhancer binding protein gamma)
CK1 α	Caseína-quinase 1 α (do inglês Protein kinase 1 α)
COL18A1	Colágeno tipo XVIII, Alfa 1 (do inglês Collagen type XVIII, Alpha 1)
Dkk	Dickkopf
Dsh	Dishevelled
ECM	Matriz extracelular (do inglês Extracellular Matrix)
FZD	Frizzled motif domain
GSK3 β	Glicogênio-sintase-quinase 3 β (do inglês Glycogen synthase kinase 3 beta)
GWAS	Estudos de associação genômica (do inglês Genome-Wide Association Study)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de Massa Corporal
LRP5/6	Co-receptores relacionados com o receptor LDL 5 e 6 (do inglês Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6)
LPL	Lipase lipoproteica
NPY	Neuropeptídeo Y
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPARG	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (do inglês Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PWS	Síndrome de Prader-Willi (do inglês Prader-Willi Syndrome)
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (do inglês quantitative Polymerase Chain Reaction)
SAT	Tecido adiposo subcutâneo (do inglês Subcutaneous adipose tissue)
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SUS	Sistema Único de Saúde
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2 (do inglês Type 2 diabetes mellitus)
VEGFA	Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (do inglês Vascular Endothelial Growth Factor A)
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa (do inglês Very Low Density Lipoprotein)
VAT	Tecido adiposo visceral (do inglês Visceral adipose tissue)
TCF/LEF	T cell factor/lymphocyte enhancer factor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês Tumor Necrosis Factor α)
WAT	Tecido adiposo branco (do inglês white adipose tissue)
WNT	Wingless-type
WIF	Fator inibidor de Wnt (do inglês WNT inhibitory factor)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO GERAL	20
2.1 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 A OBESIDADE	21
3.1.1 Aspectos genéticos da obesidade	22
3.1.1.1 Obesidade monogênica	23
3.1.1.2 Obesidade sindrômica	25
3.1.1.3 Obesidade multifatorial	26
3.1.2 Epidemiologia da obesidade	28
3.1.2.1 As comorbidades associadas à obesidade	31
3.1.2.1.1 O diabetes mellitus tipo 2	31
3.2 A O TECIDO ADIPOSEO BRANCO	34
3.2.1 Células e matriz extracelular do tecido adiposo branco	34
3.2.2 As funções do tecido adiposo branco	36
3.2.3 Os diferentes depósitos de tecido adiposo branco	39
3.2.3.1 Os perfis de expressão gênica do VAT e SAT	42
3.2.4 A disfunção do tecido adiposo branco na obesidade	44
3.2.4.1 A expansão do tecido adiposo branco	45
3.2.5 A adipogênese	52
3.2.5.1 A sinalização WNT	55
REFERÊNCIAS	60
4 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE	73
4.1 CAPÍTULO 1 Expression analysis of <i>SFRP1</i> and <i>CEBPA</i> in adipose tissue of obese subjects with alteration in glucose tolerance	73
4.2 CAPÍTULO 2 COL18A1 expression in visceral adipose tissue: Better clinical outcomes in women with severe obesity?	93
4.3 CAPÍTULO 3 Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: The same impact on IL-6 and TNF α . Prospective Clinical Trial	115
4.4 CAPÍTULO 4 A expressão do gene VEGFA é reduzida em tecido adiposo subcutâneo de mulheres com obesidade grave e alterações na tolerância à glicose	126
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	140

ANEXO 1 Aprovação do Comitê de Ética	142
ANEXO 2 Protocolo de avaliação clínica	143

1 INTRODUÇÃO

A obesidade surge como uma consequência de um desequilíbrio energético gerado entre as calorias consumidas e as calorias gastas pelo organismo, sendo caracterizada pelo o acúmulo excessivo de gordura que prejudica a saúde do indivíduo. Dependendo da etiologia, essa doença pode ser classificada em monogênica, sindrômica ou multifatorial, sendo o último o mais frequente na população em geral e conhecido como obesidade comum (WHO, 2012a).

A prevalência da obesidade na população mundial está aumentando rapidamente e alcançando proporções epidêmicas na maioria dos países. No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009) mostrou que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres estavam obesos. O excesso de peso é um fator de risco para várias doenças crônicas de alta morbi-mortalidade, tais como as doenças cardiovasculares e o diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), que em 2008 foram responsáveis por 63% do total de óbitos do mundo por causas naturais (WHO, 2012a). Neste contexto, torna-se indispensável o esclarecimento da fisiopatologia da obesidade e suas comorbidades.

Na última década, o tecido adiposo branco (WAT) foi classificado como um órgão endócrino, pois expressa e secreta uma variedade de adipocinas que atuam de forma local (autócrina/parácrina) e sistêmica (endócrina), por exemplo, adiponectina (ADIPOQ), leptina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), *secreted frizzled-related protein 1* (SFRP1). Além das adipocinas, o WAT também expressa receptores nucleares, por exemplo, o receptor de estrogênio alfa e o receptor de vitamina D, e os receptores de catecolaminas, tais como os adrenoreceptores beta e alfa. Assim, esse tecido está envolvido em uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético e o controle dos sistemas neuroendócrino e imunológico (HAJER, HAEFTEN, VISSEREN, 2008; KERSHAW, FLIER, 2004), sendo essencial para a homeostase metabólica.

O WAT é composto principalmente por adipócitos, além de células estromais, por exemplo, células endoteliais, fibroblastos, leucócitos, macrófagos e células-tronco mesenquimais. Tanto os adipócitos, quanto as células estromais sintetizam as moléculas da matriz extracelular (ECM), como a proteoglicana colágeno XVIII (COL18A1) que é um dos principais componentes da lâmina basal, indispensável para diversos processos celulares, incluindo a angiogênese, proliferação, migração e diferenciação celular (NIEMELÄ et al., 2008). O remodelamento da ECM tem sido implicado na obesidade e evidências mostraram que o *COL18A1* está envolvido na adipogênese em humanos (ERRERA et al., 2008)

Os dois principais depósitos de WAT são o subcutâneo (SAT) e o visceral (VAT), que são biologicamente distintos, conseqüentemente, causam diferentes efeitos biológicos sobre o desenvolvimento de doenças (LEMIEUX, 2004; DESPRÉS, LEMIEUX, 2006). Diversos estudos mostraram que as diferenças regionais de expressão gênica entre SAT e VAT, tanto em indivíduos magros quanto obesos, podem refletir em diferenças funcionais entre esses depósitos.

Existem algumas hipóteses relacionadas à disfunção do WAT que sugerem as causas das alterações metabólicas, principalmente a da resistência à insulina, observadas na obesidade: 1) a hipótese das adipocinas; 2) a hipótese da inflamação e 3) a hipótese de expansão do WAT. Em relação à última hipótese, a expansão exorbitante do WAT que ocorre na obesidade é dependente da angiogênese, sendo que o fator de crescimento endotelial A (VEGFA) é essencial nesse processo de vascularização (CAO, 2007; FOLKMAN, 2006). Evidências indicam que a hipóxia é o principal fator indutor da expressão do VEGFA (TRAYHURN, WANG, WOOD, 2008) e, quando esse processo ocorre no WAT de indivíduos com excesso de peso (VIRTANEN et al., 2002; KABON et al., 2004; FLEISCHMANN et al., 2005), decorrente da expansão máxima do WAT, pode constituir a base fundamental da disfunção desse tecido.

Na maioria das vezes, a obesidade causa lipotoxicidade, hipóxia, acúmulo de células inflamatórias, expansão máxima do WAT, além do acúmulo de gordura em VAT, ou seja, as características de todas as hipóteses, portanto é difícil isolar a contribuição de cada uma para o surgimento das comorbidades. No entanto, a hipótese da

expansão, bastante investigada nos últimos anos, parece ser a que abrange melhor as principais modificações no WAT que explicam o surgimento das doenças associadas à obesidade.

A hipertrofia e hiperplasia do WAT são os principais processos que contribuem para a expansão desse tecido (RUTKOWSKI, DAVIS, SCHERER, 2009). A expansão máxima do WAT, caracterizada por adipócitos hipertróficos que são relacionados a um maior risco cardiometabólico, promove a disfunção do WAT, ao passo que a hiperplasia está relacionada a um perfil metabólico e distribuição de gordura corporal melhores (LEMIEUX, 2004). Evidências indicam que se o WAT de um indivíduo expandir, mantendo a sua funcionalidade para armazenar gordura de forma eficiente e adequada, esse sujeito permanecerá metabolicamente saudável, mesmo que se torne obeso (KARELIS, BROCHU, RABASA-LHORET, 2004; TAN, VIDAL-PUIG, 2008).

O esclarecimento sobre o processo da adipogênese é importante, pois a hiperplasia do WAT parece contribuir para um melhor perfil metabólico (ARNER et al., 2010; VEILLEUX et al., 2011) e a disfunção desse tecido parece estar associada à incapacidade de produzir novas células adiposas (ARNER et al., 2010). Nessa perspectiva, a via *wingless-type* (WNT) canônica é de crucial importância, visto que é considerada uma das vias mais importantes para o processo de adipogênese e pode relacionar a obesidade a alguns tipos de câncer (LIU et al., 2012), bem como ao diabetes (LAUDES et al., 2011).

As proteínas ligantes ao amplificador CCAAT alfa (*CEBPA*) e o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPARG*), principais fatores de transcrição da adipogênese, estimulam a expressão de genes codificantes de proteínas que caracterizam as células adiposas. A ativação da via WNT canônica bloqueia a indução dos *CEBPA* e *PPARG*, inibindo a diferenciação dos adipócitos (ROSEN, MACDOUGALD, 2000; CHRISTODOULIDES et al., 2009; LOWE, O'RAHILLY, ROCHFORD, 2011). Essa via pode ser modulada por antagonistas extracelulares, por exemplo, a proteína sFRP1 (LAGATHU et al., 2010), bem como pela endostatina e *frizzled motif domain* (FZC18), ambos fragmentos peptídicos provenientes da clivagem proteolítica do COL18A1 (HANAI et al., 2002; QUÉLARD et al., 2008).

A sinalização WNT é fundamental para os processos de adipogênese e inflamação, por meio da interação entre adipócitos e células inflamatórias no WAT de pacientes com obesidade e T2DM (BILKOVSKI et al., 2011). A hipótese deste trabalho é que alteração na expressão dos genes envolvidos na sinalização WNT, relacionada aos processos de adipogênese e inflamação, está associada às alterações metabólicas observadas em indivíduos com obesidade.

2 OBJETIVO GERAL

Uma vez que as alterações na expressão gênica nos diferentes depósitos de WAT e a expansão máxima desse tecido parecem contribuir para a fisiopatologia da obesidade e suas comorbidades, o objetivo deste estudo foi verificar se a expressão dos genes envolvidos na adipogênese (*CEBPA*, *PPARG*, *SFRP1*, *COL18A1*, *VEGFA*) e na inflamação (*ADIPOQ*, *IL-6* e *TNF- α*), nos depósitos SAT e VAT de mulheres com obesidade grave, está associada aos parâmetros bioquímicos, antropométricos e de composição corporal das pacientes.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Verificar se há diferença na expressão dos genes entre SAT e VAT e se há correlação de expressão entre os genes estudados;
- 2) Verificar se a expressão dos genes é diferente entre mulheres com tolerância alterada à glicose e aquelas com tolerância normal à glicose;
- 3) Verificar se há correlação entre a expressão dos genes e os parâmetros clínicos das mulheres com tolerância normal à glicose e aquelas com tolerância alterada à glicose;
- 4) Verificar se os níveis séricos de IL-6 e TNF- α são correlacionados à expressão tecidual dos respectivos genes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A OBESIDADE

A obesidade é causada por perturbações do equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, regulado por um sistema fisiológico complexo, que requer a integração de vários sinais periféricos e centrais coordenados pelo cérebro (BELL, WALLEY, FROGUEL, 2005). De forma geral, os principais mecanismos da regulação neuroendócrina desse sistema estão descritos adiante.

O hipotálamo funciona como um regulador central nesse sistema, pois recebe informações sobre o equilíbrio de energia através de sinais neuronais e hormonais (XU et al., 2003). Os neurônios do núcleo arqueado – um dos grupamentos de células neuronais do hipotálamo – são fundamentais nesse sistema e são divididos em dois conjuntos: um conjunto produz a proteína relacionada ao Agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), ao passo que o outro produz pró-opiomelanocortina (POMC) e transcritos relacionados à cocaína e anfetamina (CART). Os AgRP e NPY são orexígenos, promovendo a ingestão de alimentos e reduzindo o gasto de energia, enquanto os POMC e CART são anorexígenos (BARSH et al., 2002).

Alguns hormônios exercem importante função no controle desse sistema. A insulina tem um efeito anorexígeno, através da estimulação de neurônios POMC/CART e inibição de neurônios AgRP/NPY. A leptina é um hormônio anorexígeno, que parece ser o principal indicador do estado de nutrição, e a grelina um hormônio orexígeno, que aumenta seus níveis séricos antes de comer e diminui depois das refeições. Um outro mediador, o peptídeo YY₃₋₃₆, é secretado pelo intestino durante a ingestão de nutrientes, ocasionando a diminuição do consumo de alimentos (BELL, WALLEY, FROGUEL, 2005).

O núcleo arqueado central processa os diferentes sinais de entrada e exerce seus efeitos, sinalizando para vários neurônios efetores a jusante, modulando os neurônios efetores orexígenos e anorexígenos. Os sistemas de sinalização da dopamina, serotonina e endocanabinóide também contribuem para esse sistema

regulatório (BELL, WALLEY, FROGUEL, 2005), que é uma proteção importante contra a perda de peso, entretanto, para o aumento da adiposidade, esses mecanismos são insuficientes (SCHWARTZ et al., 2003). Falhas nesse sistema de controle de ingestão e gasto de energia podem causar a obesidade, que é definida como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que prejudica a saúde do indivíduo (WHO, 2012a).

3.1.1 Aspectos genéticos da obesidade

A obesidade é classificada, dependendo da etiologia, em 1) monogênica (indivíduos com obesidade grave, sem atrasos no desenvolvimento), 2) sindrômica (indivíduos com obesidade e retardo mental, características dismórficas e anomalias congênitas em órgãos específicos) e 3) comum (afeta a população em geral). A Figura 1 mostra a localização de genes relacionados aos diferentes tipos de obesidade.

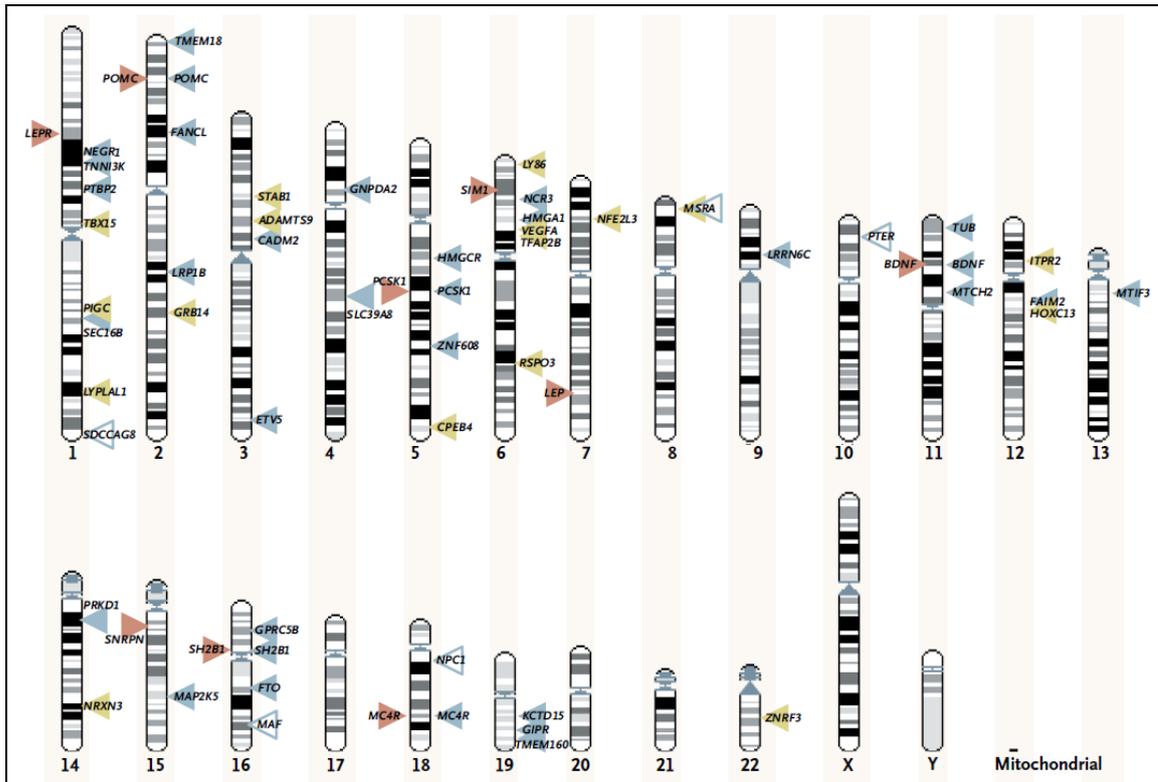


Figura 1 Locos gênicos associados aos tipos de obesidade. Genes causadores de obesidades monogênicas e sindrômicas (triângulos vermelhos) são mostrados à esquerda. Variantes associadas ao índice de massa corporal (IMC) ou à obesidade comum são mostrados à direita: locos implicados no IMC ou alteração de peso (triângulos azuis sólidos), locos identificados em estudos de caso-controle sobre obesidade extrema (triângulos azuis abertos) e variantes identificadas principalmente por causa de sua associação com a circunferência da cintura ou a relação cintura-quadril (triângulos verdes sólidos). Para a maioria das variantes associadas ao IMC ou à obesidade comum, ainda não é esclarecido se esses são os genes responsáveis pela associação.
Fonte: Mccarthy, 2010.

3.1.1.1 Obesidade monogênica

Um dos modelos animais mais importantes para o estudo da obesidade foi descoberto ao acaso, em 1949. Pesquisadores encontraram camundongos obesos e nomearam o gene mutado, que causava a obesidade, como *obese gene* (*ob*). Nesses animais, a obesidade era uma herança autossômica recessiva, não havia diferença ao nascimento entre as ninhadas mutante e controle, mas os camundongos *ob/ob* ganhavam peso rapidamente por toda a vida, podendo alcançar

um peso três vezes maior do que o camundongo controle (INGALLS, DICKIE, SNELL, 1950).

Somente em 1994, Zhang e colaboradores descobriram uma mutação no gene da leptina como responsável pelo fenótipo observado nos camundongos *ob/ob*. A deleção de uma base, na região codificante do gene da leptina, resulta em uma mudança de matriz de leitura e, assim, um códon de parada antecipado. A leptina é um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos, com função importante no controle do apetite e no gasto energético (JÉQUIER, 2002), atuando principalmente no sistema nervoso central (BELL, WALLEY, FROGUEL, 2005). Assim, camundongos *ob/ob* exibem falta de saciedade alimentar, com consequente supernutrição crônica, o que resulta na obesidade e suas comorbidades, como T2DM e a resistência à insulina. Outros modelos animais de obesidade monogênica foram identificados, como o camundongo *Lethal Yellow Mutant* e o rato *Zucker Fatty* (KANASAKI, KOYA, 2011).

As descobertas em animais foram rapidamente seguidas pela identificação de formas raras de obesidade monogênica em humanos, causadas por mutações em genes que levam a um fenótipo de consumo excessivo de energia em relação ao gasto de energia, por exemplo, a leptina (MONTAGUE et al., 1997), o receptor de leptina (CLEMENT et al. 1998), POMC (KRUDE et al., 1998) e o MCR4 (VAISSE C, et al., 1998; YEO et al., 1998), entre outros.

A primeira mutação gênica causadora de obesidade monogênica em humanos foi relatada pela primeira vez por Montague e colaboradores em 1997. O grupo identificou dois primos de origem paquistanesa homocigotos para uma mutação que causava mudança na matriz de leitura do gene da leptina, resultando em uma proteína truncada, que não era secretada pelas células. As crianças, que tinham peso normal ao nascimento, desenvolveram precocemente uma obesidade extrema relacionada à hiperfagia. O mesmo grupo, em 2002, relatou que reposição diária de leptina injetável produzia um efeito benéfico extraordinário na redução de peso e massa de gordura em crianças com deficiência congênita de leptina (FAROOQI et al., 2002).

Os estudos em roedores obesos foram muito importantes para melhorar o entendimento da obesidade humana, pois permitiram identificar que 1) genes que influenciam no fenótipo da obesidade, 2) mutações herdadas em alguns genes podem ser responsáveis pela obesidade monogênica, 3) essas mutações perturbam os mecanismos que regulam a ingestão de alimentos ou gasto energético e 4) é possível o uso de terapia racional em alguns casos de obesidade (FAROOQI, O'RAHILLY, 2004).

3.1.1.2 Obesidade sindrômica

Diversas síndromes raras, que são causadas por defeitos gênicos - tanto autossômicos quanto ligados ao X - cromossômicos e/ou epigenéticos, caracterizam-se pela obesidade, sendo o retardo mental uma particularidade. É difícil determinar a origem da obesidade em indivíduos com essas síndromes, entretanto, pelo menos quatro parecem compartilhar a hiperfagia e/ou disfunção hipotalâmica, indicando uma origem ao nível do sistema nervoso central (BELL, WALLEY, FROGUEL, 2005). Dentre os principais casos estão a Síndrome de Prader-Willi (PWS), a Síndrome de Bardet-Biedl, a Síndrome de Cohen e a Síndrome de Wilson-Turner (LIU et al., 2003), sendo a síndrome de a forma mais conhecida, com frequência de 1 em 25.000 nascimentos.

A PWS é uma condição genética caracterizada pelo início precoce da obesidade resultante da hiperfagia, atividade fetal diminuída, hipotonia muscular, retardo mental, baixa estatura e hipogonadismo hipogonadotrófico. Frequentemente, a PWS é causada por uma deleção herdada paternalmente na região cromossômica 15q11.2–q12, menos comumente por uma dissomia materna uniparental e, raramente, por defeito no mecanismo de *imprinting* genômico no cromossomo 15 (BUTLER, 2009). A causa de hiperfagia nessa síndrome ainda não está esclarecida, no entanto, evidências sugeriram que a produção elevada de grelina, observada nas células estomacais desses pacientes, pode aumentar o apetite, atuando no sistema nervoso central (CUMMINGS et al., 2002).

Os estudos que objetivam identificar variantes causadoras da obesidade monogênica e sindrômica têm sido esclarecedores, pois esses tipos de obesidade apresentam alta penetrância e etiologia menos complexa que a obesidade comum.

3.1.1.3 Obesidade multifatorial

A teoria de James V. Neel, em 1962, descreve a hipótese do "gene poupador", em que genes que predispõem à obesidade teriam uma vantagem seletiva em populações que no passado frequentemente passavam por períodos de inanição. No ambiente "obesogênico" atual, caracterizado pelo aumento da ingestão de alimentos altamente calóricos e o sedentarismo, pessoas que possuem esses genes tornam-se facilmente obesas (MCALLISTER et al., 2009; RAYNE et al., 2010).

Somente em 1977, a importância da genética na obesidade comum começou a ser esclarecida, quando Feinleib e colaboradores observaram, pela primeira vez, que a agregação familiar para a obesidade era mais devido aos fatores genéticos que aos ambientais. Em 1990, Stunkard e colaboradores - com uma amostra constituída de 93 pares de gêmeos idênticos criados separados, 154 criados juntos, 218 pares de gêmeos fraternos criados separados e 208 criados juntos - observaram que o coeficiente de herdabilidade do índice de massa corporal (IMC) para mulheres foi de 0,66 e para homens 0,70, ou seja, o IMC é uma característica fortemente influenciada pelos genes.

Bouchard e colaboradores (1990) analisaram 12 pares de gêmeos idênticos oferecendo uma dieta com excesso de calorias. Durante todo o estudo, os participantes permaneceram no ambiente hospitalar com atividade física controlada, mantendo um estado de sedentarismo. Os autores notaram uma enorme semelhança na resposta à supernutrição - em relação ao peso, porcentagem de gordura, massa de gordura e estimativa de gordura subcutânea - entre um gêmeo e seu par. Já entre os diferentes pares de gêmeos, foi observada uma variação três vezes maior nessa resposta que entre o gêmeo e seu par. O estudo concluiu que a semelhança na adaptação à supernutrição dos intrapares de gêmeos é devido aos

fatores genéticos envolvidos nesse fenômeno. Desde então, outros estudos foram realizados e indicaram alta herdabilidade da obesidade comum.

A obesidade comum é uma condição poligênica, ou seja, depende da interação de múltiplos genes, e também do ambiente, sendo classificada como uma doença multifatorial. Esses genes interagem de modo que cada um deles contribui moderadamente para um efeito metabólico maior, resultando na obesidade (LOOS, BOUCHARD, 2003).

A identificação de genes envolvidos na obesidade multifatorial baseia-se em diferentes estratégias de estudo. Várias abordagens, incluindo a estratégia do Gene Candidato e Estudos de associação genômica (GWAS), têm sido frequentemente utilizadas na procura por genes associados à obesidade (LIU et al., 2003). De forma geral, muitos genes relatados podem ser classificados em duas grandes categorias: os genes que afetam as funções do sistema nervoso central e os que atuam periféricamente, muitas vezes através do tecido adiposo (AT). A Figura 2 sumariza alguns genes associados com medidas antropométricas relacionadas à obesidade comum e seus respectivos locos.

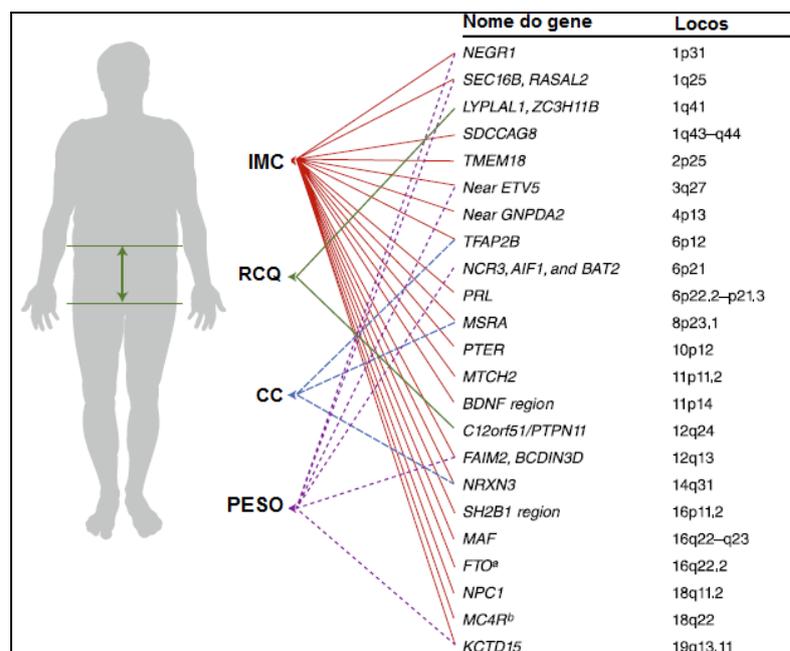


Figura 2 Genes associados com medidas antropométricas relacionadas à obesidade comum e seus respectivos locos. IMC: índice de massa corporal. RCQ: Razão cintura quadril. CC: Circunferência da cintura. ^aIndica associação com diabetes mellitus tipo 2. ^b Indica associação com obesidade monogênica. Fonte: Herrera, Lindgren, 2010.

3.1.2 Epidemiologia da obesidade

O IMC é a técnica mais amplamente utilizada para avaliar a obesidade em estudos epidemiológicos, por basear-se apenas em dados antropométricos, ser de simples aplicação e de baixo custo. O peso em adultos é comumente classificado através deste índice, que é definido como o peso da pessoa em quilos dividido pelo quadrado da sua altura em metros (kg/m^2). Indivíduos com IMC igual ou maior que 25 estão com excesso de peso, sendo que aqueles com IMC igual ou maior que 30 são classificados como obesos. De acordo com o valor de IMC, a obesidade pode ser classificada em grau I, grau II e grau III (ou grave) e está relacionada ao risco de surgimento de comorbidades, como o T2DM e doenças cardiovasculares (WHO, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1 Classificação do excesso de peso em adultos pelo IMC.

Classificação	IMC	Risco de comorbidades
Baixo Peso	< 18.5	Baixo (mas com alto risco para outros problemas clínicos)
Varição Normal	18.5 - 24.99	Médio
Excesso de Peso	≥ 25.0	
Sobrepeso	25.0 - 29.99	Aumentado
Obesidade Grau I	30.0 - 34.99	Moderado
Obesidade Grau II	35.0 - 39.99	Alto
Obesidade Grau III	≥ 40.0	Muito Alto

IMC: índice de massa corporal.

Fonte: WHO (adaptado).

A circunferência da cintura e a relação cintura-quadril são medidas utilizadas para identificar o acúmulo de gordura regional: a obesidade abdominal (androide, conhecida como “maçã”) ou a inferior (ginóide, conhecida como “pêra”, caracterizada pela deposição de gordura em torno dos quadris, coxas e nádegas) (Figura 3). Apesar de homens e mulheres poderem apresentar os dois tipos de distribuição corporal de gordura, o padrão androide é mais comumente encontrado nos homens, enquanto o padrão ginóide é o mais frequente entre as mulheres. O padrão de distribuição corporal é uma observação importante, pois a obesidade abdominal está relacionada ao aumento do risco de doenças, principalmente, as cardiovasculares

(VAGUE, 1947; KARASTERGIOU et al., 2012). No entanto, o surgimento de comorbidades pode acontecer tanto na obesidade androide quanto na ginóide, dependendo do grau de obesidade apresentado e de cada indivíduo.

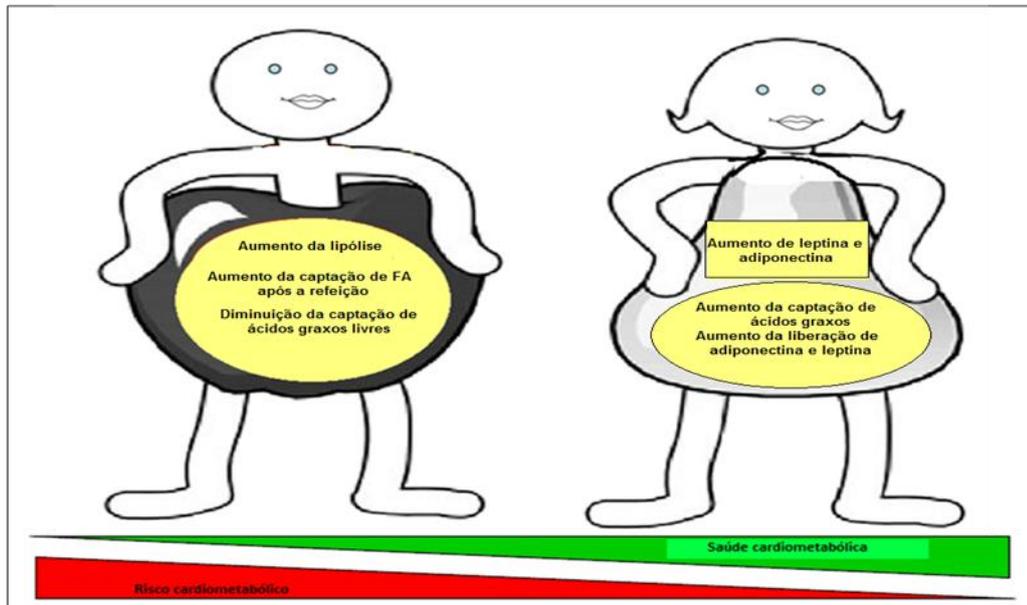


Figura 3 Principais diferenças na distribuição de gordura corporal entre os sexos. FA ácidos graxos livres.

Fonte: Karastergiou et al., 2012 (adaptado).

Entre 1980 e 2008, a obesidade mais que dobrou em todo o mundo, aumentando a prevalência dessa enfermidade em vários países, alcançando mais de 10% da população mundial. O excesso de peso ocupa a quinta posição como fator de risco para a mortalidade, sendo que cerca de 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado do sobrepeso/obesidade (WHO, 2012a).

A Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostrou que em 2008-2009 mais da metade dos brasileiros apresentavam excesso de peso. Entre os homens, 12,5% eram obesos - representando 25% dos casos de excesso de peso - e entre as mulheres 16,9% eram obesas - representando 33,33% dos casos de excesso de peso. Essa pesquisa também verificou um aumento continuado de excesso de peso e obesidade na população brasileira adulta a partir de 20 anos desde 1974-1975 até 2008-2009, como mostra a Figura 4.

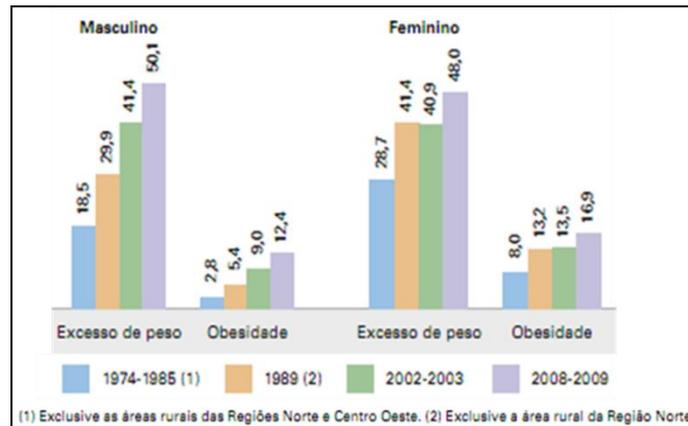


Figura 4 Prevalência do excesso de peso e obesidade na população adulta brasileira com 20 anos ou mais de idade, por sexo, entre os anos de 1974-1975 a 2008-2009.

Fonte: Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (adaptado).

O aumento acelerado do excesso de peso entre os brasileiros conduz a um cenário preocupante: acredita-se que atualmente o sobrepeso alcance cerca de 65% da população brasileira, percentual idêntico ao encontrado na população dos Estados Unidos. A WHO estima que no Brasil, em 2015, a prevalência da obesidade alcançará 39,7% das mulheres e 21,6% dos homens com idade superior a 30 anos (WHO, 2012a).

Segundo o Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não transmissíveis: Brasil (2003), a realidade capixaba segue a tendência brasileira. Nos anos de 2002-2003, a prevalência de sobrepeso na população de Vitória era de 29,2% e de obesidade era de 8,2%. Essa pesquisa mostrou ainda que a prevalência de excesso de peso em homens e mulheres capixabas correspondeu a 44% e 32%, respectivamente.

A mudança no estilo de vida da população mundial, caracterizada por uma diminuição da atividade física, devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, aos novos modos de transporte e à urbanização crescente (WHO, 2012a), contribui fortemente para o aumento do excesso de peso. Esse fato explica a prevalência elevada da obesidade em países com renda alta, e o rápido aumento dessa doença nos países em desenvolvimento.

3.1.2.1 As comorbidades associadas à obesidade

O excesso de peso é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como as doenças cardiovasculares, T2DM, asma, dislipidemias e alguns tipos de câncer, que contribuem fortemente tanto para os anos de vida perdidos por morte prematura, quanto para os anos de vida com incapacitação. Estima-se que o excesso de peso contribua significativamente para o desenvolvimento das principais doenças crônicas: em 44% para o desenvolvimento do T2DM, 23% para a cardiopatia isquêmica e entre 7% a 41% para o câncer (WHO, 2012a). Além disso, a obesidade produz discriminação, preconceito e exclusão social (FELIPPE et al, 2003) e também foi relacionada aos transtornos psiquiátricos, principalmente à depressão (DOBROW et al, 2002).

A obesidade representa, assim, um grave problema de saúde pública, além de causar gastos ao sistema de saúde. No Brasil, as doenças crônicas representam uma grande parcela das despesas com assistência hospitalar no SUS e no Setor Suplementar. O Ministério da Saúde, no ano de 2005, estimou que cerca de R\$3,8 bilhões foram gastos em cuidados ambulatoriais e R\$3,7 bilhões em internação, totalizando aproximados R\$7,5 bilhões/ano em gastos com DOENÇAS CRÔNICAS.

3.1.2.1.1 O diabetes mellitus tipo 2

O T2DM é uma das doenças crônicas mais frequentes no mundo, sendo a quarta causa de morte nos países com renda alta e alcançando números epidêmicos em países com renda média e baixa. Em 2011, o Brasil ocupou a quinta posição entre os países com maior número de indivíduos com T2DM (aproximadamente 12,4 milhões de adultos na população entre 20-79 anos) (IDF, 2012).

Por ser classificada como uma doença multifatorial na maior parte das famílias, além dos fatores genéticos, os fatores ambientais são essenciais para o surgimento dessa doença, sendo a obesidade, seguida do envelhecimento, os principais fatores de

risco para o desenvolvimento do T2DM. A glicemia de jejum alterada e a tolerância diminuída à glicose também são consideradas fatores de risco importantes para essa doença, uma vez que são reconhecidos como estados de transição entre a normalidade e o T2DM (IDF, 2012).

Devido ao aumento da demanda de insulina, ocasionada pela resistência periférica a esse hormônio, as ilhotas pancreáticas aumentam a massa de células β pancreáticas, bem como sua capacidade secretora (CHANG-CHEN et al. 2008). Em longo prazo, em alguns indivíduos, essa adaptação pode não ser preservada, devido a uma falha da capacidade das células β secretoras (KAHN, 1998). As principais anormalidades nas ilhotas do pâncreas, que ocasionam o T2DM, são a redução da massa de células β e o funcionamento ineficaz dessas células (FLOREZ, 2008; VOIGHT et al., 2010). Assim, a resistência à insulina, juntamente com a insuficiência das células β pancreáticas em secretar insulina, são eventos iniciais da fisiopatologia do T2DM, que é caracterizado por níveis crônicos de hiperglicemia (LEAHY et al. 2010).

Evidências mostraram que quanto mais avançado o estado de intolerância à glicose, mais grave é a disfunção endotelial (CABALLERO et al., 1999). A exposição do endotélio à hiperglicemia e aos níveis elevados de ácidos graxos livres, característicos do T2DM e estados de resistência à insulina, ocasiona a produção de superóxido, que reage com o NO - molécula vasodilatadora produzida a partir do metabolismo da L-arginina pela NO sintase endotelial (eNOS) - reduzindo a biodisponibilidade dessa substância (BAHIA et al., 2006; SCHAIANE; SILVA, IRIGOYEN, 2010), o que leva à disfunção endotelial (macro e microangiopatia), resultando em perda funcional e falência de múltiplos órgãos, principalmente dos rins, olhos e coração (ADA, 2010).

Os mecanismos celulares que causam a disfunção das células β pancreáticas, devido ao aumento da resistência à insulina, ainda não estão totalmente esclarecidos. Algumas hipóteses têm sido sugeridas, como o estresse oxidativo, o estresse do retículo endoplasmático, a deposição de amilóide no pâncreas, deposição ectópica de lípidos no fígado, músculo e pâncreas, lipotoxicidade e glicotoxicidade (WEIR; BONNER-WEIR, 2004; PRENTKI, NOLAN, 2006; HULL et

al., 2004; HARDING, RON, 2002). Todos esses eventos podem ser relacionados à supernutrição crônica, desse modo, a maioria dos casos de resistência à insulina está associada à obesidade (MCCARTHY, 2010). Um evento que destaca a importância da relação entre o pâncreas e o WAT é que a resistência à insulina do WAT pode colaborar para a falha das células β pancreáticas (WEIR et al., 2001).

Uma vez que a obesidade contribui para diminuir a qualidade de vida de milhões de pessoas, além de ocasionar grande impacto econômico, torna-se indispensável o esclarecimento dos mecanismos que causam a obesidade e suas comorbidades, principalmente o T2DM.

3.2 O TECIDO ADIPOSEO BRANCO

Nas últimas décadas, devido ao aumento da prevalência de sobrepeso no mundo e à descoberta de que o WAT não atua somente como isolante térmico e mecânico, ou simplesmente como um depósito de armazenamento de energia, mas sim um órgão endócrino fundamental para o controle da homeostase metabólica (ZHANG, 1994; KERSHAW, FLIER, 2004), esse tecido passou a ser alvo de intensa investigação.

3.2.1 Células e matriz extracelular do tecido adiposo branco

O WAT é composto principalmente por adipócitos, que são células grandes esféricas uniloculares, envolvidas por uma ECM rica em colágeno, além de ser bastante vascularizado. Em adipócitos maduros, uma grande gotícula de gordura preenche quase todo o volume celular, sendo delimitada somente por uma monocamada lipídica reforçada por proteínas estruturais (OHSAKI et al., 2009). Outros componentes do WAT são as fibras nervosas e as células do estroma, como os pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, leucócitos e macrófagos, bem como células-tronco mesenquimais (Figura 5).

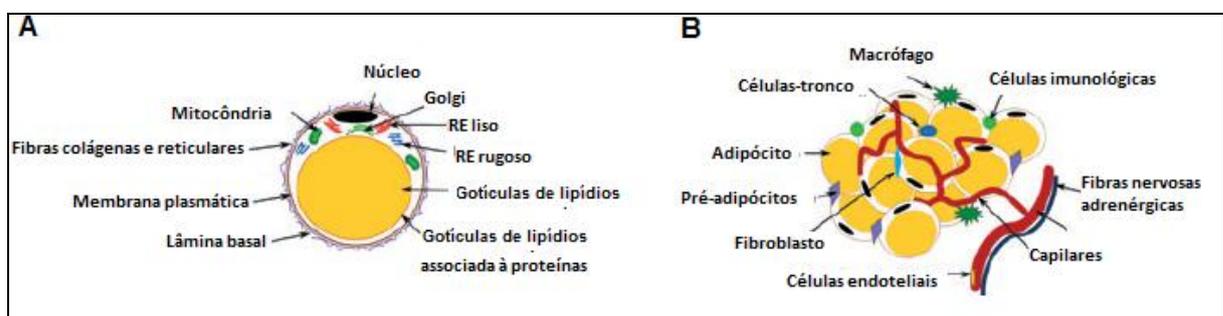


Figura 5 Estrutura do adipócito unilocular (A) e do tecido adiposo branco (B). RE: Retículo endoplasmático.

Fonte: Wronska, Kmiec, 2012 (adaptado).

O WAT é classificado histologicamente como um tipo especializado de tecido conjuntivo frouxo, assim, grande parte de sua massa não celular é devido aos componentes da ECM. Não somente as moléculas que compõem a ECM são diferentes entre os diversos tecidos, mas também a quantidade de cada constituinte, os quais fornecem um suporte estrutural e de fixação celular distintos para cada tecido (DIVOUX, CLÉMENT, 2011). Os adipócitos e as células estromais do WAT sintetizam as moléculas da ECM, sendo os constituintes principais as proteoglicanas e as proteínas fibrosas (MARIMAN, WANG, 2010) (Figura 9).

A lâmina basal, uma camada especializada da ECM, é formada por um complexo de proteínas que forma a base de todo o epitélio e é sintetizada por alguns tipos de células não epiteliais, tais como as células musculares lisas e os adipócitos. A sua composição e montagem varia de acordo com o estado fisiológico e/ou patofisiológico do tecido (LEBLEU, MACDONALD, KALLURI, 2007). A lâmina basal do WAT parece essencial para a sobrevivência dos adipócitos, pois essa estrutura protege a célula de impactos mecânicos que podem levar a ruptura da gotícula de gordura e morte celular. Com a ausência deste “esqueleto externo” a gotícula de gordura poderia ser facilmente rompida, uma vez que apenas uma monocamada de lipídios e proteínas forma o limite entre a gordura armazenada e o citosol (MARIMAN, WANG, 2010).

Um componente importante da lâmina basal é o COL18A1, uma proteoglicana não fibrilar, membro do subgrupo das multiplexinas (OH et al., 1994). A clivagem do COL18A1 resulta em fragmentos peptídicos, sendo os mais conhecidos a endostatina (O'REILLY et al., 1994) e o FZC18 (ELAMAA et al., 2003), que demonstraram ser ativos em vários processos celulares, incluindo a apoptose, proliferação e adipogênese (HANAI et al., 2002; QUÉLARD et al., 2008; MOMOTA et al., 2011; HENDAQUI et al., 2012).

Apesar de estudos em animais terem demonstrado que o *COL18A1* participa da diferenciação de adipócitos, além de ser um gene importante para o diabetes (INOUE-MURAYAMA et al., 2000; BROWN et al., 2005; BALWIERZ et al., 2009; BISHOP et al., 2010; KURKI et al., 2012), poucos estudos tem sido realizados em humanos. Errera e colaboradores (2008) observaram, em experimentos *in vitro*, que

o *COL18A1* é altamente expresso durante a diferenciação de adipócitos humanos. Além disso, o nosso grupo observou que o polimorfismo de nucleotídeo único c.1136C> T no domínio FZC18 está associado à obesidade em indivíduos com T2DM. No entanto, não há estudos sobre a expressão do *COL18A1* nos diferentes depósitos de WAT e sua correlação com parâmetros clínicos, principalmente, em indivíduos com obesidade e com tolerância normal à glicose.

3.2.2 As funções do tecido adiposo branco

O WAT é o maior reservatório de energia do organismo, sendo capaz de armazenar de maneira eficiente o excesso de calorias ingerido na alimentação. Os triglicerídios transportados na corrente sanguínea, por quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), sofrem ação da lipase lipoprotéica (LPL), liberando ácidos graxos e glicerol. A LPL é produzida nos adipócitos, secretada para as células endoteliais adjacentes e se encontra ancorada na face luminal do endotélio capilar de vários tecidos extra-hepáticos.

Os ácidos graxos liberados são captados pelos adipócitos, ativados a acil-coenzima A e transferidos ao glicerol. Um intermediário essencial para a reesterificação é o glicerol-3-fosfato, formado a partir do catabolismo da glicose na via glicolítica, pois os adipócitos não são capazes de fosforilar o glicerol endógeno, já que não possuem a respectiva quinase. Assim, as células adiposas precisam de glicose para que ocorra a biossíntese dos triglicerídios. Os triglicerídios armazenados são hidrolisados a ácidos graxos e glicerol, sofrendo ação das enzimas triacilglicerol lipase e lipase hormônio sensível (KARASTERGIOU et al., 2012) (Figura 6).

Os triglicerídios estão continuamente sendo hidrolisados e reesterificados no adipócito. O glicerol derivado da lipólise é liberado na corrente sanguínea e reutilizado no fígado. A maior parte dos ácidos graxos formados na lipólise será reesterificada se o glicerol-3-fosfato for abundante, como no período pós-prandial. Em contraste, se o glicerol-3-fosfato estiver escasso em virtude do baixo aporte de

glicose para os adipócitos, por exemplo, no jejum ou no T2DM, os ácidos graxos serão liberados na corrente sanguínea. Assim, a captação da glicose pelo adipócito é um importante determinante do destino dos ácidos graxos do adipócito, isto é, se eles serão liberados para o sangue ou reesterificados intracelularmente. A insulina é o principal estimulante da captação de glicose pelos adipócitos e, conseqüentemente, a lipogênese, enquanto as catecolaminas e o glucagon estimulam a lipólise (KARASTERGIOU et al., 2012).

A ECM do WAT também funciona como ancorador dos adipócitos, fornecendo pontos de ligação para receptores de superfície celular, além de ser uma fonte de fatores de sinalização que modulam uma variedade de processos de celulares, tais como angiogênese, proliferação, migração e diferenciação celular, bem como resposta imune (NIEMELÄ et al., 2008).

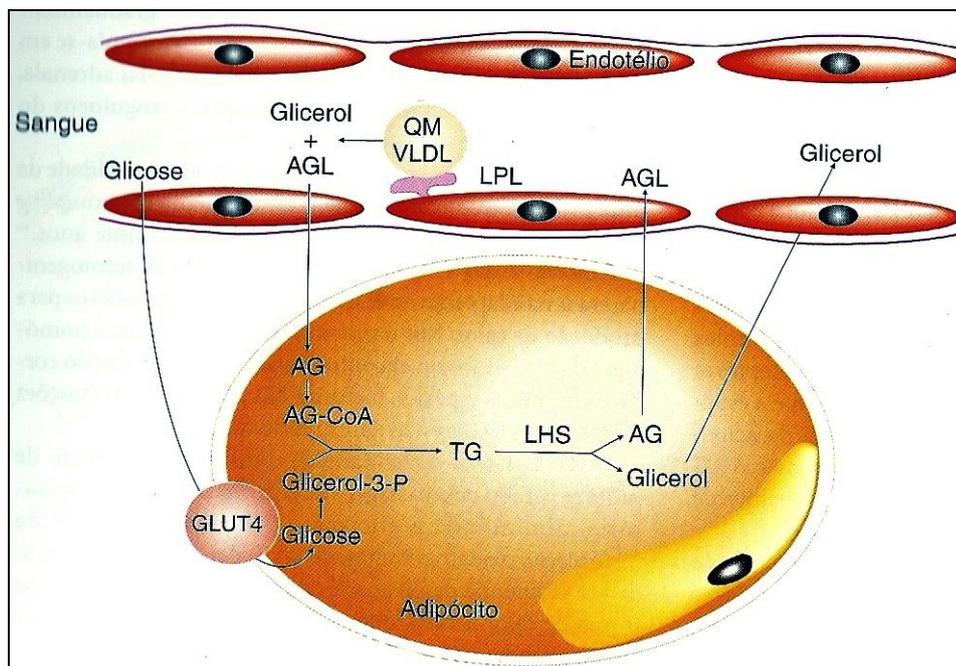


Figura 6 Esquema simplificado da síntese e degradação de triglicerídeos nos adipócitos. TG: Triglicerídeos. QM: Quilomícrons. VLDL: Lipoproteínas de densidade muito baixa. LPL: Lipase lipoprotéica. LHS: Lipase hormônio sensível. AG: Ácidos graxos. LHS: Lipase hormônio sensível.
Fonte: Carvalho, Collares-Buzato, 2005.

Um aspecto importante do WAT, é que esse tecido é considerado um órgão endócrino que expressa e secreta uma variedade de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, as quais possuem ação local (autócrina/parácrina) e sistêmica (endócrina). A Tabela 2 sumariza as principais adipocinas e suas funções.

Tabela 2 Exemplos de adipocinas produzidas no tecido adiposo branco.

Símbolo oficial	Nome completo	Funções principais
LEP	Leptina	Ingestão de alimentos
ADIPOQ	Adiponectina	Resistência à insulina, Anti – inflamatório
RETN	Resistina	Resistência à insulina, Inflamação
NAMPT	Visfatina	Resistência à insulina
ITLN1	Omentina	Resistência à insulina
SERPINA12	Serpina derivada do TA visceral	Resistência à insulina
APLN	Apelina	Vasodilatação
CETP	Proteína de transferência de colesterol éster	Metabolismo de lipídeos
LPL	Lipase lipoprotéica	Metabolismo de lipídeos
HSL	Lipase hormônio-sensível	Metabolismo de lipídeos
PLIN1	Perilipina	Metabolismo de lipídeos
RBP4	Proteína ligante de retinol 4	Metabolismo de lipídeos
ASP	Proteína estimulante de acilação	Metabolismo de lipídeos
AT II	Angiotensina II	Pressão sanguínea, pró-inflamatório
ACE	Enzima conversora de angiotensina	Pressão sanguínea
AGT	Angiotensinogênio sanguíneo	Pressão sanguínea
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa	Inflamação
IL-6	Interleucina 6	Inflamação
CRP	Proteína C reativa	Inflamação
Adipsina	Fator D do complemento	Inflamação
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1	Atração de macrófagos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1	Atração de macrófagos
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1	Fibrinólise

Fonte: Hajer, Haeften, Visseren, 2008 (adaptado).

Além das adipocinas, o WAT também expressa receptores que permitem ao tecido responder aos sinais provenientes dos diversos sistemas que interagem com o WAT (KERSHAW, FLIER, 2004) (Tabela 3).

Tabela 3 Exemplos de receptores expressos no tecido adiposo branco.

Tipos de receptores	Símbolo oficial	Nome completo
Receptores de hormônios endócrinos tradicionais	IRS1	Receptor de insulina
	GCGR	Receptor do glucagon
Receptores nucleares	GHR	Receptor do hormônio de crescimento
	TSHR	Receptor do hormônio estimulante da tireoide
	NR3C1	Receptor de glicocorticoide
	MED1	Receptor de vitamina D
	THR	Receptor de hormônio da tireoide
	PPARG	Receptor Ativado por proliferadores de peroxissoma Gama
	AR	Receptor de androgênios
	ESR	Receptor de estrogênio
	PGR	Receptor de progesterona
	Receptores de adipocinas	LEPR
IL6R		Receptor de interleucina 6
TNF- α R		Receptor de fator de necrose tumoral alfa
Receptores de catecolaminas	ADRB1, ADRB2, ADRB3	Adrenoreceptor beta 1, 2 e 3
	ADRA1, ADRA2	Adrenoreceptor alfa 1, 2 e 3

Fonte: Kershaw, Flier, 2004 (adaptado).

A expressão das adipocinas e dos receptores possibilita a participação do WAT em uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético e o controle dos sistemas neuroendócrino e imunológico.

3.2.3 Os diferentes depósitos de tecido adiposo branco

Desde o século passado, Vague (1947) notou que o padrão de distribuição da gordura corporal exercia efeitos sobre a saúde dos indivíduos. Ele observou que a obesidade androide era mais associada ao diabetes e a doenças cardiovasculares que a obesidade ginóide. Desde então, estudos mostraram que em humanos, o WAT apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica, e que os diferentes depósitos desse tecido exercem maior impacto sobre o

desenvolvimento e a progressão de doenças metabólicas do que a massa total de gordura (WAJCHENBERG et al., 2000; TCHERNOF A et al., 2006; DESPRÉS, LEMIEUX, 2006).

A distribuição corporal do WAT pode ser dividida em dois depósitos principais: subcutâneo (SAT) e visceral (VAT). O VAT envolve órgãos internos da cavidade abdominal e mediastino, enquanto o SAT consiste em uma camada de gordura sob a pele, chamada de hipoderme, que se acumula principalmente nas regiões abdominal, glútea e femoral. O VAT abdominal pode ser dividido em três depósitos principais: omental, que é a gordura mais superficial que circunda os intestinos; mesentérico, que é a gordura mais profunda em torno dos intestinos, e o retroperitoneal, que se localiza perto dos rins no lado dorsal da cavidade abdominal (WRONSKA, KMIEC, 2012) (Figura 7). Além disso, quantidades menores de VAT são encontradas no mediastino (VAT intratorácico) e em torno de órgãos específicos, tais como o coração (VAT epicárdico), estômago (VAT epigástrico) e vasos sanguíneos (VAT perivascular) (IOZZO, 2011).

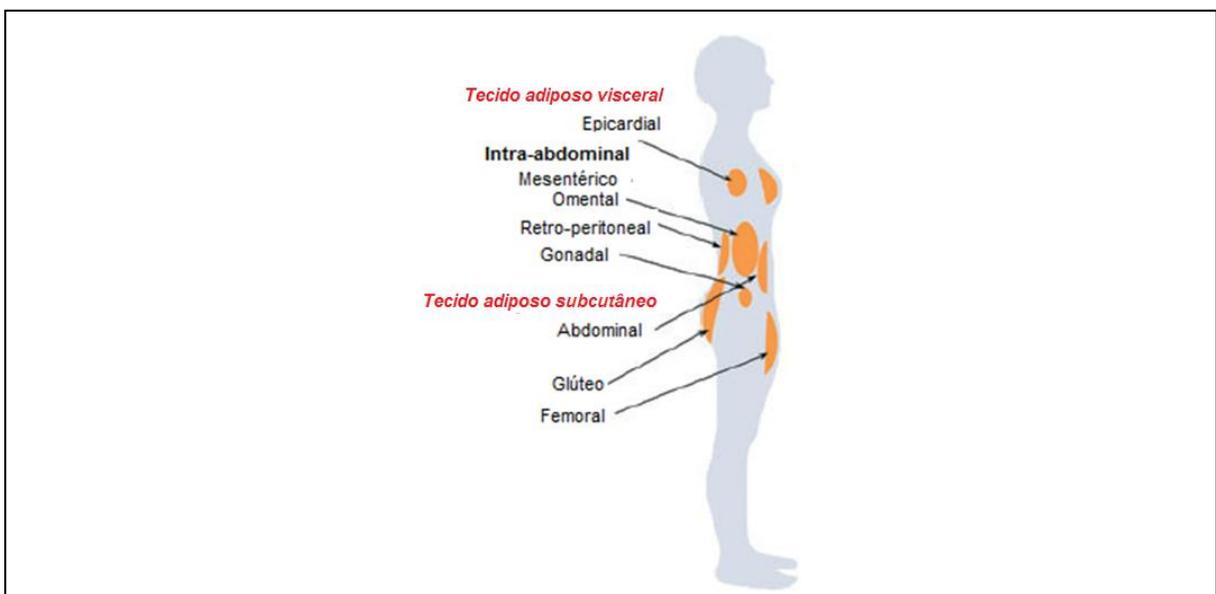


Figura 7 Localização anatômica dos maiores depósitos de tecido adiposo branco visceral e subcutâneo.

Fonte: Wronska, Kmiec, 2012 (adaptado).

Tchkonia e colaboradores (2005) descobriram que o SAT é rico em pré-adipócitos de replicação e diferenciação rápidas, ao passo que o VAT omental é abundante em pré-adipócitos de replicação e diferenciação mais lentas. Esse grupo, em 2007, mostrou que a variação na função dos depósitos de WAT é atribuída, ao menos em parte, a diferenças nas propriedades inerentes dos progenitores das células adiposas. Em 2007, esse grupo mostrou que pré-adipócitos isolados do mesmo indivíduo - provenientes de SAT, VAT mesentérico e VAT omental - e cultivados em condições idênticas, mantiveram as características específicas do depósito de gordura, mesmo após muitas passagens.

Estudos mostram as diferenças metabólicas entre SAT e VAT e, conseqüentemente, seus efeitos distintos sobre o desenvolvimento de doenças. Tchernof e colaboradores (2006) verificaram diferenças metabólicas entre os adipócitos do SAT e VAT de 55 mulheres saudáveis.

O grupo constatou que, em comparação com adipócitos do VAT omental, adipócitos do SAT são maiores, têm maior atividade da LPL, e são mais lipolítico em termos absolutos, o que pode refletir uma maior capacidade de armazenamento de gordura nesse depósito em mulheres. Tem sido proposto que o excesso de VAT, devido a sua alta atividade lipolítica e drenagem no sistema porta do fígado, pode aumentar a captação hepática de ácidos graxos, a gliconeogênese, bem como a produção de VLDL, que juntos, podem diminuir a resposta do fígado à insulina, ajudando a promover o surgimento do T2DM (MIYAZAKI et al. 2002).

O SAT e VAT apresentam diferentes perfis de expressão gênica, gerando a capacidade de resposta distinta desses depósitos aos diversos estímulos recebidos pelo WAT. Além disso, a oferta local de oxigênio, nutrientes e hormônios também são essenciais para a resposta do tecido.

3.2.3.1 Os perfis de expressão gênica do VAT e SAT

A análise da expressão gênica no SAT e VAT é utilizada, por exemplo, em pesquisas que objetivam melhorar o entendimento sobre i) o surgimento das comorbidades associadas à obesidade, ii) as transformações que acontecem durante a expansão do WAT - por exemplo, a angiogênese, inflamação, diferenciação e hipertrofia dos adipócitos e iii) as modificações que ocorrem neste tecido durante a restrição calórica e estabilização do peso.

Gabrielsson e colaboradores (2003) compararam o perfil expressão gênica entre SAT e VAT de homens obesos e observaram que os genes dos componentes do complemento C2, C3, C4, C7 e Fator B foram mais expressos em VAT que em SAT. O grupo sugeriu que a alta expressão de genes do complemento no VAT pode sugerir que o sistema complemento está envolvido no desenvolvimento da adiposidade visceral e/ou contribui para as complicações metabólicas associadas ao aumento da massa de gordura visceral.

Vohl e colaboradores (2004) compararam o perfil de expressão gênica do VAT e SAT em 10 homens obesos, normoglicêmicos e normolipidêmicos. Esse grupo identificou cerca de 347 genes diferencialmente expressos entre VAT e SAT. Em relação aos genes envolvidos com o metabolismo de lipídios, eles observaram que o gene do receptor adrenérgico α -2A - associado a um efeito antilipolítico - estava menos expresso em VAT, o que explica o aumento de lipólise observada em adipócitos do VAT em comparação aos do SAT. Esse estudo mostrou que a *IL-6* foi mais expressa em VAT e a leptina em SAT. Genes envolvidos em vias de desenvolvimento também foram expressos de maneira distinta entre os tecidos. O *CEBPA* e membros da família *homeobox* foram mais expressos em SAT que em VAT, ao passo que o *CEBPD* foi mais expresso em VAT. Esse grupo sugeriu que a diferença de expressão de genes que atuam na via WNT, tais como o *CEBPA*, poderia refletir as diferenças da capacidade de adipogênese entre os depósitos de WAT. Como citado anteriormente, os achados de Tchkonina e colaboradores (2005), que pré-adipócitos provenientes do SAT possuem replicação e diferenciação mais rápidas que os do VAT omental, corroboram essa hipótese.

ZHa e colaboradores (2009), utilizando Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), compararam a expressão de alguns genes entre VAT e SAT de chineses magros e obesos. O gene da leptina foi menos expresso no VAT tanto de magros quanto de obesos. Entre os magros, não houve diferença de expressão do *TNF- α* entre VAT e SAT, ao passo que os genes do *toll-like receptor 4* – que medeia à expressão de várias citocinas - e do receptor de glicocorticoide foram menos expressos em VAT. Já entre os obesos, os genes *TNF- α* e do receptor de glicocorticoide foram mais expressos em VAT. Esse estudo mostrou que, além da diferença de expressão entre SAT e VAT, a expressão dos genes no WAT é distinta entre magros e obesos.

Sonnenberg e colaboradores (2008), observaram por qPCR que a expressão da *IL-6* no WAT é maior que em outros tecidos, tais como o sanguíneo e o ósseo, que sabidamente expressam essa citocina. Fried, Bunkin e Greenberg (1998), com experimentos *in vitro*, mostraram que adipócitos isolados do VAT secretavam mais IL-6 que os provenientes do SAT.

A expansão exorbitante do WAT observada na obesidade é dependente da angiogênese. Com o objetivo de comparar a angiogênese dos SAT e VAT de pacientes obesos, Ledoux e colaboradores (2008) utilizaram um modelo *in vivo* e análises por qPCR da expressão gênica do VEGF. Ambos os depósitos expressaram *VEGF* sem diferença significativa e, juntamente com análises funcionais realizadas, esse estudo mostrou a importância do *VEGF* para a angiogênese no SAT e VAT.

Capel e colaboradores (2009), utilizando as técnicas de *Microarray* e qPCR, investigaram a regulação da expressão gênica de WAT de mulheres obesas em diferentes fases de um programa de dieta para perda de peso e sua relação com a sensibilidade à insulina. Várias análises bioquímicas e análises de expressão no SAT foram realizadas durante o período do programa. Macrófagos e adipócitos do SAT apresentaram padrões distintos de expressão gênica durante as fases da dieta. Além disso, a melhora na sensibilidade à insulina foi associada às mudanças nos grupos de genes expressos em cada fase do programa de perda de peso.

Wang e colaboradores (2009) classificaram 72 pacientes obesos em dois subgrupos distintos, baseado no padrão do perfil de expressão gênica do SAT e do tecido muscular esquelético. Os pesquisadores observaram que os subgrupos respondiam diferentemente ao tratamento com efedrina e cafeína. Esse estudo mostrou a importância da expressão gênica do SAT e do tecido muscular na resposta à terapia adrenérgica para combater a obesidade, além de confirmar que a diferença de expressão gênica entre os tecidos pode influenciar no fenótipo da obesidade e, portanto, ser utilizada para caracterizar subfenótipos.

Em geral, o SAT parece ser mais eficiente na captação direta dos ácidos graxos, apresentar maior atividade da lipase lipoprotéica e secretar mais proteínas protetoras cardiometabólicas, como leptina e adiponectina. Já o VAT parece apresentar menor captação de ácidos graxos livres e aumentar a lipólise por diminuição da sensibilidade à insulina, além de estar relacionado à maior secreção de adipocinas ligadas a processos pró-inflamatórios, como IL-6 e TNF- α . De fato, as evidências indicam que as diferenças regionais de expressão entre SAT e VAT, tanto em indivíduos magros quanto obesos, podem definir diferenças funcionais entre esses depósitos.

3.2.4 A disfunção do tecido adiposo branco na obesidade

Há diferentes hipóteses para explicar as causas das alterações metabólicas observadas na obesidade, principalmente a da resistência à insulina, que estão relacionadas à disfunção do WAT. A hipótese das adipocinas propõe que na obesidade, o WAT secreta mais adipocinas que causam resistência à insulina e poucas que levam à sensibilidade à insulina. Na hipótese da inflamação, a obesidade está associada ao aumento da secreção de quimiocinas que promovem a infiltração dos macrófagos, os quais produzem citocinas que podem impactar negativamente sobre a sensibilidade à insulina. Na hipótese de expansão do WAT, o excesso de gordura é depositado em VAT e ectopicamente, principalmente no fígado e no músculo esquelético, prejudicando o funcionamento desses órgãos.

Esses eventos contribuem para o surgimento das alterações metabólicas associadas à obesidade (SETHI, VIDAL-PUIG, 2007; VIRTUE, VIDAL-PUIG, 2008). Uma proposta mais recente, é que a hipóxia no WAT de indivíduos com excesso de peso (VIRTANEN et al., 2002; KABON et al., 2004; FLEISCHMANN et al., 2005), promovida pela expansão máxima do WAT, possa constituir a base fundamental das modificações que ocorrem nesse tecido e levam às comorbidades da obesidade.

Todas as modificações no WAT, comentadas acima, podem contribuir para o surgimento de doenças associadas à obesidade, como o T2DM e a intolerância à glicose (GOODPASTER et al., 2003), a hipertensão arterial e as dislipidemias (CARNEIRO et al., 2003), conseqüentemente, levando a síndrome metabólica (DESPRÉS, LEMIEUX, 2006). No entanto, na maioria dos casos de obesidade, ocorre a sinergia dos eventos que caracterizam essas hipóteses, sendo difícil isolar a contribuição de cada mecanismo elucidado para o surgimento das comorbidades. Apesar disso, a hipótese da expansão parece ser a que melhor abrange as principais modificações no WAT que explicam o surgimento das doenças associadas à obesidade.

3.2.4.1 A expansão do tecido adiposo branco

Atualmente, acredita-se que se o WAT de um indivíduo expandir, mantendo a sua funcionalidade para armazenar gordura de forma eficiente e adequada, esse sujeito permanecerá metabolicamente saudável, mesmo que se torne obeso (KARELIS, BROCHU, RABASA-LHORET, 2004; TAN, VIDAL-PUIG, 2008).

A hipertrofia e hiperplasia do WAT são os principais processos que contribuem para a expansão desse tecido (RUTKOWSKI, DAVIS, SCHERER, 2009). A hipertrofia, aumento do volume dos adipócitos existentes, acontece em resposta a funções metabólicas típicas, como lipogênese e lipólise. Tais respostas são dependentes do estado nutricional do indivíduo, do seu gasto energético, da influência de hormônios (catabólicos ou anabólicos), da atividade de enzimas envolvidas nesses processos e

do tipo de depósito do WAT. A hiperplasia, caracterizada pelo aumento do número de células adiposas que compõem o tecido e por adipócitos de menor volume, é dependente da adipogênese, processo de diferenciação dos adipócitos (QUEIROZ et al., 2009; GRAY, VIDAL-PUIG, 2007).

O balanço energético cronicamente positivo observado na obesidade, que leva a expansão máxima do WAT, caracterizada por adipócitos hipertróficos, ocasiona a disfunção desse tecido, com consequente complicação à saúde do indivíduo (Figura 8).

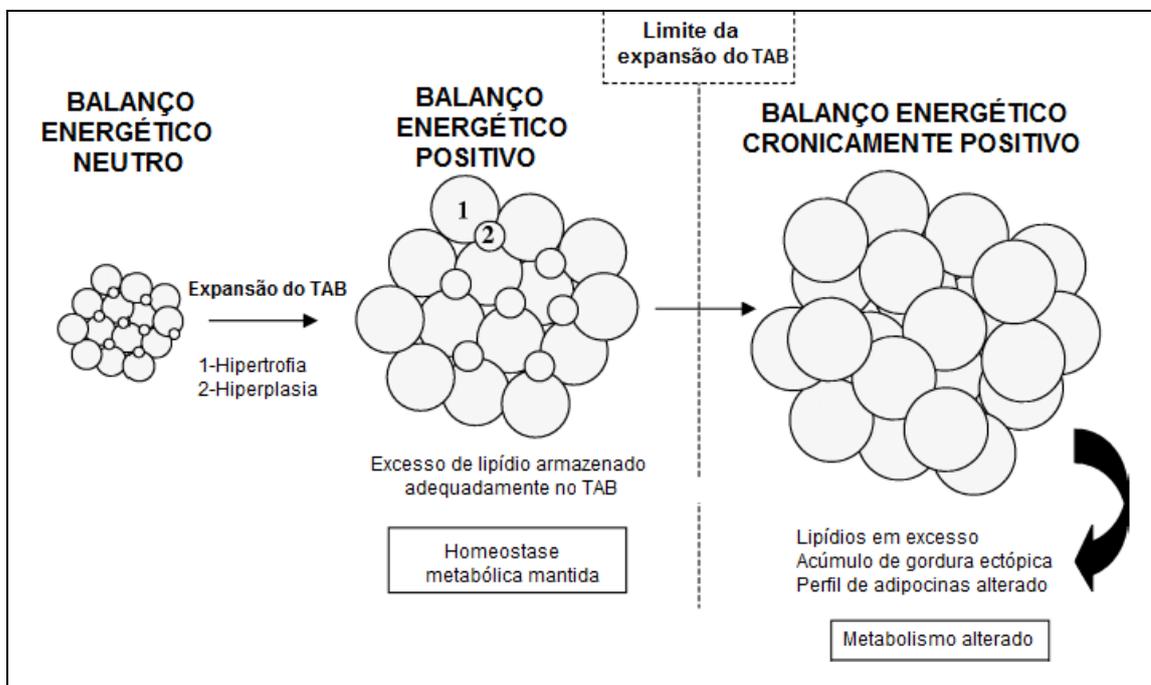


Figura 8 Expansão do tecido adiposo branco como um fator importante na prevenção de lipotoxicidade e complicações metabólicas associadas. TAB: Tecido adiposo branco.

O SAT representa a solução fisiológica para estocagem de energia, depositando triglicerídios na hipoderme. Quando o SAT alcança seu limite máximo de armazenamento de gordura, além do excesso de gordura em VAT, ocorre o depósito de gordura ectópica. O acúmulo de gordura nos órgãos é a causa central de lipotoxicidade em indivíduos obesos, sendo responsável por grande parte dos efeitos negativos da obesidade (SETHI, VIDAL-PUIG, 2007; VIRTUE, VIDAL-PUIG, 2008). Então, conclui-se que a deposição de gordura em SAT, indiretamente, gera um

efeito protetor contra lipotoxicidade (MANOLOPOULOS, KARPE, FRAYN, 2010) (Figura 9).

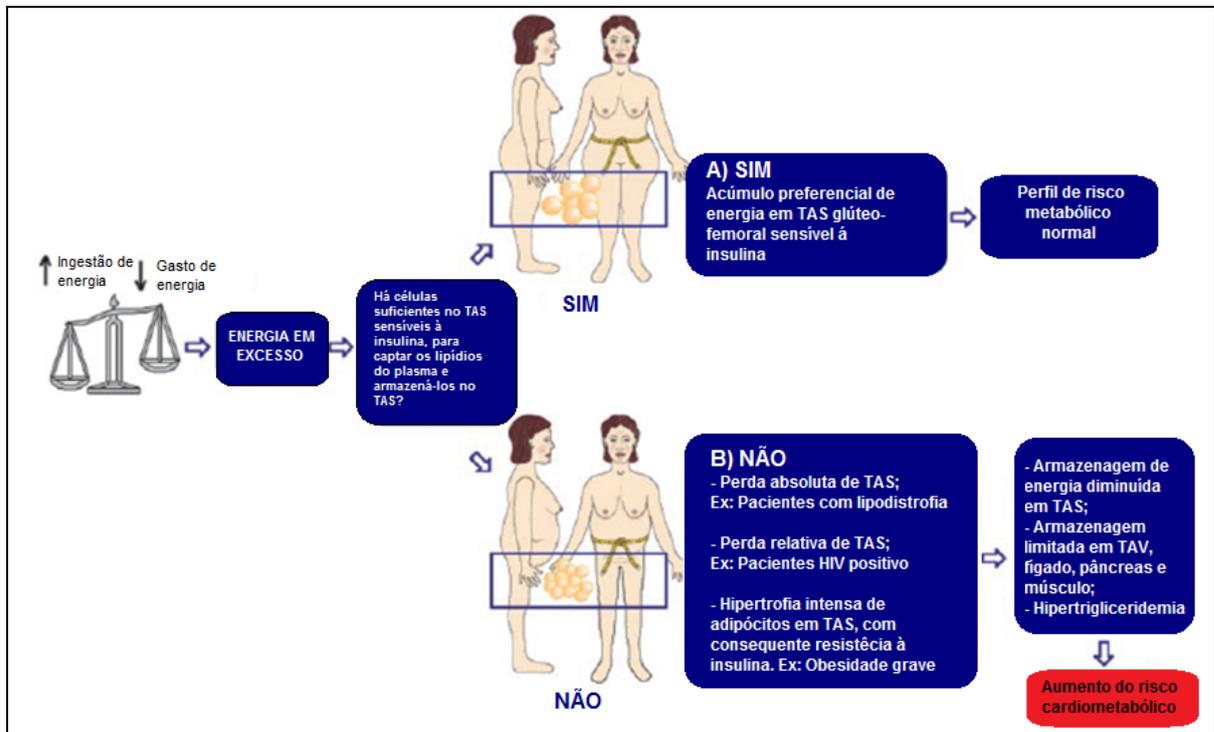


Figura 9 Modelo mostrando a contribuição do tecido adiposo subcutâneo da região glúteo-femoral como um possível protetor metabólico. Dois fenótipos da obesidade são mostrados: A) O excesso de gordura é preferencialmente acumulado na região glúteo-femoral, tendo pouco impacto sobre o perfil de risco metabólico; B) O excesso de gordura é acumulado em VAT principalmente da região abdominal (o que pode ser avaliado por um aumento da circunferência abdominal), bem como no fígado, pâncreas e músculo devido à falta (absoluta ou relativa) de SAT ou à presença de adipócitos hipertrofiados resistentes à insulina, desencadeando um conjunto de anormalidades metabólicas, referida como a síndrome metabólica. SAT: Tecido adiposo subcutâneo. VAT: Tecido adiposo visceral.

Fonte Lemieux, 2004.

Um evento crucial para a adipogênese e expansão do WAT é a angiogênese (CAO, 2007; LIJNEN, 2008), sendo que o fator de crescimento endotelial A (VEGFA) possui função central nesse processo de vascularização (CAO, 2007; FOLKMAN, 2006). O VEGFA participa de processos que induzem a migração e proliferação de células endoteliais e está diretamente associado ao crescimento do endotélio vascular (CELEC, YOUNEMITSU, 2004; FERRARA, 2004). Os vasos recém-formados fornecem oxigênio, componentes nutricionais, fatores de crescimento, hormônios e células inflamatórias, para manter a homeostase adequada do WAT, todos os quais

são cruciais para a sua expansão (CAO, 2010). Então, o desenvolvimento do suprimento vascular através da angiogênese é um passo limitante para a expansão adequada do WAT (SUN, KUSMINSKI, SCHERER, 2011) (Figura 10).

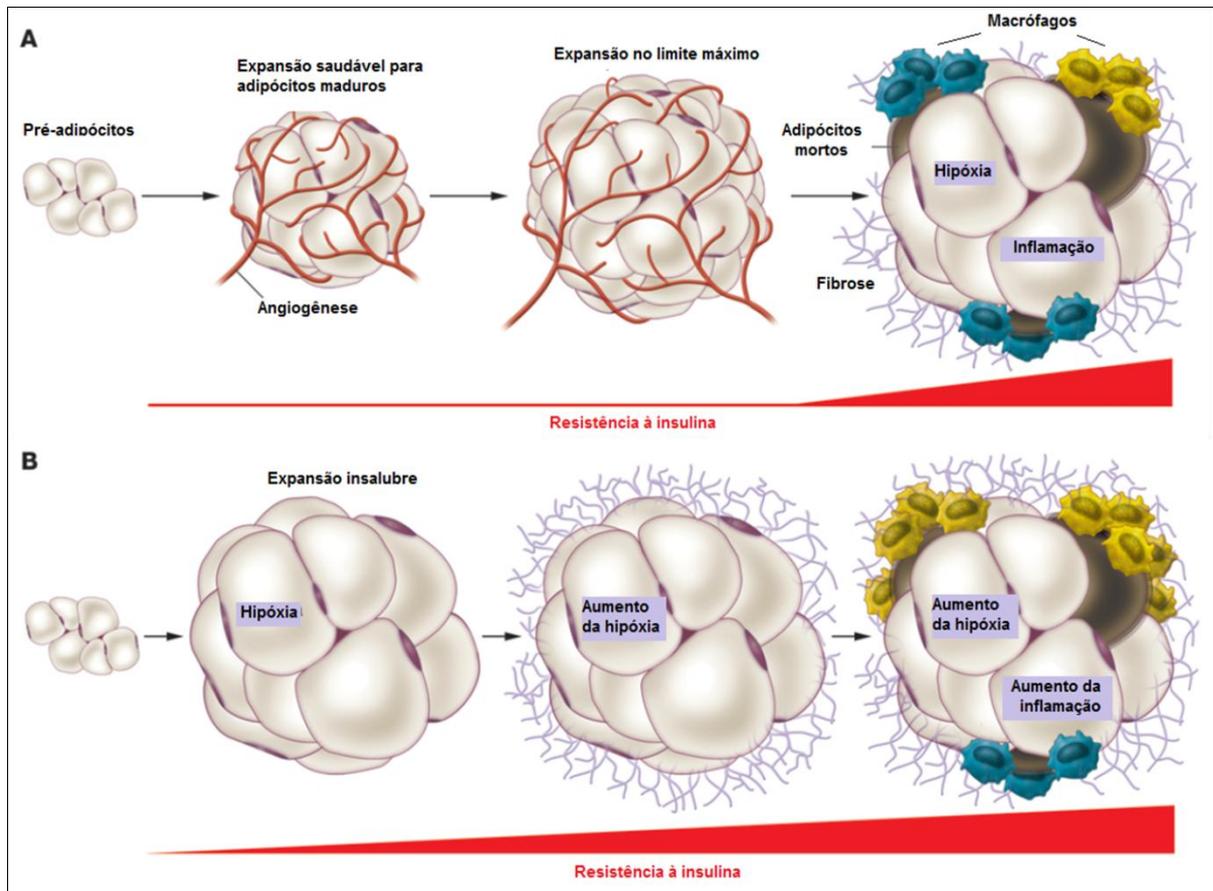


Figura 10 Expansão saudável e inapropriada do tecido adiposo branco. (A) Expansão saudável do WAT consiste no aumento do WAT através do recrutamento de células precursoras adipogênicas, juntamente com uma resposta angiogênica eficiente e remodelamento da ECM adequado. Existem diferenças individuais em relação ao potencial de expansão do WAT. (B) Em contraste, a expansão inapropriada consiste em adipócitos hipertróficos, angiogênese limitada e subsequente hipóxia. Como resultado, podem ocorrer fibrose e recrutamento de macrófagos, ocasionando a um fenótipo de inflamação que é fortemente associado à resistência à insulina. WAT: Tecido adiposo branco. ECM: Matriz extracelular.

Fonte: Sun, Kusminski, Scherer, 2011.

Apesar do aumento da incidência mundial do T2DM estar associado ao aumento da prevalência da obesidade (IDF), algumas evidências clínicas parecem contradizer a ligação direta entre excesso de peso e resistência à insulina (VIRTUE, VIDAL-PUIG, 2008). Por exemplo, a lipodistrofia é uma condição clínica caracterizada pela ausência do AT. Pela carência desse tecido, esses pacientes são incapazes de armazenar gordura adequadamente e apresentam deposição ectópica de gordura.

Apesar de serem extremamente magros, apresentam alterações metabólicas, como dislipidemias e diabetes (BARROSO et al., 1999, SAVAGE et al., 2003). Ademais, o uso de agonistas de PPAR γ , uma classe de antidiabéticos que são potentes indutores de diferenciação de adipócitos - consequentemente aumenta o número de células adiposas - melhora a sensibilidade à insulina, enquanto aumenta o peso dos pacientes (NICHOLS, GOMEZ-CAMINERO, 2007).

Embora essas evidências pareçam ir de encontro à associação entre o aumento de peso e o aparecimento da T2DM, tanto na obesidade, quanto na lipodistrofia, o WAT não é capaz de armazenar lipídios adequadamente, sendo que o aumento do número de células adiposas parece ser essencial para a funcionalidade apropriada do WAT.

Interessantemente, Arner e colaboradores (2010) observaram que mulheres com maior número de adipócitos em SAT, ou seja, com tecido adiposo hiperplásico, apresentaram melhor perfil metabólico e distribuição de gordura corporal que aquelas com adipócitos hipertróficos, apesar de ambos os grupos apresentarem IMC similares. Além disso, na amostra total composta por homens e mulheres, adipócitos hipertróficos foram associados à baixa sensibilidade à insulina e altos níveis de insulina plasmática.

Recentemente, Veilleux e colaboradores (2011) corroboraram a hipótese de que a hiperplasia e hipertrofia são indicadores do perfil metabólico. Eles notaram uma associação entre adipócitos hipertróficos do VAT omental e hipertrigliceridemia, independente do número de adipócitos do SAT, composição corporal e distribuição de gordura. Esses resultados mostraram que a hipertrofia do VAT omental, mas não a do SAT, parece ser um indicador independente de hipertrigliceridemia em mulheres.

De fato, as evidências sugerem que os adipócitos hipertróficos estão relacionados a um maior risco cardiometabólico. Essa associação parece ocorrer, principalmente, pois os adipócitos hipertróficos 1) promovem hipóxia no tecido, que leva ao recrutamento de macrófagos e, assim, aumento da inflamação (VIRTANEN et al., 2002; KABON et al., 2004; FLEISCHMANN et al., 2005) e 2) são associados à

expressão de adipocinas pró-inflamatórias (HOSOGAI et al., 2007; YE et al., 2007; CHEN et al., 2006; WANG et al., 2007).

A insuficiência do fornecimento de oxigênio para o WAT induz apoptose das células, atraindo macrófagos que aumentam a inflamação nesse tecido. Estudos em animais e em células humanas mostraram que a expressão e secreção de adipocinas, incluindo leptina, IL-6 e o VEGF, são estimuladas pela hipóxia, enquanto a produção de ADIPOQ é diminuída (HOSOGAI et al., 2007; YE et al., 2007; CHEN et al., 2006; WANG et al., 2007).

Em camundongos obesos, a hipóxia estimula a expressão do transportador de glicose 1 nos adipócitos (HOSOGAI et al., 2007), o que pode contribuir para a lipogênese e, conseqüentemente, hipertrofia das células adiposas. Além disso, experimentos *in vitro*, com células 3T3-L1, mostraram que a hipóxia leva a inibição da expressão da isoforma 2 do PPAR γ - fator de transcrição essencial para a diferenciação dos adipócitos, expresso exclusivamente no WAT - e isso foi suficiente para bloquear a adipogênese (YUN et al., 2002; LIN et al., 2006).

A hipóxia provoca, ainda, mudanças nas cargas das enzimas envolvidas na síntese de colágeno e, conseqüentemente, o funcionamento ineficaz dessas enzimas. Sob essas condições, pode-se esperar uma desestabilização da ECM, causando morte celular e a atração dos macrófagos (MARIMAN, WANG, 2010) contribuindo para a inflamação do WAT. Além disso, os macrófagos estimulam o remodelamento da ECM pela secreção de metaloproteinases de matriz (UNOK et al., 2008), além de induzir os adipócitos a expressarem essas proteinases (O'HARA et al., 2009).

IL-6 e TNF- α são umas das principais citocinas estudadas na obesidade, visto que tem sido descrita a associação positiva entre a produção dessas moléculas e o tamanho do adipócito (BAHCECI et al., 2007; SKURK et al., 2007), entre a redução na massa de gordura e a diminuição dos níveis séricos de IL-6 e TNF- α (BASTARD et al., 2000) e que indivíduos magros apresentam concentrações séricas menores dessas citocinas em relação a sujeitos com excesso de peso (HANSEN et al., 2010; BASTARD et al., 2000).

Skurk e colaboradores (2007), estudando SAT, mostraram que adipócitos hipertróficos direcionaram a secreção das adipocinas para citocinas pró-inflamatórias. O aumento do tamanho dos adipócitos foi associado a uma maior secreção das citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, IL-6, IL-8, TNF- α e a proteína quimiotática de monócitos 1, enquanto levou a diminuição da IL-10, uma citocina anti-inflamatória.

Após anos de pesquisa, entretanto, a função da IL-6 na obesidade e na resistência à insulina ainda é controversa (ALLEN, FEBBRAIO, 2010). Estudos correlacionam níveis de IL-6 com a resistência à insulina, obesidade e capacidade de prever a ocorrência de T2DM (LAGATHU et al., 2003; ROTTER, NAGAEV, SMITH, 2003), ao passo que outras evidências consideram essa citocina um agente anti-inflamatório, contribuindo para oxidação lipídica e maior captação de glicose (XING, GAULDIE, COX, 1998; CAREY et al., 2006).

Por outro lado, os estudos em relação à função do TNF- α na obesidade e suas comorbidades são mais consistentes. Em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta, níveis de TNF- α no WAT aumentam proporcionalmente com a adiposidade (BOUCHER et al., 2005). O TNF- α provoca um agravamento da resistência à insulina e doença inflamatória (MOLLER, 2000). Yang e Chen (2007), utilizando experimentos em um modelo de células hepáticas com esteatose em cultura, observaram que o TNF- α promove a síntese de triglicerídios. Além disso, Cawthorn e colaboradores (2007) mostraram que o TNF- α é um potente inibidor da adipogênese.

A inflamação crônica não resolvida pode ser responsável pela fibrose, caracterizada pela síntese e deposição excessiva dos componentes da ECM (WYNN, 2007). A fibrose progressiva do WAT, em indivíduos com obesidade, pode instituir uma limitação mecânica para a hipertrofia dos adipócitos e, desse modo, promover a deposição ectópica de gordura (SZENDROEDI, RODEN, 2009), o que pode ocasionar em complicações metabólicas.

Recentemente, Divoux e colaboradores (2010) observaram uma fibrose mais acentuada em VAT omental e em torno dos adipócitos de pacientes obesos que de

indivíduos magros. A fibrose em VAT omental foi associada à adipócitos com menor diâmetro. Além disso, um maior número de células inflamatórias foi encontrado no VAT omental fibrótico, ao passo que o SAT fibrótico foi caracterizado por ser hipocelular. Interessantemente, o VAT omental fibrótico foi associado a melhores níveis plasmáticos de triglicerídios. Apesar de a fibrose parecer contribuir para o acúmulo de gordura ectópica (SZENDROEDI, RODEN, 2009), nesse estudo de Divoux et al., a fibrose em VAT omental pareceu contribuir para um melhor perfil lipídico.

3.2.5 A adipogênese

Compreender a complexidade da adipogênese é de grande importância para o esclarecimento da fisiopatologia das doenças metabólicas humanas associadas à obesidade, uma vez que 1) o maior número de adipócitos maduros no WAT parece contribuir para um melhor perfil metabólico (ARNER et al., 2010; VEILLEUX et al., 2011) e 2) a disfunção do WAT, caracterizada pela hipertrofia de adipócitos, parece estar associada à incapacidade de produzir novas células adiposas (ARNER et al., 2010).

Nos adultos, o parênquima do WAT é constituído principalmente por adipócitos maduros, porém, devido à presença de células tronco mesenquimais e pré-adipócitos, ocorre renovação dos adipócitos, sendo que indivíduos com hipertrofia do WAT geram 70% menos novos adipócitos por ano que indivíduos com hiperplasia (ARNER et al., 2010). As mudanças na expressão gênica durante as fases da adipogênese têm sido caracterizadas principalmente com experimentos *in vitro*, através da utilização de linhagens celulares, sendo a 3T3 a mais utilizada (MACDOUGALD, LANE, 1995; ROSEN, MACDOUGALD, 2006).

O início da diferenciação dos adipócitos - chamada de determinação - ocorre quando as células-tronco mesenquimais, residentes no estroma do WAT, perdem a capacidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e comprometem-se

com a linhagem adipocitária, tornando-se pré-adipócitos. Apesar dos eventos moleculares nessa fase não serem totalmente conhecidos, as CEBPB e CEBPG são expressas e, possivelmente, estimulam a expressão do PPAR γ , cujo gene contém sítios CEBP na sua região promotora. As células, então, restauram o ciclo celular e entram em expansão clonal. Em seguida, retiram-se permanentemente do processo de ciclo celular e entram na segunda fase da adipogênese, chamada de diferenciação terminal (NTAMBI, KIM, 2000; FARMER et al., 2006).

Os componentes da ECM parecem ser importantes para a fase inicial da adipogênese. Estudos com linhagens de pré-adipócitos 3T3-M2 com menor atividade da enzima prolil-hidroxilase – envolvida nas modificações das moléculas de colágeno necessárias para a montagem de monômeros e fibras de colágeno – mostraram que essas células foram incapazes de acumular triglicerídios e, conseqüentemente, diferenciaram-se em adipócitos (GREEN, MEUTH, 1974). Ibrahim e colaboradores (1992) mostraram que a inibição da síntese de colágeno bloqueou, de maneira dose-dependente, a diferenciação e o acúmulo de triglicerídios em pré-adipócitos derivados de células embrionárias de camundongos 10T1/2. Esse efeito foi observado somente em pré-adipócitos e não em adipócitos maduros. Ademais, em células 3T3-L1, o bloqueio da enzima prolil-hidroxilase 1, expressa nos estágios iniciais da adipogênese, impede a diferenciação dos pré-adipócitos (FLOYD et al., 2007). Esses resultados sugerem que os componentes da ECM são essenciais para a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros.

Os eventos moleculares da diferenciação terminal são mais conhecidos e consistem em uma cascata de eventos transcricionais que resultam na diferenciação de adipócitos (ROSEN, MACDOUGALD, 2000). Essa fase inicia por ativação do PPAR γ e do CEBPA, fatores de transcrição que regulam um ao outro positivamente para manter seus níveis de expressão gênica (CHRISTODOULIDES et al., 2009; LOWE, O'RAHILLY, ROCHFORD, 2011). Os PPAR γ e CEBPA estimulam a expressão de genes codificantes de proteínas que caracterizam os adipócitos, tais como as proteínas necessárias para o metabolismo de lipídios, o transporte de glicose sensível à insulina, receptores e adipocinas. Nessa etapa, as células adquirem características morfológicas de adipócitos, como acúmulo de gotículas de lipídio e núcleo periférico.

Embora sejam fundamentais para a fase tardia de diferenciação, os *PPARG* e *CEBPA* não são expressos na fase de determinação, indicando que não estão envolvidos nessa fase inicial da adipogênese (NTAMBI, KIM, 2000). A via canônica WNT é a principal via de sinalização envolvida na diferenciação dos adipócitos, por controlar a expressão dos fatores de transcrição *PPARG* e *CEBPA* (CHRISTODOULIDES et al., 2009; LOWE, O'RAHILLY, ROCHFORD, 2011). A Figura 11 resume os estágios da diferenciação dos adipócitos.

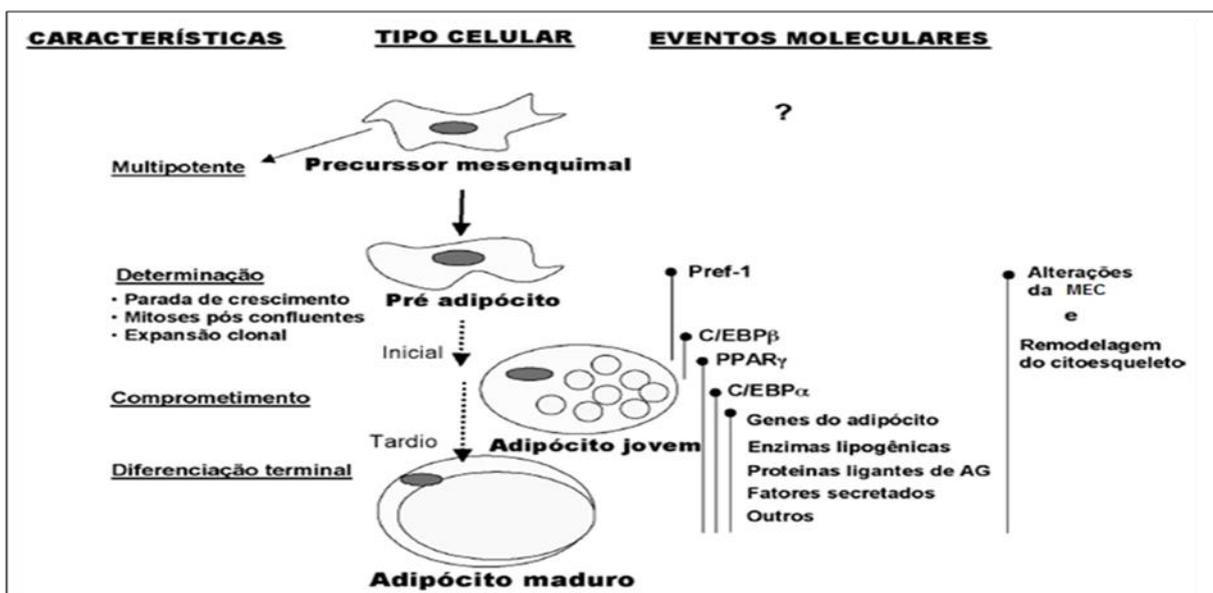


Figura 11 Uma visão geral dos estágios de diferenciação dos adipócitos. As células-tronco mesenquimais multipotentes são capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteoblastos e miócitos. Quando exposto a um ambiente favorável, essas células passam por expansão clonal e, conseqüentemente, diferenciação terminal: expressão de proteínas exclusivas e aquisição de características morfológicas de células adiposas, como acúmulo de gotículas de gordura que coalescem e núcleo periférico. A expressão dos principais genes que acompanha esse processo está indicada à direita. PPAR- γ : Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomas. C/EBP: Proteína amplificadora ligante ao CCAAT. Pref-1: Fator pré-adipócito 1. ECM; Matriz extracelular. AG: Ácidos graxos.

Fonte: Fonseca-Alaniz et al., 2006 (adaptado).

3.2.5.1 A sinalização WNT

A importância da via canônica WNT na diferenciação das células-tronco mesenquimais tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas (Figura 12). O gene *Wingless* foi descoberto em *Drosophila* devido a sua atuação como morfógeno no desenvolvimento de asas. Em humanos, a via WNT é homóloga a via *Wingless* da *Drosophila* (PAPKOFF et al., 1996). As proteínas Wnts são glicoproteínas secretadas, que possuem uma cadeia de ácido graxo ligada covalentemente à sua extremidade N-terminal, o que aumenta a sua afinidade com a superfície celular (WILLERT et al., 2003). Essas proteínas agem de forma autócrina e parácrina (TAIPALE, BEACHY, 2001; LOGAN, NUSSE, 2004), atuando no controle de muitos aspectos do desenvolvimento e do controle da transcrição gênica em animais (HUELSKEN et al., 2000; HUELSKEN et al., 2001; GRIGORYAN et al., 2008).

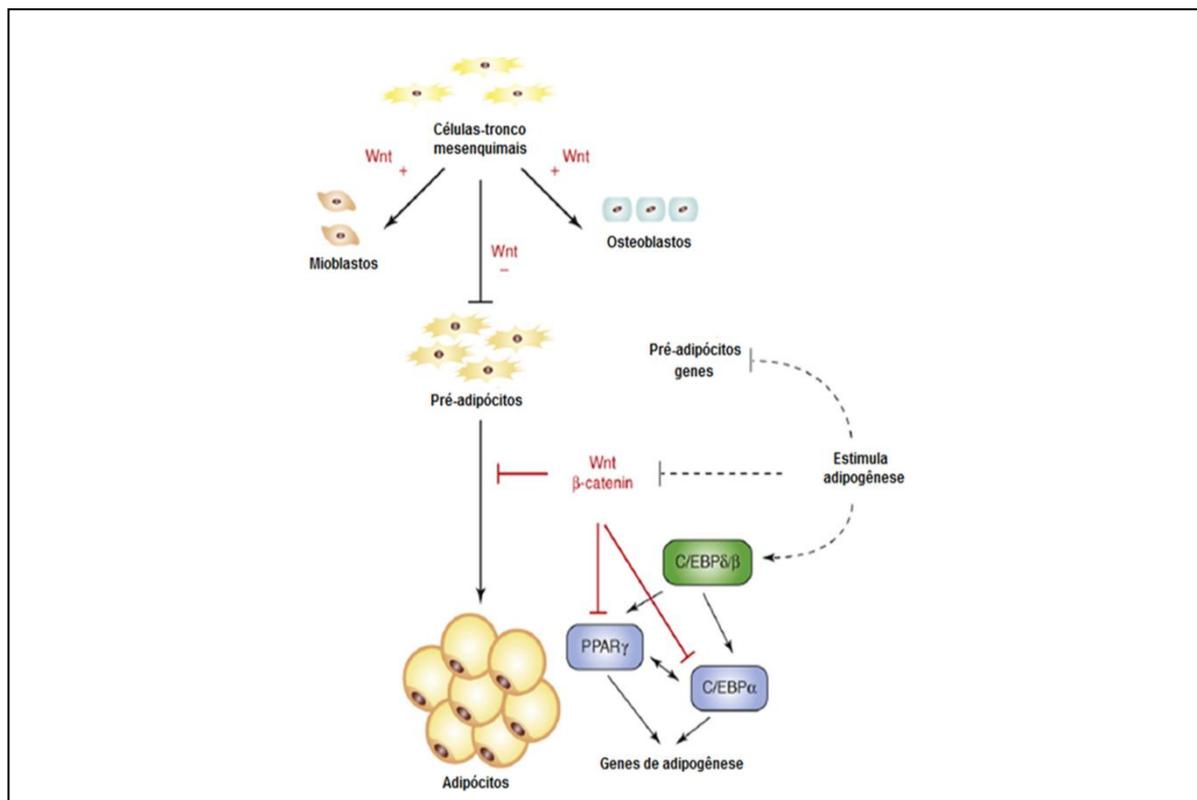


Figura 12 A via canônica WNT regula o direcionamento do comprometimento das células tronco-mesenquimais. A ativação da sinalização WNT promove a diferenciação das células-tronco mesenquimais em miócitos e osteócitos. A ativação da via WNT bloqueia a diferenciação dos adipócitos, inibindo a expressão do PPAR γ e CEBPA, reguladores centrais da adipogênese. Esses fatores de transcrição são induzidos diretamente pelos CEBPB e CEBPD em resposta ao estímulo adipogênico, que também serve para direcionar a via WNT canônica. PPAR γ e CEBPA regulam-se um ao outro positivamente para manter seus níveis de expressão gênica e ativar a expressão de genes alvo que definem o fenótipo dos adipócitos.

Fonte: Christodoulides et al., 2009.

As Wnts ativam pelo menos três tipos de vias de sinalização intracelular: 1) a via Wnt/ β -catenina (também conhecida como via canônica) que é centrada na proteína reguladora gênica β -catenina; 2) a via de polarização planar que coordena a polarização das células no plano de um epitélio em desenvolvimento e depende das GTPases da família Rho e 3) a via Wnt/ Ca^{2+} que estimula o aumento do Ca^{2+} com consequências semelhantes às descritas para as outras vias (RAO, KÜHL, 2010) (Figura 13). Foram descobertos 19 genes que codificam Wnts e 10 receptores *Frizzled* (FZD) em humanos. A seletividade da via para cada ramo parece ser determinada por cada Wnt, pela disponibilidade dos receptores e co-receptores, bem como pela afinidade de cada complexo Wnt-receptor. A antecipação do desfecho da sinalização é complicada, pois muitas vias podem ser ativadas em paralelo, mas em diferentes graus, dependendo do contexto celular (SOKOL et al., 2011).

A via canônica de sinalização Wnt atua pela regulação da proteólise de uma proteína multifuncional chamada de β -catenina, que forma o complexo E-caderina/ β -catenina/ α -catenina, com função na adesão célula-célula (JAMORA, FUCHS, 2002) e na regulação gênica (CADIGAN, NUSSE, 1997).

Na ausência da sinalização Wnt, as β -cateninas que não estão associadas à caderinas são rapidamente degradadas no citoplasma. Essa degradação depende de um grande complexo de degradação proteico, que se liga à β -catenina e a mantém fora do núcleo enquanto promove a sua proteólise. O complexo contém, pelo menos, outras quatro proteínas: duas serinatreonina-quinase 1) a caseína-quinase 1 α (CK1 α), que fosforila a β -catenina na serina 45 (LIU et al., 2002) e a 2) glicogênio-sintase-quinase 3 β (GSK3 β); que a fosforila nas serinas 33 e 37 e na treonina 41 (YOST et al., 1996); além de duas proteínas suporte que estabilizam o complexo 1) a axina e 2) a proteína da polipose adenomatosa de colo (APC). As fosforilações marcam a β -catenina para a ubiquitinação e degradação rápida nos proteossomos, impedindo o seu acúmulo no citoplasma e, subsequente, translocação para o núcleo (HART et al., 1999).

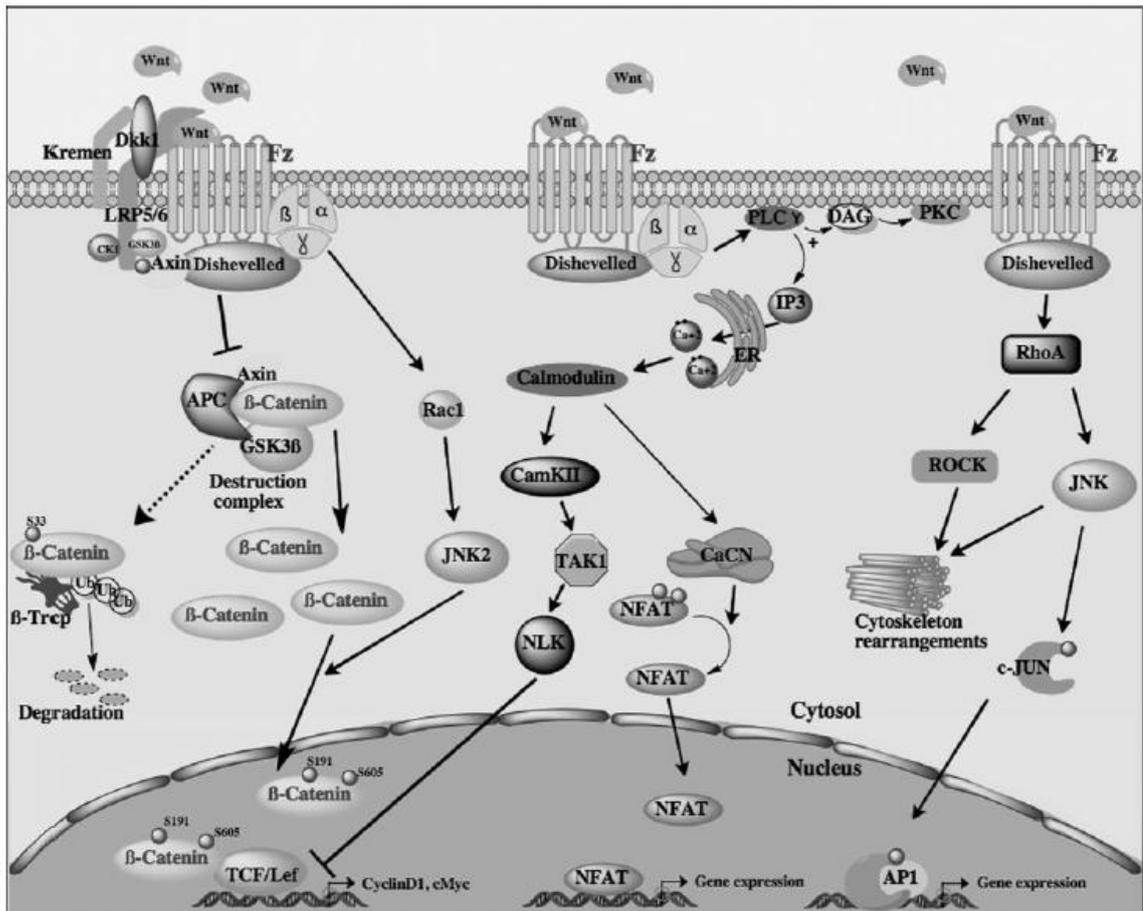


Figura 13 Um esquema geral das vias canônica (à esquerda) e não canônica (à direita) da sinalização Wnt.

Fonte: Rao, Kuhl, 2010.

Na presença de Wnt, a cascata de eventos inicia com a ligação das Wnts ao domínio rico em cisteína dos receptores da família FZD, proteínas transmembrana de sete segmentos, e aos co-receptores relacionados com o receptor LDL 5/6 (LRP5/6) (CADIGAN, LIU, 2006). O complexo Wnt-FZD-LRP-5/6 formado fosforila e ativa a *Dishevelled* (Dsh), proteína de suporte necessária à transmissão do sinal (MALBON, WANG, 2009). Os detalhes dos eventos posteriores ainda são pouco conhecidos, entretanto sabe-se que 1) ativação da Dsh inibe a quinase GSK3 β , diminuindo a fosforilação da β -catenina e 2) as quinases GSK3 e CK1 γ fosforilam a cauda citosólica do receptor LRP para recrutar e inativar a axina, rompendo o complexo de degradação (KIMELMAN, XU, 2006; CASPI et al., 2008). Dessa maneira, a fosforilação e subsequente degradação da β -catenina são inibidas,

permitindo um acúmulo gradual de β -catenina não-fosforilada e sua translocação para o núcleo, onde controla a transcrição gênica.

Os genes alvo da sinalização Wnt/ β -catenina normalmente são reprimidos por um complexo inibidor de proteínas reguladoras gênicas. O complexo inclui proteínas da família *T cell factor/lymphocyte enhancer factor* (TCF/LEF) ligados a uma proteína co-repressora da família *Groucho*. No núcleo, a β -catenina se liga às proteínas TCF/LEF, deslocando o *Groucho* e funcionando como um co-ativador, induzindo a transcrição de genes-alvo de Wnt (KIMELMAN, XU, 2006). Assim, a sinalização por Wnt/ β -catenina desencadeia uma mudança de repressão para ativação transcricional. A sinalização Wnt/ β -catenina regula a transcrição de muitos genes envolvidos na proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose, incluindo o *c-Myc*, que codifica um potente estimulador do crescimento e da proliferação celular, e o *CCND1* codificador da ciclina D1, que age no controle ciclo celular (HE et al., 1998; TETSU, MCCORMICK, 1999). A ativação dessa via inibe a adipogênese, através do bloqueio da indução dos fatores de transcrição *CEBPA* e *PPARG* (CHRISTODOULIDES et al., 2009; LOWE, O'RAHILLY, ROCHFORD, 2011).

Recentemente, demonstrou-se que, sob certas condições, as células do sistema imunológico também podem expressar Wnt-5, um fator que inibe a adipogênese em seres humanos. Bilkovski e colaboradores (2011) encontraram que Wnt-5 é expressa em macrófagos do WAT de indivíduos obesos e com T2DM. Além disso, com experimentos *in vitro* em células 3T3-L1, o grupo mostrou que os macrófagos alteram a adipogênese, não somente através de citocinas pró-inflamatórias clássicas, mas também por meio da secreção de moléculas de sinalização Wnt.

A sinalização Wnt pode ser modulada por antagonistas extracelulares, tais como a família das proteínas secretadas relacionadas ao *Frizzled* (sFRP), o fator inibidor Wnt (WIF) e os membros da família *Dickkopf* (Dkk). Esses inibidores bloqueiam a via Wnt por diferentes mecanismos: as sFRP se ligam às Wnts e aos receptores FZD, o WIF se liga ao Wnt e os Dkk se ligam ao complexo receptor FZD-LRP-5/6 de Wnt (KAWANO, KYPTA, 2003; MACDONALD, TAMAI, HE, 2009). Além desses, outras moléculas, tais como a endostatina e o FZC18, ambos os fragmentos provenientes

da clivagem do COL18A1, podem inibir a via Wnt (HANAI et al., 2002; QUÉLARD et al., 2008).

As sFRP são a maior família de inibidores Wnt, inicialmente identificadas como moléculas solúveis implicadas nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário (LEYNS et al., 1997; WANG et al. 1997) e como moduladores da apoptose (MELKONYAN et al. 1997). Essa família, que contém cinco elementos em humanos - sFRP1 a sFRP5 - receberam esse nome, pois a região N-terminal dessas proteínas contém uma sequência homóloga ao domínio extracelular dos receptores *Frizzled* (HOANG et al. 1996; LEYNS et al. 1997; LIN et al. 1997; WANG et al. 1997).

Pouco tem sido estudado sobre a influência das sFRP na diferenciação dos adipócitos, bem como na obesidade e suas comorbidades. Recentemente, Lagathu e colaboradores (2010) mostraram que o sFRP1 regula a adipogênese humana, bem como é importante para a acumulação de lipídios durante a diferenciação dos adipócitos. Esses autores também observaram que a expressão do *SFRP1* no WAT aumenta durante a adipogênese e diminui gradualmente com a supernutrição crônica. Além disso, Ehrlund e colaboradores (2013) correlacionaram positivamente os níveis de expressão do *SFRP1* com a sensibilidade à insulina. Neste contexto, o esclarecimento das moléculas que modulam a via canônica WNT, pode contribuir para um melhor entendimento sobre a adipogênese e as alterações no metabolismo da glicose.

Uma melhor compreensão sobre a expressão dos genes envolvidos na adipogênese e na inflamação, que ocorrem no WAT durante a obesidade, pode possibilitar a identificação de genes com potencial de se tornarem novos alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento excesso de peso, bem como para as comorbidades associadas a essa doença.

REFERÊNCIAS

ALLEN TL, FEBBRAIO MA. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? **Diabetologia**, v. 53, p. 399-402, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. 11-61, jan. 2010.

ARNER E, et al. Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. **Diabetes**, v. 59, p. 105-109, 2010.

BAHCECI M, et al. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 30, p. 210-214, 2007.

BAHIA L, et al. O Endotélio na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 291-303, 2006.

BALWIERZ A, et al. Angiogenesis in the New Zealand obese mouse model fed with high fat diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 8, p.13, 2009.

BARROSO I, et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, v. 402, p. 880-883, 1999.

BARSH, GS; SCHWARTZ, MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p. 589–600, 2002.

BELL CG, WALLEY AJ, FROGUEL P. The genetics of human obesity. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 221-234, 2005.

BILKOVSKI R, et al. Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. **International Journal of Obesity**, v. 35, p. 1450-1454, 2011.

BISHOP JR, et al. Deletion of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan type XVIII collagen causes hypertriglyceridemia in mice and humans. **PLoS One**, v. 5, p. e13919, 2010.

BOUCHARD C, et al. the response to long-term overfeeding in identical twins. *new england journal medicine*, v. 322, P. 1477-1482,1990.

BOUCHER J, et al. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, p. 761-767, 2005.

INQUÉRITO DOMICILIAR SOBRE COMPORTAMENTOS DE RISCO E MORBIDADE. REFERIDA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO TRANSMISSÍVEIS, 2003. Brasil. Instituto nacional do câncer (INCA).

BROWN AC, et al. Searching QTL by gene expression: analysis of diabetesity.

BMC Genetics, v. 6, p. 12, 2005.

BUTLER MG. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, p. 477-486, 2009.

CADIGAN KM, LIU YI: Wnt signaling: complexity at the surface. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 395-402, 2006.

CADIGAN KM, NUSSE R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & Development**, v. 11, p. 3286-3305, 1997.

CAO Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 2362–2368, 2007.

CAPEL F et al. Macrophages and Adipocytes in Human Obesity: Adipose Tissue Gene Expression and Insulin Sensitivity During Calorie Restriction and Weight Stabilization. **Diabetes**, v. 58, p. 1558–1567, 2009.

CAREY AL, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. **Diabetes**, v. 55, p. 2688-2697, 2006.

CARNEIRO G, et al. Influence of body fat distribution on the prevalence of arterial hypertension and other cardiovascular risk factors in obese patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 306-311, 2003.

CARVALHO HF, COLLARES-BUZATO, CB. Células: Uma abordagem multidisciplinar. Barueri-SP, Manole, 2005.

CASPI M, et al. Nuclear GSK-3beta inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a beta-catenin phosphorylation-independent manner. **Oncogene**, v. 27, p. 3546-3555, 2008.

CABALLERO AE, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, p. 1856-1862, 1999.

CAWTHORN WP, et al. Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. **Cell death and differentiation**, v. 14, p.1361-1373, 2007.

CHANG-CHEN KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorder**, v. 9, p. 329-343, 2008.

HAVEY C, et al. Regulation of secreted protein acidic and rich in cysteine during adipose conversion and adipose tissue hyperplasia. **Obesity**, v.14, p.1890-1897, 2006.

CHEN B, et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor- 1 independent of reactive oxygen species in

adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 549–556, 2006.

CHRISTODOULIDES C, et al. Adipogenesis and WNT signalling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, p. 16-24, 2009.

CLEMENT, K. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, p. 398–401, 1998.

CUMMINGS DE, et al. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. **Nature Medicine**, v. 8, p. 643-644, 2002.

DESPRÉS JP, LEMIEUX I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v.44, p. 881-887, 2006.

DIVOUX A, CLÉMENT K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. **Obesity Reviews**, v. 12, p. e494–e503, 2011.

DIVOUX A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. **Diabetes**, v. 59, p. 2817-2825, 2010.

DOBROW IJ, Kamenetz C, Devlin MJ. Aspectos psiquiátricos da obesidade. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 24(Supl III), p.63-67, 2002.

EHLUND A, et al. Characterization of the Wnt Inhibitors Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRPs) in Human Adipose Tissue. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2013. [Epub ahead of print]

ELAMAA H, et al. Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif. **Matrix Biology**, v. 22, p. 427-442, 2003.

ERRERA F, et al. COL18A1 is highly expressed during human adipocyte differentiation and the SNP c.1136C>T in its “frizzled” motif is associated with obesity in diabetes type 2 patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 167-177, 2008.

FARMER SR. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, p. 263-273, 2006.

FAROOQI IS, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p.1093–1103, 2002.

FAROOQI IS, O'RAHILLY S. Monogenic human obesity syndromes. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 59, p. 409-424, 2004.

FELIPPE F M. O peso social da obesidade. **Revista Virtual e Contextos**, v. 2, p.

1-12.

FEINLEIB, M. *et al.* The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. **American Journal of Epidemiology**, v. 106, p. 284–285, 1977.

FLEISCHMANN E, *et al.* Tissue oxygenation in obese and non-obese patients during laparoscopy. **Obesity Surgery**, v. 15, p. 813–819, 2005.

FLOREZ JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? **Diabetologia**, v. 51, p. 1100-1110, 2008.

FLOYD ZE, *et al.* Effects of prolyl hydroxylase inhibitors on adipogenesis and hypoxia inducible factor 1 alpha levels under normoxic conditions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, p. 1545-1557, 2007.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 1-18, 2006/ ,,

FONSECA-ALANIZ MH, *et al.* O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FRANCK N, *et al.* Identification of adipocyte genes regulated by caloric intake. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, p. E413-418, 2011.

FRIED SK, BUNKIN DA, GREENBERG AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 847-850, 1998.

GABRIELSSON BG *et al.* High Expression of Complement Components in Omental Adipose Tissue in Obese Men. **Obesity Research**, v. 11, p. 699-708, 2003.

GOODPASTER BH, *et al.* Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. **Diabetes Care**, v. 26, p. 372-379, 2003.

GRAY SL, VIDAL-PUIG AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. **Revista de Nutrição**, v. 65, p. S7–S12, 2007.

GREEN H, MEUTH M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell**, v. 3, p. 127–133, 1974.

GRIGORYAN T, *et al.* Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of vertebrates. **Current Opinion in Genetics**, v. 11, p. 547-553, 2001.

HAJER GR, van HAEFTEN TW, VISSEREN FLJ. Adipose tissue dysfunction in

obesity, diabetes and vascular diseases. **European Heart Journal**, v.29, p.2959–2971, 2008.

HALFTER W, DONG S, SCHURER B, COLE GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 273, p. 25404-25412, 1998.

HANAI J, et al. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology*, v. 158, p. 529-39, 2002.

HARDING HP, RON D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. **Diabetes**, v. 51(Suppl 3), p. S455–461, 2002.

HART M, et al. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. **Current Biology**, v. 9, p. 207-210, 1999.

HE TC, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science**, v. 281, p. 1509-1512, 1998.

HENDAOU I, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by a soluble collagen-derived frizzled domain interacting with Wnt3a and the receptors frizzled 1 and 8. **PLoS One**; v. 7(1), p. e30601, 2012.

HERRERA BM, LINDGREN CM. The genetics of obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 10, p. 498-505, 2010.

HOANG, B., et al. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 26131-26137, 1996.

HOSOGAI N, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, p. 901–911, 2007.

HUELSKEN J, BIRCHMEIER W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics*, v. 11, p. 547-553, 2001.

HUELSKEN J, et al. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *Journal of Cell Biology*, v. 148, p. 567-578, 2000.

HULL RL, et al. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 3629-3643, 2004.

IBRAHIMI A, et al. Essential role of collagens for terminal differentiation of preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, p. 1314-1322, 1992.

INGALLS AM, DICKIE MM, SNELL GD. Obese, a new mutation in the house mouse. **Journal of Heredity**, v. 12, p. 317-318, 1950.

INOUE-MURAYAMA M, SUGIMOTO Y, NIIMI Y, ASO H. Type XVIII collagen is newly transcribed during bovine adipogenesis. **Differentiation**, v. 65, p. 281-285, 2000.

PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES 2008-2009. Instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE). Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. 2010.

INTERNATIONAL DIABETES FOUNDATION (IDF). Diabetes Atlas fifth edition. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 15 Nov. 2012.

IOZZO P. Myocardial, Perivascular and Epicardial Fat. **Diabetes Care**, v. 34, p.S371-S379, 2011.

JAMORA C, FUCHS E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. E101-8, 2002.

JÉQUIER E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 967, p. 379-388, 2002.

KABON B, et al. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. **Anesthesiology**, v. 100, p. 274–280, 2004.

KAHN BB. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. **Cell**, v. 92, p. 593-596, 1998.

KANASAKI K, KOYA D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

KARELIS, A.D., BROCHU, M., RABASA-LHORET, R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? **Diabetes & Metabolism**, v. 30, p. 569–572, 2004.

KAWANO Y, KYPTA R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 2627-2634, 2003.

KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 89, p. 89:2548–2556, 2004.

KIMELMAN D, XU W. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. **Oncogene**, v. 25, p. 7482-7491, 2006.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature Genetics**, v. 19, p. 155–157, 1998.

KURKI E, et al. Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, p.1-64, 2012.

LAGATHU C, et al. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 372–379, 2003.

LAGATHU C, et al. Secreted frizzled-related protein 1 regulates adipose tissue expansion and is dysregulated in severe obesity. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 1695-1705, 2010.

LEAHY JL, et al. Targeting b-cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, p. 4206–4216, 2010.

LEBLEU VS, MACDONALD B, KALLURI R. Structure and Function of Basement Membranes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 1121-1129, 2007.

LEDOUX S, et al. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. **Diabetes**, v. 57, p. 3247-357, 2008.

LEMIEUX I. Energy partitioning in gluteal-femoral fat: does the metabolic fate of triglycerides affect coronary heart disease risk? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, p. 795-797, 2004.

LEYNS L, et al. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. **Cell**, v. 88, p. 747-756, 1997.

LIN Q, LEE Y-J, YUN Z. Differentiation arrest by hypoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 30678–30683, 2006.

LIN, K., et al. The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11196-11200, 1997.

LIU C, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. **Cell**, v. 108, p. 837-847, 2002.

LIU YJ, et al. Molecular and genetic mechanisms of obesity: implications for future management. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 325-340, 2003.

LIJNEN HR. Angiogenesis and obesity. **Cardiovascular Research**, v. 78, p. 286–293, 2008.

LOGAN CY, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 781–810, 2004.

LOOS RJ, BOUCHARD C. Obesity--is it a genetic disorder? **Journal of Internal Medicine**, v. 254, p. 401-425, 2003.

LOWE CE, O'RAHILLY S, ROCHFORD JJ. Adipogenesis at a glance. **Journal of**

Cell Science, v. 124, p. 2681-2686, 2011.

MACDONALD BT, TAMAI K, HE X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Developmental Cell**, v. 17, p. 9-26, 2009.

MACDOUGALD OA, LANE MD. Transcriptional regulation of gene expression during fibroproliferative diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 524–529, 2007.

MALBON CC, WANG HY. Dishevelled: a mobile scaffold catalyzing development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 72, p. 153-166, 2006.

MANOLOPOULOS KN, KARPE F, FRAYN KN. Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. **International Journal of Obesity**, v.34, p. 949-959, 2010.

MARIMAN ECM, WANG P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p. 1277–1292, 2010.

MCALLISTER EJ, et al. Ten putative contributors to the obesity epidemic. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 868-913, 2009.

MCCARTHY MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. **New England Journal Medicine**, v. 363, p. 2339-2350, 2010.

MCLAUGHLIN T, et al. Insulin resistance is associated with a modest increase in inflammation in subcutaneous adipose tissue of moderately obese women. **Diabetologia**, v. 51, p. 2303–2308, 2008.

MELKONYAN HS, et al. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 13636-13641, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis – DCNT – no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes e Recomendações para o Cuidado Integral de doenças crônicas não-transmissíveis no BRASIL: promoção da saúde, vigilância, prevenção e assistência, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância à Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

MIYAZAKI, Y., et al. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. E1135–E1143, 2002.

MOLLER DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 11, p. 212-217, 2000.

MOMOTA R, et al. Drosophila type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. **Matrix Biology**, v. 30, p. 258-266, 2011.

MONTAGUE CT, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, p. 903–908, 1997.

NEEL, JV. Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'? The **American Journal of Human Genetics**, v. 14, p. 353–362, 1962.

NICHOLS GA, GOMEZ-CAMINERO A. Weight changes following the initiation of new anti-hyperglycaemic therapies. *Diabetes Obesity Metabolism*, v. 9, p. 96-102, 2007.

NIEMELÄ S, et al. Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. In: ASHAMMAKHI N, REIS R, CHIellini F. (Org). *Topics in Tissue Engineering*. Vol. 4, Eds, p. 1-26, 2008.

O'HARA A, et al. Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 458, p. 1103–1114, 2009.

Oh SP, et al. Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1(XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21. **Genomics**, v. 19, p. 494-499, 1994.

OHSAKI, Y, et al. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, p. 399-407, 2009.

O'REILLY MS, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v. 79, p. 315-328, 1994.

PAPKOFF J, et al. Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. **Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 2128-2134, 1996.

PRENTKI M, NOLAN CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, p. 116, v. 1802-1812, 2006.

QUEIROZ, JCF. et al. Controle da Adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 582-594, 2009.

QUÉLARD D, et al. A cryptic frizzled module in cell surface collagen 18 inhibits Wnt/beta-catenin signaling. **PLoS One**, v. 3(4), p. e1878, 2008.

RAO TP, KÜHL M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for

more. *Circulation Research*, v. 106, p. 1798-1806, 2010.

RAYNER G, et al. Why are we fat? Discussions on the socioeconomic dimensions and responses to obesity. **Global Health**, v. 23, p. 6-7, 2010.

ROSEN ED, MACDOUGALD OA. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature reviews**, v. 7, p. 885-896, 2006.

ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 16, p. 145-171, 2000.

ROTTER V, NAGAEV I, SMITH U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45777-45784, 2003.

RUTKOWSKI JM, DAVIS KE, SCHERER PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. **FEBS J**, v. 276, p. 5738-5746, 2009.

SAVAGE DB, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Diabetes**, v.52, p. 910-917, 2003.

SCHAAN BA, SILVA AMV, IRIGOYEN MC. Disfunção endotelial no diabetes melito e estados de resistência à insulina: papel do estresse oxidativo e potenciais oportunidades terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, p. 514-515, 2010.

SCHWARTZ MW, et al. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? **Diabetes**, v. 52, p. 232-238, 2003.

SETHI JK, VIDAL-PUIG AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 1253-1262, 2007.

SKURK T, et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, p. 1023-1033, 2007.

SOKOL SY. Wnt signaling through T-cell factor phosphorylation. **Cell Research**, v. 21, p. 1002-1012, 2011.

SONNENBERG S, et al. Level of ex vivo interleukin 6 expression in human peripheral fat compared with other tissues. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 35, p. 314-319, 2008.

SPIEGELMAN BM; FLIER JS. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, p. 531-543, 2001.

STUNKARD AJ, et al. The body-mass index of twins who have been reared apart. **The New England Journal of Medicine**, v. 322, p. 1483-1487, 1990.

SUN K, KUSMINSKI KM, SCHERER PE. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 2094-2101, 2011.

SZENDROEDI, J. & RODEN, M. Ectopic lipids and organ function. *Current Opinion in Lipidology*, v. 20, p. 50–56, 2009.

TAIPALE J, BEACHY PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. **Nature**, v. 411, p. 349–354, 2001.

TAN CY, VIDAL-PUIG A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 935-940, 2008.

TCHERNOF A, et al. Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women Minor: Effect of Obesity and Body Fat Distribution. **Diabetes**, v. 55, p. 1353–1360, 2006.

TCHKONIA capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. E267–E277, 2005.

TCHKONIA T, et al. Increased TNF alpha and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein with aging predispose preadipocytes to resist adipogenesis. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, v. 292, p. E298-307, 2007.

TETSU O, MCCORMICK F: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, v. 398, p. 422-426, 1999.

TRAYHURN P, WANG B, WOOD IS. Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, p. 267-276, 2008.

UNOKI H, et al. Macrophages regulate tumor necrosis factor-alpha expression in adipocytes through the secretion of matrix metalloproteinase-3. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 902–911, 2008.

VAGUE J. La differentiation sexuelle, facteur determinante des formes de l'obésité. **Presse Médicale**, v. 55, p. 339-340, 1947.

VAISSE C, et al. A frameshift mutation in human *MC4R* is associated with a dominant form of obesity. **Nature Genetics**, v.20, p. 113–114, 1998.

VALASEK MA, REPA JJ. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p.151-159, 2005.

VEILLEUX A, et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. **Diabetes**, v. 60, p. 1504-1511, 2011.

VIGUERIE N, et al. Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. **Diabetologia**, v. 48, p.123–131, 2005.

VIRTANEN KA, et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 87, p. 3902–3910, 2002.

VIRTUE S, VIDAL-PUIG A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. **PLoS Biology**, v. 6, p. 1819-1823, 2008.

VOHL MC, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. **Obesity Research**, v. 12, p. 1217-1222, 2004.

VOIGHT BF, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large scale association analysis. **Nature Genetics**, v. 42, p. 579-589, 2010.

WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome, v. 21, p. 697-738, 2000.

WANG B, WOOD IS, TRAYHURN P. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 455, p. 479–492, 2007.

WANG S, et al. Subtyping obesity with microarrays: implications for the diagnosis and treatment of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 33, p. 481–489, 2009.

WANG, S., et al. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. **Cell**, v. 88, p. 757-766, 1997.

WEIR GC, BONNER-WEIR S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v. 53(Suppl 3), p. S16–21, 2004.

WEIR GC, et al. b-Cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. **Diabetes**, v. 50, p. S154–S159, 2001.

WHO (World Health Organization). Obesity and Overweight. Fact sheet n. 311. **Media Centre**, 2012a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Obesity. Situation and Trends. **Global Health Observatory**, 2012b. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/index.html>. Acesso em: out. 2012.

WILLERT K, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth

factors. **Nature**; v. 423, 448-52, 2003.

WRONSKA A, KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiologica**, v. 205, p. 194–208, 2012.

WYNN TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 524–529, 2007.

XING Z, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 311–320, 1998.

XU, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nature Neuroscience**, v. 6, p.736–742, 2003.

YANG LH, CHEN DF. Effects of TNF alpha on the expression of SCAP and triglyceride contents in cultured steatotic hepatocytes. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 15, p. 767-770, 2007.

YE J, GAO Z, YIN J, HE Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. E1118–1128, 2007.

YEO, G S., et al. A frameshift mutation in *MC4R* associated with dominantly inherited human obesity. **Nature Genetics**, v. 20, p.111–112, p. 1998.

YOST C, et al: The axisinducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. **Genes**, v. 10, p. 1443-1454, 1996.

YUN Z, et al. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. **Developmental Cell**, v. 2, p. 331-341, 2002.

ZHA, JM, et al. Comparison of Gene Transcription between Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Chinese Adults. **Endocrine Journal**, v. 56, p. 935-944, 2009.

ZHANG Y, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

4 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

4.1 CAPÍTULO 1

Expression analysis of *SFRP1* and *CEBPA* in adipose tissue of obese subjects with alteration in glucose tolerance.

Artigo submetido à revista *GENE*.

Expression analysis of *SFRP1* and *CEBPA* in adipose tissue of obese subjects with alteration in glucose tolerance.

Authors

Karine L Araujo-Dasilio¹, Elaine C Viana^{2,3}, Gustavo P S Miguel⁴, Fabiano H P Silva¹, Janine B Coimbra⁵, Flávia de Paula^{1,6}, Nazaré S Bissoli², Maria Rita S Passos-Bueno⁷, Flávia I V Errera^{1,5}

Address of each affiliation

1 Biotechnology Graduate Program, Federal University of Espirito Santo

Av. Marechal Campos, nº1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil. CEP: 29.040-090.

2 Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo

Av. Marechal Campos, nº1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil. CEP: 29.040-090.

3 Department of Nutrition, University Center Vila Velha

Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brazil. CEP: 29102-920.

4 Department of Obesity Surgery, Bariatric Surgery Program of the Cassiano Antonio Moraes University Hospital, Federal University of Espirito Santo

Av. Marechal Campos, nº1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil. CEP: 29.040-090.

5 Emescam College of Health Sciences

Av. Nossa Senhora da Penha, nº2190, Santa Luiza, Vitória, ES, Brazil. CEP: 29045-402.

6 Department of Biology, Federal University of Espirito Santo

Av. Marechal Campos, nº1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil. CEP: 29.040-090.

7 Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome Research Center,
University of São Paulo

Rua do Matão - Travessa 13, nº 106, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil. CEP:
05508-090.

E-mail address of each author

karinelaa@yahoo.com.br (Karine L Araujo-Dasilio); elainecviana@gmail.com (Elaine C
Viana); fabianohps@hotmail.com (Fabiano H P Honorato); gsoares@terra.com.br (Gustavo
P S Miguel); janine.coimbra@usp.br (Janine B Coimbra), flapvit@yahoo.com.br (Flávia de
Paula); naza@npd.ufes.br (Nazaré S Bissoli); passos@ib.usp.br (Maria Rita S Passos-
Bueno)

Corresponding author

Flávia I V Errera, PhD

Av. Nossa Senhora da Penha, nº2190, Vitória, Espírito Santo, ES, Brazil - 29045-402

e-mail: flavia.errera@emescam.br; flavia.errera@gmail.com

Telephone: 55 - 27- 33343595 and 55 - 27 - 99195218

Fax: 55 - 27- 3334-3509

ABSTRACT

The increasing worldwide prevalence of type 2 diabetes (T2D) has been associated with the increasing incidence of excessive weight gain and obesity. Depots of adipose tissue (AT) have distinct functional properties that differently impact on the health. Experimental evidence during the last decade has shown that *wingless-type* (WNT) signaling is crucial for adipogenesis. We hypothesize that alterations in the gene expression profile in the AT of obese subjects with glucose disorders (T2D and impaired glucose tolerance-IGT) might contribute to a diabetes milieu. Samples of subcutaneous (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) from women with severe obesity were excised during bariatric surgery. The patients were separated into T2D/IGT and normal glucose tolerance (NGT) groups. TNF- α in serum was measured using ELISA. We performed expression analysis of the genes implicated in Wnt signaling (*SFRP1*, *CEBPA*, *PPARG*) and inflammation (*IL-6*, *TNF- α* and *ADIPOQ*) from SAT and VAT using quantitative PCR. The expression of *CEBPA* was higher in SAT than in VAT in both groups, and the *CEBPA* mRNA levels in the SAT were higher in the T2D/IGT than those in the NGT. The expression of *SFRP1* in VAT was lower in the T2D/IGT than in the NGT. Furthermore, *SFRP1* expression in VAT was inversely associated with triglycerides. In summary, these results suggest that the protective effect of SAT expansion on metabolism might reflect, at least in part, the increased expression of *CEBPA* in SAT, and the reduced expression of *SFRP1* in VAT could induce might trigger metabolic complications, such as T2D. These finding provide new perspectives for the understanding glucose homeostasis disorders in obesity.

Keywords: diabetes, Wnt signaling, inflammation, *SFRP-1*, *CEBPA*

1. INTRODUCTION

Obesity, an inflammatory chronic condition with global epidemic, can cause insulin resistance and lead to type 2 diabetes (T2D)[1]. Depots of adipose tissue (AT), produce and secrete a variety of diverse bioactive mediators, or adipokines, such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) and adiponectin (ADIPOQ), that are important in several cell functions, including apoptosis, immunity, lipid and glucose metabolism and adipogenesis[2]. Alterations in adipokine expression can contribute to the pathophysiology and co-morbidities of obesity[3,4].

The activation of Wingless-type (Wnt)/b-catenin pathway inhibits adipogenesis through repressing the induction of CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*)[5], which are essential transcriptions regulators for the terminal differentiation of adipocytes[6]. The inhibition of newly emerging adipocytes leads to dysfunctional AT through adipocyte hypertrophy and might trigger metabolic complications, such as an insulin resistance and the accumulation of triglyceride-derived toxic metabolites in ectopic tissues[7-9].

In this context, we hypothesize that individuals with obesity and alterations in glucose tolerance exhibit alterations in gene expression in AT. The aim of this study was to verify whether the subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) of severely obese women with alterations in glucose tolerance exhibit differences in the expression of the genes *SFRP1*, *CEBPA*, *PPARG*, *IL-6*, *TNF- α* and *ADIPOQ* in, involved in adipogenesis and inflammation, compared with severely obese women with normal glucose tolerance (NGT). In addition, we measured the TNF- α in the serum of these women and assessed the correlation of these genes with clinical parameters.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Subjects

The Committee on Ethics in Human Research of the Federal University of Espírito Santo approved this study (protocol number 049/06) and written informed consent was obtained from each participant. A group of 32 women between 20-45 years of age was selected among patients (N=65) with class III obesity (defined based on body mass index (BMI) ≥ 40 kg/m²). These women were enrolled in the Bariatric Surgery Program of the Cassiano Antonio Moraes University Hospital/Federal University of Espírito Santo, Brazil. For the present study, the exclusion criteria included (a) inflammatory disease other than obesity, (b) infectious diseases, (c) hypo- or hyperthyroidism, (d) use of anti-obesity or anti-inflammatory medication at the time of the study and (e) they reported being postmenopausal.

The worldwide definition of metabolic syndrome, in accordance with the International Diabetes Foundation, was used to establish the diagnostic criteria for T2D, impaired glucose tolerance (IGT), hypertension and metabolic disorders[10]. To assess whether the SAT and VAT of women with severe obesity exhibit alterations in glucose tolerance and present differences on gene expression compared with NGT, we stratified these women into two groups: T2D/IGT (nT2D=5 and nIGT=6) and NGT (n=21). In the T2D/IGT group, 3 subjects were receiving antidiabetic therapy (n=2, metformin; n=1, metformin with insulin). There were no patients with impaired fasting glucose.

2.2 Anthropometry, body composition and biochemical parameters

All subjects were assessed according to the multidisciplinary clinical protocols of the Bariatric Surgery Program for data related to body weight (kg), BMI (kg/m²), waist and hip circumference (WC)[11], and percentage body fat (%BF) which were obtained through the electric bioimpedance method (EB), using a Body Stat® 5000 device. The SAT area was calculated using previously published equations[12]. Data related to the oral glucose test tolerance (OGTT) and fasting glucose, triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein

(HDL) and low-density lipoprotein (LDL) levels were analyzed according to the routine biochemical analyses of the hospital laboratory.

2.3 Serum measurements of TNF- α

Serum concentrations of TNF- α was determined through the Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) method using Invitrogen™ Human TNF- α UltraSensitive kits (intra-assay percentage average coefficient of variation - %CV= 5.9; inter-assay percentage average - %CV = 8.5; sensitivity <0.09 pg/mL). The plates were read on a DIAS microplate reader (Dynex Technologies The Microtiter® Company) at 450 nm. The absorbance values were used to calculate the TNF- α concentrations in pg/mL, using linear equations based on the standard curves.

2.4 Adipose tissue samples, RNA isolation and synthesis of cDNA

SAT from the abdominal wall and VAT from an omental site were collected during bariatric surgery. The AT samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. A total of 80-100 mg of SAT and VAT from 32 women was homogenized using a Tissue Ruptor (Qiagen, Valencia, CA), and total RNA was isolated using an RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The RNA quality and concentration were evaluated using @Nanodrop 1000 and 1% agarose gel electrophoresis. The cDNA was synthesized from 2000 ng of total RNA using Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C.

2.5 Quantitative PCR analysis

Quantitative PCR (qPCR) was used in order to verify the gene expression levels in SAT and VAT from women with severe obesity. A total of 1 μ l (30 ng) of each cDNA sample was mixed with 2.5 μ l of each 1 μ M primer, 12.5 μ l of 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and DNase/RNase-free water to a total volume of 25 μ l. The qPCR reactions were performed in triplicate using the ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System

(Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). The primers for the endogenous control genes succinate dehydrogenase complex, subunitA (*SDHA*), hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (*HPRT1*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and genes studied were described in Table 1. The cycle threshold (Ct) was defined as the cycle number at which a significant increase in fluorescence signal was first detected. The amplification efficiency (E) of each primer was calculated according to the equation $E=10^{(-1/\text{slope})}$. The GeNorm v3.4 program facilitated the use of all three endogenous genes to calculate the normalization factors for each sample[13]. The expression values were calculated according to Pfaffl[14].

2.6 Statistical Analysis

The data are presented as the means \pm the standard error of the mean (SEM) for the number of subjects indicated in the legends of the tables and figures. The fasting glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL and gene expression data were \log_{10} -transformed prior to analysis. The untransformed values are shown in the tables, but the statistical analyses were performed on the log-transformed values. Normality was evaluated using the D'Agostino-Pearson normality test. Fisher's exact tests were used to verify whether the frequency of comorbidities was different between the T2D/IGT and NGT groups. Student's paired t-test was used to compare the gene expression levels between the SAT and VAT. For the comparison between two groups with normally distributed data, the statistical significance was evaluated using Student's unpaired t-test. For non-parametrically distributed data, the Mann Whitney test was used. Pearson (r) and, when appropriate, Spearman (r_s) correlation coefficients were calculated to determine the strength of the associations. Data analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, California).

3. RESULTS

3.1 Subject characteristics

The data associated with anthropometry, body composition and the biochemical analysis in the T2D/IGT and NGT groups are presented in Tables 2 and 3. The occurrence of metabolic syndrome was more frequent in the T2D/IGT group than in the NGT group. The T2D/IGT group was distinct for age, fasting glucose, OGTT, hip circumference, waist-to-hip ratio, triglyceride, total cholesterol and LDL levels. No difference in the TNF- α serum concentration was observed between the groups.

3.2 Adipose tissue expression and its relationships with clinical variables

The expression levels of the *CEBPA* were higher in the SAT than in the VAT of both groups (Fig. 1). There were no differences between SAT and VAT of both groups for expression of *ADIPOQ*, *IL-6*, *PPARG*, *SFRP1* and *TNF- α* (Fig. 1). AT depots of T2D/IGT and NGT groups only displayed a distinct gene expression for *CEBPA* and *SFRP1*. The *CEBPA* mRNA in SAT was higher in the T2D/IGT group than in the NGT group; and the *SFRP1* expression in VAT was lower in the T2D/IGT group than in the NGT group (Fig. 1). The only correlations observed between the expression of genes and clinical variables were summarized in Figure 2.

3.3 Associations between the gene expression levels in VAT and SAT

In SAT, the *SFRP1* expression was positively correlated with *ADIPOQ* ($r=0.44$; $p=0.02$) and *CEBPA* expression ($r=0.42$; $p=0.03$). In VAT, *CEBPA* and *TNF- α* expression was inversely associated ($r=-0.48$, $p=0.01$); *SFRP1* expression was positively correlated with *PPARG* ($r=0.52$; $p=0.007$) and *ADIPOQ* ($r=0.40$, $p=0.04$) expression; the expression of *ADIPOQ* was positively associated with *IL-6* expression ($r_s=0.45$, $p=0.02$).

4. DISCUSSION

The increasing worldwide prevalence of T2D has been associated with the increasing incidence of excessive weight gain and obesity[1]. The impact of changes in AT function in obesity might be a risk for the development of T2D[4]. The present study compared the expression of genes involved in inflammation and adipogenesis in depots of AT from women with severe obesity with alterations in glucose tolerance and those with NGT.

Increasing age, waist circumference, waist-to-hip ratio and weight gain are risk factors for T2D[1]. Thus, the individuals in the T2D/IGT group were slightly older than those in the NGT group. Previous reports have not shown whether obesity or T2D are responsible for metabolic disorders, as most of the study participants with T2D were obese[3,15]. Moreover, the T2D and NGT groups comprised both women and men participants [3,16]. Therefore, the observed alterations of parameters in T2D patients might be influenced through excess AT and gender. Although all of the women in this study were classified with class III obesity, those with T2D/IGT presented the greatest waist-to-hip ratio and highest triglyceride, total cholesterol and LDL levels. Despite the fact that different waist-to-hip ratios were observed in both groups, the waist measurements were similar. Gluteal-femoral SAT depots in the hip exhibit protective effects in metabolism[17]; indeed, the hip circumference of NGT women was greater than those with T2D/IGT.

Corroborating evidence which showed that TNF- α is involved in insulin resistance[18] and synthesis of triglycerides[19], we observed that SAT *TNF- α* expression was positively correlated with fasting glucose and triglyceride levels. Increasing evidence have shown that TNF- α is a potent negative regulator of adipogenesis through promoting the stabilization of β -catenin, preventing the induction of *PPARG* and *CEBPA* expression[20]. In accordance with this data, we observed that both TNF- α in the serum and VAT *TNF- α* expression were inversely associated with VAT *CEBPA* expression. We also found that the *CEBPA* expression in SAT was higher than in VAT in both groups. In addition, the greatest

expression of *CEBPA* in the SAT of T2D/IGT obese patients might be a compensatory stimulus to increase adipogenesis avoiding metabolic diseases because enlarged adipocytes are more associated with insulin resistance and other complications than new fat cells[15, 21, 22].

Lagathu et al. (2010)[23] showed that *SFRP1* participates in human adipogenesis and it is also important for lipid accumulation. *SFRP1* antagonize Wnt signaling through binding and sequestering Wnt from receptors[24], then the reduction of *SFRP1* expression might contribute to the reduction of adipogenesis and increases of hypertrophic adipocytes that trigger to metabolic complications[15, 21, 22]. In addition, current evidence pointed that *SFRP1* mRNA levels were altered in obesity, correlated positively with insulin sensitivity and increased the release of adiponectin [25]. For the first time, we showed that the VAT *SFRP1* expression was lower in women with T2D/IGT than those with NGT and it was negatively correlated with triglyceride levels. We also verified that *CEBPA*, *PPARG* and *ADIPOQ* expression were positively correlated with *SFRP1* expression.

The main challenge of this study was the exclusion of obese T2D women in postmenopausal period. As a result, we performed this study with IGT, a state recognized as being a stage before diabetes, and T2D patients with different duration of disease, which might interfere with gene expression levels. Nevertheless, the results in this paper might reflect the early state of T2D, because about half the group was comprised of women with IGT and those with T2D had short duration of diabetes, since they are relatively young. In addition, habitual physical activity was not controlled between the two groups. Physical activity affects adipokine and inflammatory marker levels[26], improves blood glucose control and prevents or delays T2D[27]. Consequently, these factors could complicate the interpretation of these findings.

5. CONCLUSIONS

Our results provide new insight into contribution of the depot-specific AT to T2D/IGT in obesity. *CEBPA* mRNA expression was higher in SAT than in VAT of all women and it was highest in women with T2D/IGT. *SFRP1* mRNA expression in VAT was lower in T2D/IGT than NGT group. These data showed that Individuals with severe obesity and alterations in glucose tolerance exhibited difference in expression of *CEBPA* and *SFRP1* pro-adipogenic genes. These finding offer new perspectives for the characterization of arising disorders in homeostasis glucose in obesity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Gerson S Kobayashi for friendship in laboratory at the University of São Paulo, the members of the Laboratory of Experimental Hypertension of the Department of Physiological Sciences/UFES and the NDI/UFES (Center of Infectious Diseases), the students of the EMESCAM College of Health for the collection of the samples and Ms. Ilma O`Reilly for monitoring the follow-up studies, and members of the Bariatric Surgery Program of the Hospital and Clinics at the Federal University of Espírito Santo for logistical support. This research has received funding from the Agency for the Development of Science and Technology of Espírito Santo (Fapes) and of São Paulo (Fapesp) and the National Council for the Development of Science and Technology (CNPq-Casadinho-Procad/Edital 06, Ref. 552672/ 2011-4/MCTI/MEC/CAPES). Araujo-Dasilio, KL was the recipient of a PhD grant from Fapes.

REFERENCES

1. International Diabetes Foundation (IDF). (2012). Diabetes Atlas fifth edition. Available at <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed 15 November 2012.

2. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. (2010) The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010:1-19.
3. Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity* 18: 884-889.
4. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29: 2959-2971.
5. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, et al. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-953.
6. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. (2009) Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20: 16-24.
7. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. (2000) Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 43:1498-1506.
8. Virtue S, Vidal-Puig A. (2008) It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 6: 1819-1823.
9. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, et al. (2010) Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes*. 59(1):105-9.
10. International Diabetes Foundation (IDF). (2006) The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. Available at http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf. Accessed 10 February 2012.
11. Callaway CW, Chumlea WC, Bouchard C, et al. (1988) Standardization of anthropometric measurements. In: Lohman T, Roche A, Martorel R, eds. *The Airlie (VA) Consensus Conference*. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, 39-80.
12. Bonora E, Micciolo R, Ghiatas AA, Lancaster JL, Alyassin A, et al. (1995) Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? *Metabolism* 44: 1617-1625.

13. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1-12.
14. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. (2001) *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.
15. Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, et al. (2004) Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia* 47: 1029-1037.
16. Doupis J, Rahangdale S, Gnardellis C, Pena SE, Malhotra A, et al. (2011) Effects of Diabetes and Obesity on Vascular Reactivity, Inflammatory Cytokines, and Growth Factors. *Obesity* 19: 729-735.
17. Lemieux I. (2004) Energy partitioning in gluteal-femoral fat: does the metabolic fate of triglycerides affect coronary heart disease risk? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 795-797.
18. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. (2000) *Trends Endocrinol Metab* 11: 212-217.
19. Yang LH, Chen DF. Effects of TNF alpha on the expression of SCAP and triglyceride contents in cultured steatotic hepatocytes. (2007) *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 15: 767-770.
20. Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK. (2007) Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* 14: 1361-1373.
21. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, et al. (2010) Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes*. 59(1):105-9.
22. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, Laberge PY, Tchernof A. (2011) Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes* 60: 1504-1511.

23. Lagathu C, Christodoulides C, Tan CY, Virtue S, Laudes M, et al. (2010) Secreted frizzled-related protein 1 regulates adipose tissue expansion and is dysregulated in severe obesity. *Int J Obes* 34: 1695-1705.
24. Kawano Y, Kypta R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116: 2627-2634.
25. Ehrlund A, Mejhert N, Lorente-Cebrián S, Aström G, Dahlman I, Laurencikiene J, et al. (2013) Characterization of the Wnt Inhibitors Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRPs) in Human Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. [Epub ahead of print]
26. You T, Nicklas BJ. (2008) Effects of exercise on adipokines and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 8: 7-11.
27. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, et al. (2010) Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes Care* 33: 2692-2696.

Table 1: qPCR primers to measure targets transcripts levels of genes studied and endogenous control genes.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>ADIPOQ</i>	CCCTGGTGAGAAGGGTGAGA	AAAGCCTCGGGGACCTTCAG
<i>CEBPA</i>	CATTGTCACTGGTCAGCTCCA	AAGAACAGCAACGAGTACCGG
<i>IL-6</i>	AATTCGGTACATCCTCGACG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGC
<i>PPARG</i>	GGGGGTGATGTGTTTGAAGT	GCGATCTTGACAGGAAAGACA
<i>SFRP1</i>	CAGCGAGTTTGCACTGAGGA	GTCCTTCTTCTTGATGGGCC
<i>TNF-α</i>	TCTCGACTTTGCCGAGTCTG	CGTTTGGGAAGGTTGGATGT
<i>SDHA</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>GAPDH</i>	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT	TTCTCCATGGTGGTGAAGAC

All sequences are listed from 5' to 3'. *ADIPOQ*: Adiponectin. *CEBPA*: CCAAT/enhancer binding protein alpha. *IL-6*: Interleukin 6. *PPARG*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *SFRP1*: Secreted frizzled-related protein 1. *TNF- α* : Tumor necrosis factor- α . *SDHA*: Succinate dehydrogenase complex, subunit A. *HPRT1*: Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 and *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Table 2: Characteristics of women of NGT (n=21) and T2D/IGT (n=11) groups.

Co-morbidities	NGT	T2D/IGT	p value
	n (%)	n (%)	
Metabolic syndrome	13 (62)	11 (100)	0.03*
Hypertension	14 (67)	9 (82)	0.44
Dyslipidemia			
TG \geq 150 mg/dL	6 (29)	6 (55)	0.25
TC > 200 mg/dL	5 (24)	7 (64)	0.05
HDL \leq 50 mg/dL	18 (86)	10 (91)	1.0
LDL > 100 mg/dL	11 (52)	9 (82)	0.14
Glucose disorders			
T2D	0 (0)	5 (45)	-
IGT	0 (0)	6 (55)	-

NGT: Normal glucose tolerance group. T2D/IGT: Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance group. TG: Triglycerides. TC: Total cholesterol. HDL: High-density lipoprotein. LDL: Low-density lipoprotein. All statistical comparison was performed with Fisher's exact test, *p<0.05.

Table 3: Anthropometry, body composition and biochemical parameters of women of the NGT and T2D/IGT groups

Variables	NGT (n=21)		T2D/IGT (n=11)		p value
	Mean±SEM	Range	Mean±SEM	Range	
Age (years)	34.3 ± 1.0	25-42	37.8 ± 1.9	21-43	0.03*
Weight (kg)	113.5 ± 2.6	97-139	108.5 ± 2.4	92.7-121.9	NS
BMI (kg/m ²)	42.7 ± 0.4	40-44.9	41.9 ± 0.5	40-44.9	NS
Waist circumference					
(cm)	119.8 ± 1.5	107-138	121.3 ± 1.8	112-133	NS
Hip circumference (cm)	133.6 ± 1.68	118 -145	125.6 ± 1.16	119 -134	0.00**
Waist-to-hip ratio	0.89 ±0.01	0.78-0.99	0.97 ±0.02	0.87-1.1	0.00**
Body fat (kg)	56 ± 1.6	42.6-72.4	52.4 ± 1.4	46-60	NS
%Body fat	49.3 ± 0.6	41-52.1	48.3 ± 0.7	42.8-50.7	NS
Fasting glucose (mg/dL)	87.5 ± 1.9	70-105	139.5 ± 21.7	76-320	0.00***
OGTT (mg/dL)	100 ± 4.2	63-137	191.9 ± 21.1 ^a	145-379	0.00***
Triglycerides (mg/dL)	126.2 ± 10.4	68-228	397.5 ± 0.4	68-2180	0.02*
Total cholesterol					
(mg/dL)	176 ± 7.5	104-258	243 ± 30.3	137-481	0.00**
HDL (mg/dL)	43.3 ± 2.3	29-74	38.3 ± 3.8	16-64	NS
LDL (mg/dL)	106.8 ± 7.9	27.6-167	150.1 ± 18.9	78-289	0.02*
IL-6 (pg/mL)	3.12 ± 0.36 ^b	1.40-5.64	3.96 ± 0.36 ^c	1.95-6.34	NS
TNF-α (pg/mL)	0.73 ± 0.15 ^d	0.09-1.77	1.08 ± 0.23 ^c	0.10-1.77	NS

NGT: Normal glucose tolerance group. T2D/IGT: Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance group. BMI: Body mass index. OGTT: Oral glucose tolerance test. HDL: High-density lipoprotein. LDL: Low-density lipoprotein. IL-6: Interleukin 6. TNF-α: Tumor necrosis factor-α. All statistical comparison was performed with Student's unpaired t test, except for age and %body fat that was performed with Mann Whitney test,*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. ^an=9. ^bn=13. ^cn=7. ^dn=15.

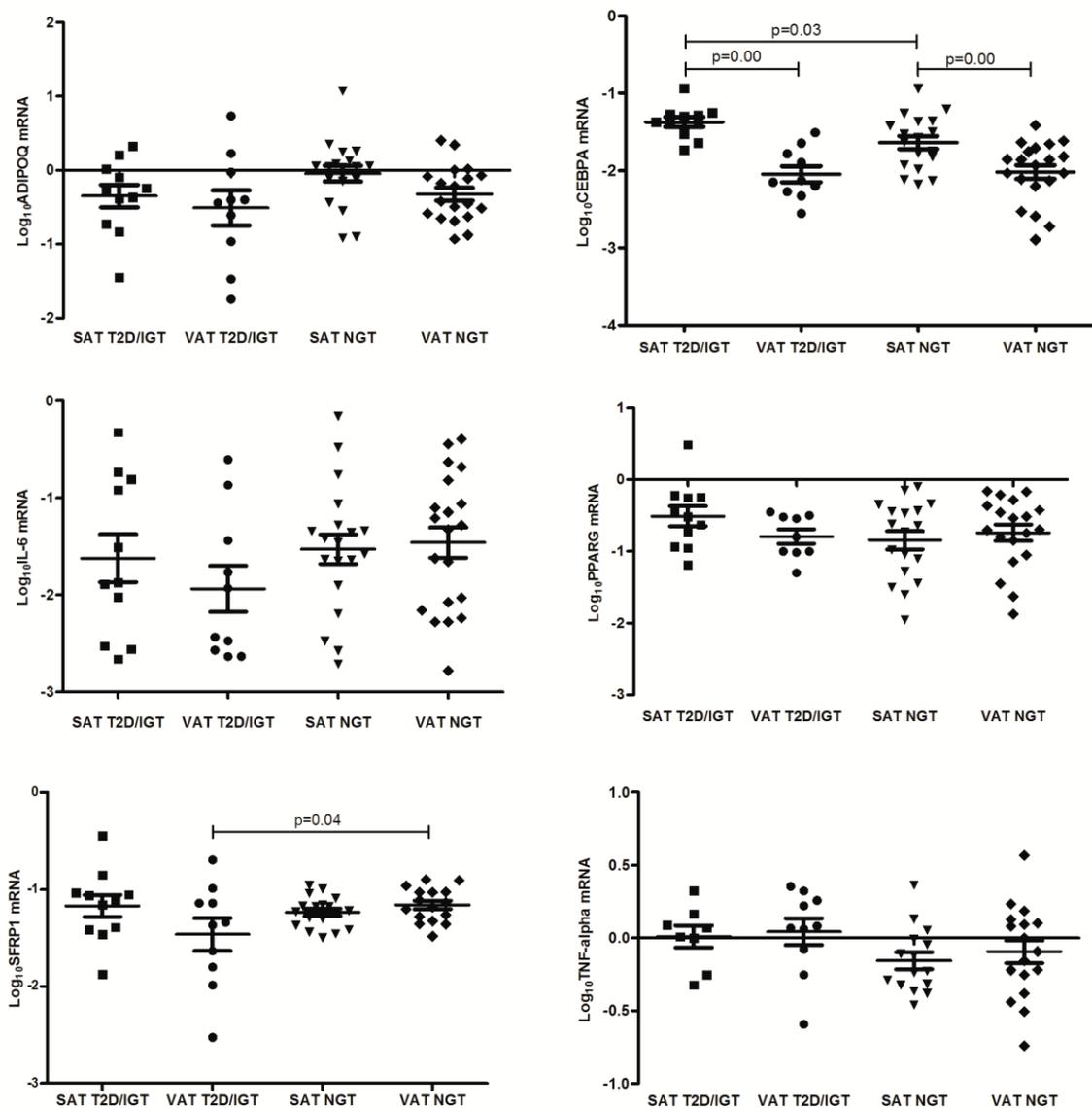


Figure 1: SAT and VAT mRNA expression in women with type 2 diabetes (T2D) and impaired glucose tolerance (IGT) compared with normal glucose tolerance (NGT). ADIPOQ: Adiponectin. IL-6: Interleukin 6. TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha. CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha. PPARG: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma. SFRP1: Secreted frizzled-related protein 1. SAT: Subcutaneous adipose tissue. VAT: Visceral adipose tissue.

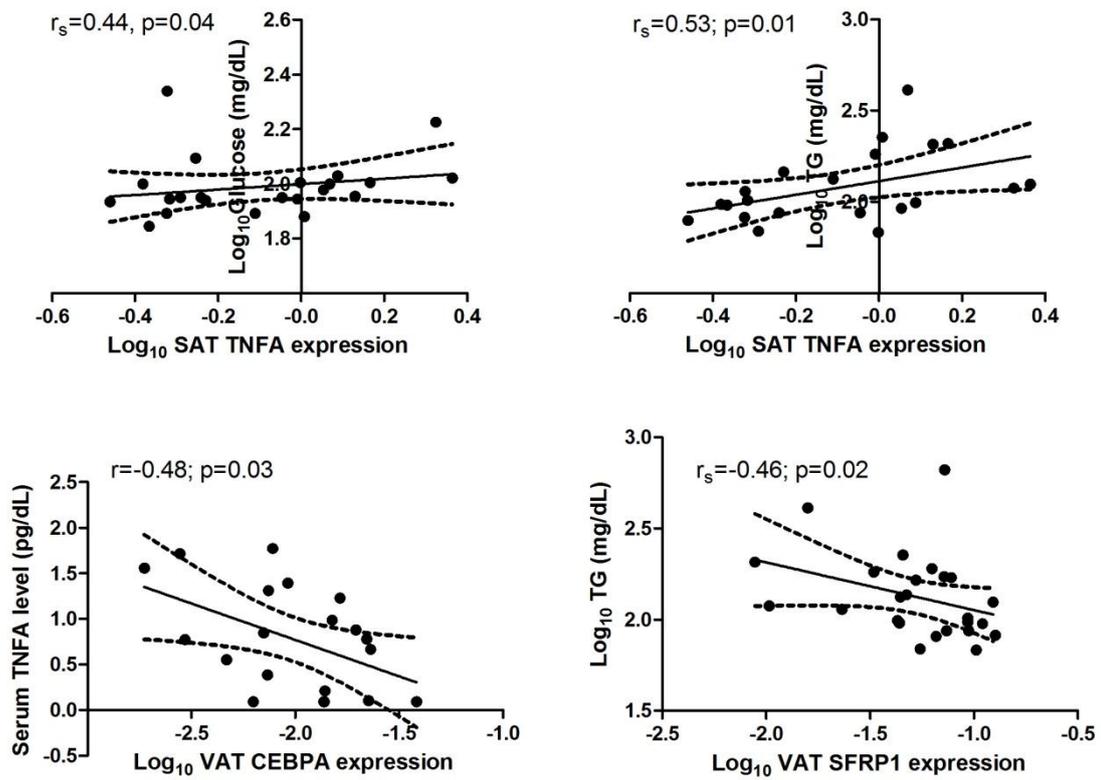


Figure 2: Correlation between gene expression and clinical parameters. TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha. CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha. SFRP1: Secreted frizzled-related protein 1. TG: Triglycerides. SAT: Subcutaneous adipose tissue. VAT: Visceral adipose tissue. Dotted lines represent the 95% Confidence interval.

4.2 CAPÍTULO 2

***COL18A1* expression in visceral adipose tissue: Better clinical outcomes in women with severe obesity?**

Artigo submetido à revista *Obesity Surgery*.

***COL18A1* expression in visceral adipose tissue: Better clinical outcomes in women with severe obesity?**

Original Contributions

Authors: Karine L Araujo-Dasilio, MSc; Elisardo C Vasquez, PhD; Nazaré S Bissoli, PhD; Gustavo P S Miguel, MD, PhD; João L de Azevedo, MD, PhD; Elaine C Viana, PhD; Leonardo C Pereira, BA; Flávia de Paula, PhD; Maria Rita S Passos-Bueno, PhD; Flávia I V Errera, PhD.

Karine L Araujo-Dasilio, MSc

Federal University of Espírito Santo. Biotechnology Graduate Program. Rua Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil - 29040-090.

Emescam College of Health Sciences. Laboratory of Molecular Genetics. Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Vitória, ES, Brazil - 29045-402.

e-mail: karinelaa@yahoo.com.br

Elisardo C Vasquez, PhD

Federal University of Espírito Santo. Laboratory of Transgenes and Cardiovascular Control. Rua Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil - 29040-090.

Emescam College of Health Sciences. Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Vitória, ES, Brazil - 29045-402.

e-mail: elisardo.vasquez@emescam.br

Nazaré S Bissoli, PhD

Federal University of Espírito Santo. Laboratory of Experimental Hipertension. Rua Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil - 29040-090.

e-mail: naza@npd.ufes.br

Gustavo P S Miguel, MD, PhD

Federal University of Espírito Santo. Department of Obesity Surgery. Rua Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil - 29040-090.

e-mail: gsoaresp@terra.com.br

João L de Azevedo, MD, PhD

Federal University of São Paulo. Department of Surgery. Rua Sena Madureira, 1500 - Vila Mariana, São Paulo, 04021-001.

e-mail: jozevedo.dcir@epm.br

Elaine Cristina Viana, PhD

Federal University of Espírito Santo. Laboratory of Experimental Hipertension. Rua Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil - 29040-090.

e-mail: elainecviana@gmail.com

Leonardo C Pereira, BA

Emescam College of Health Sciences. Laboratory of Molecular Genetics. Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Vitória, ES, Brazil - 29045-402.

e-mail: leocosper@ig.com.br

Flávia de Paula, PhD

Federal University of Espírito Santo. Laboratory of Molecular and Human Genetics. Rua Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil - 29040-090.

e-mail: flapvit@yahoo.com.br

Maria Rita S Passos-Bueno, PhD

University of Sao Paulo. Human Genome Center. Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience -USP. Rua do Matão, Travessa 13, nº106, Cidade Universitária, SP, Brazil – 05508-090.

Corresponding author:

Flávia I V Errera, PhD

Emescam College of Health Sciences. Laboratory of Molecular Genetics. Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Vitória, ES, Brazil - 29045-402

e-mail: flavia.errera@emescam.br; flavia.errera@gmail.com

Telephone: 55 - 27- 33343595 and 55 - 27 - 99195218

Fax: 55 - 27- 3334-3509

Short title: *COL18A1* and outcomes in obesity

Acknowledgements

The authors would like to thank Gerson S Kobayashi for friendship in laboratory at the University of Sao Paulo, Ms. Ilma O'Reilly for monitoring the follow-up studies, and members of the Bariatric Surgery Program of the Hospital and Clinics at the Federal University of Espírito Santo for logistical support. This research has received funding from

the Agency for the Development of Science and Technology of Espírito Santo (Fapes) and of Sao Paulo (Fapesp) and the National Council for the Development of Science and Technology (CNPq-Casadinho-Procad/Edital 06, Ref. 552672/ 2011-4/MCTI/MEC/CAPES). Karine L Araujo-Dasilio was the recipient of a PhD grant from Fapes.

ABSTRACT

Introduction/Purpose: Collagen XVIII (COL18A1) is highly expressed during human adipogenesis. Our aim was to evaluate the associations between SAT and VAT *COL18A1* expression and clinical parameters. **Materials and Methods:** SAT and VAT samples were collected from 16 non-diabetic women with severe obesity during bariatric surgery. Analysis of *COL18A1* expression was performed by quantitative PCR. Biochemical levels were analyzed in the hospital laboratory and the body composition was measured through electric bioimpedance. **Results:** An analysis of *COL18A1* levels showed that in 6 out of 16 patients were 1.5-fold higher in SAT than in VAT. After separating the patients into two groups with SAT/VAT *COL18A1* expression ratios of ≥ 1.5 (group H) and < 1.5 (group L), group H showed lower values of body mass index, % body fat and SAT area compared with group L. Further, SAT *COL18A1* expression was negatively correlated with SAT area and % body fat. Group L showed lower values of oral glucose tolerance than group H. VAT *COL18A1* expression was inversely correlated with fasting glucose and positively correlated with HDL levels. **Conclusion:** Our data show that highest *COL18A1* expression in VAT seems to lead to better clinical outcomes in women with obesity.

Keywords: obesity, *COL18A1*, adipogenesis, visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue

INTRODUCTION

The dynamic extracellular matrix (ECM) protein composition of adipose tissue (AT) is essential for the normal function of adipocytes[1]. An important component of the basement membrane of the ECM is a non-fibrillar collagen XVIII (*COL18A1*), a proteoglycan[2,3]. *COL18A1* cleavage results in two small fragments called endostatin[4] and frizzled motif domain (FZC18)[5], which have been shown to be active in several cell processes, including proliferation, apoptosis and adipogenesis, through the inhibition of *wingless-type* (Wnt) signaling pathways[6-9]. Experimental evidence during the last decade has shown that Wnt signaling is crucial for adipogenesis. The activation of this pathway translocates β -catenin into the nucleus, where it binds to members of the T-cell factor/lymphoid-enhancing factor (TCF/LEF) family and coactivates expression of Wnt target genes[10,11]. The functional results of this signaling pathway is the inhibition of adipogenesis via the blockade of CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*) and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*), which are essential transcriptional regulators of adipocyte differentiation[12-14].

We have previously demonstrated that *COL18A1* is highly expressed during human adipocyte differentiation and that SNP c.1136C>T in the FZC18 domain is associated with obesity in type 2 diabetic patients[15]. However, it might be important to investigate whether *COL18A1* is involved in obesity independent of diabetes, and if *COL18A1* shows different associations in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue. Therefore, we tested the hypothesis that *COL18A1* expression in the SAT and VAT is associated with clinical parameters in non-diabetic women with severe obesity. In addition, we investigated whether the *PPARG* and *CEBPA* expression in AT is associated with *COL18A1* expression.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The Committee on Ethics in Human Research of the Federal University of Espírito Santo approved this study (protocol number 049/06) and written informed consent was obtained from each participant. A group of 16 women with class III obesity (defined based on body mass index (BMI) ≥ 40 kg/m²), and the women were admitted to the Bariatric Surgery Program of Hospital and Clinics of the Federal University of Espírito Santo. For the present study, the exclusion criteria included (a) type 2 diabetes or impaired glucose tolerance, (b) inflammatory disease other than obesity, (c) infectious diseases, (d) hypo- or hyperthyroidism, (e) use of anti-obesity or anti-inflammatory medication at the time of the study, or if (f) they reported being postmenopausal.

The worldwide definition of metabolic syndrome, in accordance with the International Diabetes Foundation[16], was used to establish the diagnostic criteria for glucose disorders and metabolic syndrome. The American Association of Clinical Endocrinologists' guidelines for the management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis (AACE)[17] were used to establish the diagnostic criteria for lipid disorders. Lipid concentrations were classified as follows: Total cholesterol (TC) <200 mg/L=optimal, 200-239 mg/L=borderline and ≥ 240 mg/L=very high-risk; Low-density lipoprotein (LDL) <100 mg/dL=optimal, 100-149 mg/L=borderline and 200-239 mg/L=very high-risk; High-density lipoprotein (HDL) <50 mg/L=very high-risk, >60 mg/L=optimal and Triglycerides (TG) <150 mg/dL=optimal, 150-199 mg/L=borderline and 200-499 mg/L=very high-risk. Arterial hypertension was defined as systolic pressure ≥ 140 mmHg and/or diastolic pressure ≥ 90 mmHg or if the patient was using anti-hypertensive medication.

Anthropometry, body composition and biochemical parameters

All subjects were assessed according to the multidisciplinary clinical protocols of the Bariatric Surgery Program for data related to body weight (kg), BMI (kg/m^2), waist and hip circumference, and percentage body fat (%BF), which were obtained through the electric bioimpedance method using a Body Stat® 5000 device. The SAT area was calculated using previously published equations[18]. The oral glucose test tolerance (OGTT) and fasting glucose, TG, TC, HDL and LDL levels were analyzed according to the routine biochemical analyses of the hospital laboratory.

Adipose tissue samples, RNA isolation and synthesis of cDNA

SAT from the abdominal wall and VAT from an omental site were collected during bariatric surgery. The AT samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. A total of 80-100 mg of samples from women was homogenized using a Tissue Ruptor (Qiagen, Valencia, CA), and the total RNA was isolated using an RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The RNA quality and concentration were evaluated using @Nanodrop 1000 and 1% agarose gel electrophoresis. The cDNA was synthesized from 2000 ng of total RNA using Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C .

Quantitative PCR analysis

Quantitative PCR (qPCR) was used to verify the relative gene expression levels in SAT and VAT from patients. A total of 1 μL (30 ng) of each cDNA sample was mixed with 2.5 μL of each 1 μM primer, 12.5 μL of 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA) and DNase/RNase-free water to a total volume of 25 μL . The qPCR

reactions were performed in triplicate using the ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems). The primers for the succinate dehydrogenase complex, subunit A (*SDHA*), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), *PPARG*, *CEBPA* and *COL18A1* genes were designed according to Errera et al.[17]. The cycle threshold (Ct) was defined as the cycle number at which a significant increase in fluorescence signal was first detected. The amplification efficiency (E) of each primer was calculated according to the equation $E=10^{-1/\text{slope}}$. The GeNorm v3.4 program facilitated the use of all three endogenous genes to calculate the normalization factors for each sample[19]. The expression values were calculated according to Pfaffl[20].

Statistical Analysis

The data are presented as the means \pm the standard error of the mean (SEM) for the number of subjects indicated in the legends of the tables and figures. Normality was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov normality test. Because the HDL data were not normally distributed, this variable was \log_{10} -transformed prior to analysis. For comparison between the two groups with normally distributed values, statistical significance was evaluated with Student's *t* test for independent samples. For non-parametric data (e.g., % BF, body fat mass and triglycerides), the Mann Whitney test was used. Student's *t* tests for paired samples were used for comparisons between SAT and VAT gene expression levels. The Pearson (*r*) correlation coefficient was calculated to determine the strength of associations. Significance was accepted at $P<0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 for Windows (version 5.00.288).

RESULTS

Patient characteristics

Table 1 summarizes the anthropometric and biochemical parameters of the patients. The subjects averaged 35 ± 5 years of age. Only 2 out of the 16 women did not have dyslipidemia: 13 were classified as having very high-risk HDL concentrations; 1 was classified as having very high-risk LDL concentrations and 6 were classified as borderline for LDL; 1 was classified as having very high-risk TC concentrations and 4 were classified as borderline; and 1 was classified as very high-TG concentrations and 1 was classified as borderline. None of them presented a common form of dyslipidemia characterized by three lipid abnormalities: elevated TG and LDL and reduced HDL. Although none of the subjects was diagnosed with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance (exclusion criterion), it is important to note that 9 subjects had metabolic syndrome. Hypertension was observed in 11 women.

Clinical parameters and gene expression of COL18A1

The statistical analysis showed that the relative *COL18A1* expression levels were similar in SAT and VAT (SAT: 0.319 ± 0.039 vs. VAT: 0.256 ± 0.038 , $P=0.113$). Despite this finding, we noted that in 6 out of 16 patients, the *COL18A1* mRNA levels were at least 1.5 times higher in SAT than in VAT, with range of 1.60 to 8.10 (Table 2).

Based on literature evidence indicating that (i) the remodeling of the ECM is critical for the expansion of AT and (ii) there is a possible protective effect of the expansion of the SAT compared to VAT on metabolism, we assessed whether a higher SAT *COL18A1*/VAT *COL18A1* expression ratio is related to clinical parameters in women with severe obesity. To address this question, the patients were separated into two groups: (a) those who have 1.5 times or greater *COL18A1* expression levels in SAT relative to VAT [$SAT/VAT\geq 1.5$ (group

H)] and (b) those who have lower values in SAT than in VAT [SAT/VAT<1.5 (group L)] (Table 2). Figure 2 summarizes the differences in clinical parameters among women in groups H and L. Group H exhibited lower BMI (41.7 ± 0.7 kg/m²) than group L (43.4 ± 0.3 kg/m², $P=0.026$). Moreover, group H had significantly lower values of % BF (47.2 ± 1.3) and SAT area (763 ± 16 cm²) compared with group L (50.3 ± 0.5 , $p=0.042$ and 808 ± 10 cm², $P=0.026$). Indeed, SAT *COL18A1* mRNA was negatively correlated with SAT area ($r=-0.54$; $P=0.030$) and % BF ($r=-0.52$; $P=0.040$).

Among the biochemical parameters examined, no difference in blood glucose was observed between group H (92.5 ± 1.8 mg/dL) and group L (84 ± 3.2 mg/dL, $P=0.071$). Nevertheless, OGTT showed significantly higher values in members of group H (115.5 ± 3.6 mg/d) than in members of group L (95.1 ± 4 mg/dL, $P=0.004$) and *COL18A1* mRNA in VAT was inversely correlated with fasting glucose ($r=-0.55$; $P=0.026$).

When we use the criterion of a SAT *COL18A1*/VAT *COL18A1* expression ratio of ≥ 2 , we observed that 11 women were in the range of SAT/VAT < 2 and 5 were in the range of SAT/VAT ≥ 2 . It is remarkable that women with the lowest SAT/VAT ratio presented higher BMI (43 ± 0.3 kg/m²) and SAT area (804 ± 1.0 cm²) than those with SAT/VAT ratios ≥ 2 (41 ± 0.8 kg/m², $P=0.046$ and 707 ± 2.0 cm², $P=0.037$). In addition, the group with SAT/VAT ratios < 2 also had lower OGTT (97 ± 4 mg/dL) than those with SAT/VAT ratios ≥ 2 (115 ± 4 mg/dL, $P=0.021$).

A positive correlation between VAT *COL18A1* expression levels and HDL levels ($r=0.65$; $P=0.006$) was observed. Indeed, the patients with low HDL (< 40 mg/dL) had the lowest relative levels of VAT *COL18A1* expression (0.172 ± 0.054) compared with patients with high HDL (≥ 40 mg/dL) (0.322 ± 0.044 , $P=0.048$). This association was not observed in SAT (data

not shown). No significant difference in *COL18A1* mRNA was observed when subjects with high LDL levels and normal LDL values were compared, and the same result was observed when subjects with and without metabolic syndrome and hypertension were compared (data not shown). It was not possible to analyze the *COL18A1* expression differences between individuals with and without changes in TG levels because only 2 women had abnormal levels of TG.

Further, we evaluated whether there was an association between *COL18A1* expression and adipogenesis-related genes. No significant correlation between *COL18A1* expression and *CEBPA* (SAT: $r=-0.21$, $p=0.421$; VAT: $r=-0.05$; $P=0.868$) or *PPARG* (SAT: $r=-0.13$, $P=0.631$; VAT: $r=-0.16$, $P=0.550$) were detected in depots of AT.

DISCUSSION

The aim of this study was to examine *COL18A1* expression levels in depots of AT from women with class III obesity. This is the first time that AT depot-specific expression of *COL18A1* has been reported in humans. We found significant associations between the levels of *COL18A1* expression in both SAT and VAT and clinical parameters.

Although recent studies have shown that gene expression-related metabolism dysfunction in patients with obesity is more strongly associated with VAT than with SAT[21], we noted that the patients with higher *COL18A1* expression levels in SAT than in VAT exhibited significantly higher levels of OGTT. It is remarkable that this same group has the lowest area of SAT, a specific fat depot that has been related to protective effects in metabolism[22]. Interesting, we observed that *COL18A1* mRNA in SAT was inversely correlated with SAT area and % BF, whereas *COL18A1* mRNA in VAT was inversely correlated with fasting

glucose. These data suggest that the expression of *COL18A1* in SAT might interfere with the expansion of SAT, whereas in VAT, the expression of *COL18A1* might be related to protective effect on initial alterations in glucose metabolism in obesity, because even both groups showing no changes in glucose tolerance, OGTT revealed that the Group L is more tolerant to glucose than Group H.

We observed a positive correlation of VAT *COL18A1* mRNA with the concentration of HDL. Although existing evidence suggests that *COL18A1* has important functions in the metabolism of lipids, including LDL and TG[23-25], there is a lack of studies relating of the relationship between *COL18A1* and HDL. Additional studies might clarify whether *COL18A1* in AT can act as a proteoglycan involved in the metabolism of HDL.

Inappropriate expansion of AT, which is characterized by hypertrophic adipocytes, may trigger metabolic complications, such as insulin resistance[26] and altered lipid profile[27]. To investigate whether *COL18A1* expression is correlated with the expression of the majors transcriptional regulators of adipogenesis, we verified whether *COL18A1* mRNA was related to the expression of *CEBPA* and *PPARG* in SAT and VAT; however, we did not find a significant association between the expression levels of these genes.

The main challenge of this study was the inclusion of women with class III obesity and with normal glucose tolerance. As a result, the small sample size is a major limiting factor to this study. In summary, despite high BMI and body fat, women with severe obesity who have high *COL18A1* expression in VAT seem to have better glucose and HDL levels and other outcomes, most likely due to a large area of SAT, which is a depot of AT related to protective metabolic effects. Thus, further investigation should be performed to clarify the role of

COL18A1 in expansion of AT and metabolism of carbohydrate and lipid in subjects with obesity.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Apr;67(8):1277-92. doi: 10.1007/s00018-010-0263-4. Epub 2010 Jan 27. Review. PubMed PMID: 20107860; PubMed Central PMCID: PMC2839497.
2. Oh SP, Warman ML, Seldin MF, Cheng SD, Knoll JH, Timmons S, Olsen BR. Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1(XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21. *Genomics.* 1994 Feb;19(3):494-9. PubMed PMID: 8188291.
3. Halfter W, Dong S, Schurer B, Cole GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem.* 1998 Sep 25;273(39):25404-12. PubMed PMID: 9738008.
4. Elamaa H, Snellman A, Rehn M, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif. *Matrix Biol.* 2003 Sep;22(5):427-42. PubMed PMID: 14614989.
5. Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *J*

- Cell Biol. 2002 Aug 5;158(3):529-39. Epub 2002 Jul 29. PubMed PMID: 12147676; PubMed Central PMCID: PMC2173844.
6. Quélard D, Lavergne E, Hendaoui I, Elamaa H, Tiirola U, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Clément B, Musso O. A cryptic frizzled module in cell surface collagen 18 inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One*. 2008 Apr 2;3(4):e1878. doi: 10.1371/journal.pone.0001878. PubMed PMID: 18382662; PubMed Central PMCID:PMC2270346.
 7. Momota R, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A. *Drosophila* type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol*. 2011 May;30(4):258-66. doi: 10.1016/j.matbio.2011.03.008. Epub 2011 Apr 6. PubMed PMID: 21477650.
 8. Hendaoui I, Lavergne E, Lee HS, Hong SH, Kim HZ, Parent C, Heuzé-Vourc'h N, Clément B, Musso O. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by a soluble collagen-derived frizzled domain interacting with Wnt3a and the receptors frizzled 1 and 8. *PLoS One*. 2012;7(1):e30601. doi: 10.1371/journal.pone.0030601. Epub 2012 Jan 27. Erratum in: *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/annotation/bd37b3ad-c242-4e77-9ef3-8e92d1f105f5. PubMed PMID: 22303445; PubMed Central PMCID: PMC3267734.
 9. Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2012 Oct 1;370(1):71-85. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.016. Epub 2012 Jul 25. PubMed PMID: 22842099.
 10. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Jan;20(1):16-24. doi: 10.1016/j.tem.2008.09.002. Epub 2008 Nov 13. Review. PubMed PMID: 19008118.

11. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000 Aug 11;289(5481):950-3. PubMed PMID: 10937998.
12. Hendaoui I, Lavergne E, Lee HS, Hong SH, Kim HZ, Parent C, Heuzé-Vourc'h N, Clément B, Musso O. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by a soluble collagen-derived frizzled domain interacting with Wnt3a and the receptors frizzled 1 and 8. *PLoS One*. 2012;7(1):e30601. doi: 10.1371/journal.pone.0030601. Epub 2012 Jan 27. Erratum in: *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/annotation/bd37b3ad-c242-4e77-9ef3-8e92d1f105f5. PubMed PMID: 22303445; PubMed Central PMCID: PMC3267734.
13. Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2012 Oct 1;370(1):71-85. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.016. Epub 2012 Jul 25. PubMed PMID: 22842099.
14. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2007 May 11;282(19):14515-24. Epub 2007 Mar 10. PubMed PMID: 17351296.
15. Errera FI, Canani LH, Yeh E, Kague E, Armelin-Corrêa LM, Suzuki OT, Tschiedel B, Silva ME, Sertié AL, Passos-Bueno MR. COL18A1 is highly expressed during human adipocyte differentiation and the SNP c.1136C > T in its "frizzled" motif is associated with obesity in diabetes type 2 patients. *An Acad Bras Cienc*. 2008 Mar;80(1):167-77. PubMed PMID: 18345385.

16. Definition of the Metabolic Syndrome. Available at http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf. Accessed 10 February 2012.
17. American association of clinical endocrinologist guideline for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis (AAACE). Available at <https://www.aace.com/files/lipid-guidelines.pdf>. Accessed 10 September 2012.
18. Bonora E, Micciolo R, Ghiatas AA, Lancaster JL, Alyassin A, Muggeo M, DeFronzo RA. Is it possible to derive a reliable estimate of human visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue from simple anthropometric measurements? *Metabolism*. 1995 Dec;44(12):1617-25. PubMed PMID: 8786733.
19. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18. PubMed PMID: 12184808; PubMed Central PMCID: PMC126239.
20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. PubMed PMID: 11328886; PubMed Central PMCID: PMC55695.
21. Baranova A, Collantes R, Gowder SJ, Elariny H, Schlauch K, Younoszai A, King S, Randhawa M, Pusulury S, Alsheddi T, Ong JP, Martin LM, Chandhoke V, Younossi ZM. Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes Surg*. 2005 Jun-Jul;15(6):758-65. PubMed PMID: 15978142.
22. Lemieux I. Energy partitioning in gluteal-femoral fat: does the metabolic fate of triglycerides affect coronary heart disease risk? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 May;24(5):795-7. PubMed PMID: 15132969.

23. Bishop JR, Passos-Bueno MR, Fong L, Stanford KI, Gonzales JC, Yeh E, Young SG, Bensadoun A, Witztum JL, Esko JD, Moulton KS. Deletion of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan type XVIII collagen causes hypertriglyceridemia in mice and humans. *PLoS One*. 2010 Nov 10;5(11):e13919. doi: 10.1371/journal.pone.0013919. PubMed PMID: 21085708; PubMed Central PMCID: PMC2978080.
24. Moulton KS, Olsen BR, Sonn S, Fukai N, Zurakowski D, Zeng X. Loss of collagen XVIII enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1330-6. Epub 2004 Aug 16. PubMed PMID: 15313955.
25. Zeng X, Chen J, Miller YI, Javaherian K, Moulton KS. Endostatin binds biglycan and LDL and interferes with LDL retention to the subendothelial matrix during atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2005 Sep;46(9):1849-59. Epub 2005 Jul 1. PubMed PMID: 15995169.
26. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*. 2000 Dec;43(12):1498-506. PubMed PMID: 11151758.
27. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, Laberge PY, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1504-11. doi: 10.2337/db10-1039. Epub 2011 Mar 18. PubMed PMID: 21421806; PubMed Central PMCID: PMC3292324.

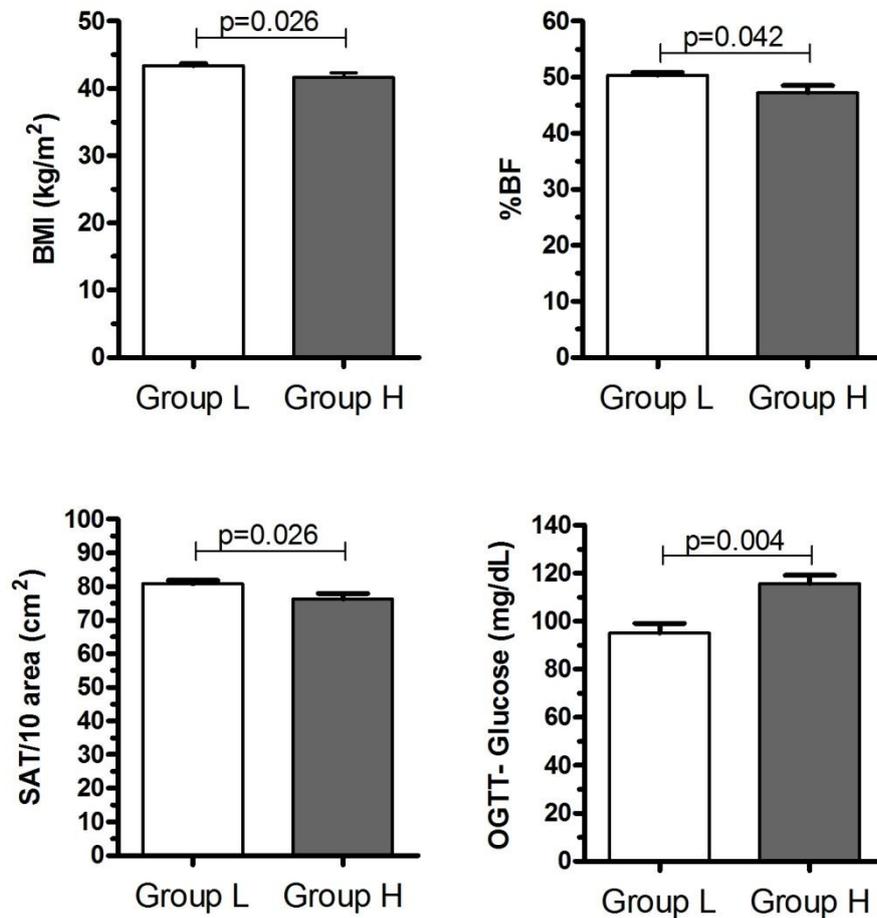


Figure 1 Difference in clinical parameters between women from group L (*COL18A1* mRNA SAT/VAT<1.5) and women from group H (*COL18A1* mRNA SAT/VAT≥1.5). BMI: Body mass index. BF: Body fat. OGTT: Oral glucose tolerance test. SAT: Subcutaneous adipose tissue. VAT: Visceral adipose tissue.

Table 1 Anthropometric and biochemical parameters of women (N=16).

Parameters	Mean \pm SEM	Range
Weight (kg)	111 \pm 3.2	97-139
BMI (kg/m ²)	42.7 \pm 0.4	40-45
WC (cm)	116 \pm 7	107-125
W/H ratio	0.88 \pm 0.01	0.77-0.96
BF (kg)	55 \pm 1.97	42.6-72.5
% BF	49.2 \pm 0.68	41-52.1
SAT area (cm ²)	442 \pm 12.8	358.5-549.4
Glucose (mg/dL)	87 \pm 2.3	70-105
OGTT (mg/dL)	102 \pm 3.8	70.6-122
TG (mg/dL)	109 \pm 9.9	69-207
TC (mg/dL)	177 \pm 9.7	104-258
HDL (mg/dL)	44.7 \pm 2.9	31-74
LDL (mg/dL)	110 \pm 10	27.6-167
TSH (μ g/mL)	2.60 \pm 0.38	0.30-4.90

BMI: Body mass index. WC: Waist circumference. W/H: Waist to hip ratio. BF: Body fat.

SAT: Subcutaneous adipose tissue. OGTT: Oral glucose tolerance test. TG: Triglycerides.

TC: Total cholesterol. HDL: High-density lipoprotein. LDL: Low-density lipoprotein. TSH:

Thyroid-stimulating hormone.

Table 2 Distribution of *COL18A1* mRNA levels.

	SAT <i>COL18A1</i> expression	VAT <i>COL18A1</i> expression	SAT/VAT <i>COL18A1</i> expression ratio
<i>Group L</i>			
1	0.072	0.198	0.364
2	0.221	0.349	0.633
3	0.264	0.399	0.661
4	0.346	0.458	0.755
5	0.278	0.327	0.850
6	0.323	0.332	0.975
7	0.586	0.579	1.011
8	0.046	0.045	1.019
9	0.225	0.208	1.077
10	0.537	0.365	1.469
<i>Group H</i>			
1	0.178	0.111	1.604
2	0.485	0.218	2.227
3	0.551	0.231	2.389
4	0.429	0.153	2.796
5	0.364	0.090	4.058
6	0.357	0.044	8.101

Group L: *COL18A1* mRNA SAT/VAT < 1.5. Group H: *COL18A1* mRNA SAT/VAT \geq 1.5.

SAT: Subcutaneous adipose tissue. VAT: Visceral adipose tissue. *COL18A1*: collagen, type XVIII, alpha 1.

4.3 CAPÍTULO 3

**Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: The same impact on IL-6 and TNF- α .
Prospective Clinical Trial.**

Artigo publicado na revista *Obesity Surgery*.



Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: the Same Impact on IL-6 and TNF- α . Prospective Clinical Trial

Elaine Cristina Viana · Karine L. Araujo-Dasilio · Gustavo Peixoto Soares Miguel · Josefina Bressan · Elenice Moreira Lemos · Margareth Ribeiro Moyses · Gláucia Rodrigues de Abreu · João Luiz Moreira Coutinho de Azevedo · Perseu Seixas Carvalho · Maria Rita S. Passos-Bueno · Flávia Imbroisi Valle Errera · Nazaré Souza Bissoli

Published online: 10 March 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract

Background Due to the association between the quantity of adipose tissue and concentrations of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF- α), this work aimed to assess the effects of Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and sleeve gastrectomy (SG) procedures on serum IL-6 and TNF- α concentrations.

Methods This study evaluated serum IL-6 and TNF- α levels, as well as routine anthropometric and biochemical values, before and 1 year post-bariatric surgery. Fifty percent of patients ($n=24$) underwent RYGB, and 50 % ($n=24$) underwent SG. Prior to bariatric surgery, IL-6 and TNF- α mRNA expression levels in subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) were investigated in obese women.

Results There was a significant reduction ($p<0.05$) in all anthropometric and routine biochemical measurements in patients in the RYGB and SG groups 1 year post-surgery. The serum concentrations of IL-6 and TNF- α were reduced following surgery in both groups ($p<0.05$). No differences in the relative expression levels of IL-6 and TNF- α were found between SAT and VAT prior to bariatric surgery.

Conclusions RYGB and SG procedures demonstrated a similar impact on adipokine levels in women 1 year post-surgery. Both techniques may improve the course of chronic diseases and the state of inflammation associated with obesity.

Keywords IL-6 · TNF- α · Bariatric surgery · Weight loss · Roux-en-Y gastric bypass · Sleeve gastrectomy

E. C. Viana · M. R. Moyses · G. R. de Abreu · N. S. Bissoli
Department of Physiological Sciences,
Federal University of Espírito Santo, Rua Marechal Campos,
1468 Vitória, CEP: 29040-090, ES, Brazil

K. L. Araujo-Dasilio
Biotechnology Graduate Program, Health Sciences Center,
Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

G. P. S. Miguel
Department of Obesity Surgery,
Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

J. Bressan
Department of Nutrition and Health,
Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

E. M. Lemos
Center of Infectious Diseases,
Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

J. L. M. C. de Azevedo
Department of Surgery, Federal University
of São Paulo—UNIFESP, Vila Mariana, SP, Brazil

P. S. Carvalho
Department of Medical Clinic,
Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

M. R. S. Passos-Bueno
Human Genome Center, Department of Genetics and Evolutionary
Biology, Institute of Bioscience, University of São Paulo—USP,
São Paulo, ES, Brazil

F. I. V. Errera
Department of Morphofunctional Sciences,
EMESCAM College of Health Sciences, Vitória, ES, Brazil

E. C. Viana (✉)
University Vila Velha, Boa Vista,
Vila Velha, CEP: 29102-770, ES, Brazil
e-mail: elainecviana@gmail.com

Introduction

Obesity is a global epidemic and is associated with a state of chronic inflammation [1–5]. Adipose tissues can produce and secrete proteins known as adipokines, including leptin, adiponectin, interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). These proteins may represent a link between obesity and associated co-morbidities, including cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and certain cancers, among other conditions [6–8]. IL-6 and TNF- α are of particular interest due to their significant pro-inflammatory properties, as well as their roles in the regulation of cardiovascular function and in various adipocyte functions, including insulin resistance [3, 4, 9].

Surgical treatment of morbid obesity has been shown to be an effective strategy for achieving long-term weight loss and reducing co-morbidities [10]. The Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is the most common bariatric technique used [11–13] compared to the sleeve gastrectomy (SG) technique [14]. To our knowledge, a comparative analysis of the effects of RYGB and SG procedures on inflammatory biomarkers has not been conducted. Therefore, we determined the impact of RYGB and SG on the serum concentrations of IL-6 and TNF- α in women before and 1 year post-surgery.

Subjects and Methods

Subjects

Female participants ($n=48$) enrolled at the Bariatric Surgery Program of the HUCAM/UFES, Cassiano Antonio Moraes University Hospital, Federal University of Espírito Santo, were selected for the study. The participants were between 21 and 59 years of age, had body mass indices (BMIs) between 40 and 45 kg/m², and presented with histories of multiple unsuccessful attempts to reduce their weight. The participants did not have histories of mental illness, use of illicit drugs, high risk for surgery, admission to compulsive sweet-eating habits, or previous digestive tract surgery. All subjects had no other inflammatory diseases, were free of infectious diseases, and were not receiving anti-obesity or anti-inflammatory drugs at the time the study was initiated. The diagnostic criteria used for diabetes, including impaired glucose tolerance, hypertension, and metabolic syndrome, were established by the International Diabetes Foundation [15].

Volunteers who met inclusion and exclusion criteria were recruited from our program, and the women at the top of a waitlist for bariatric surgery were selected. Patients were consulted individually and confidentially regarding their preferences for either surgical technique following an

explanation of the advantages and disadvantages of each method as determined by the Committee on Ethics in Human Research of the Federal University of Espírito Santo—UFES (approved protocol number 049/06). Patients were then allocated to two groups based on their selected surgical method, and all patients signed informed consent before surgery. This study was registered at clinicaltrials.gov (NCT00873405) [16].

Of the total sample, 50 % of the participants ($n=24$) underwent RYGB, and 50 % ($n=24$) underwent SG. These groups were evaluated during the preoperative period and monitored for 1 year post-surgery by the same multidisciplinary team.

Surgical Techniques

The procedures were performed by the same surgeon, using identical laparotomic procedures, as determined by the Unified Health System (Brazilian Public Health System), and the same type of anesthesia. The RYGB procedure was standardized with a 40-cm biliopancreatic limb length and 150-cm alimentary limb length. The gastric pouch was formed, starting 10 cm distal to the esophago-gastric junction, using a linear stapler/cutter (80 mm blue loads, Tyco®) applied along a 32 Fr Fouchet tube. A custom gastro-jejunosomy was performed. The SG pouch was created using the same linear stapler/cutter device applied along a 32 Fr Fouchet tube, beginning 5 cm from the pylorus and up to the angle of His. In both procedures, a 3-mm-wide Silastic® ring was inserted around the gastric pouch 5 cm distal to the esophago-gastric junction, creating an outlet lumen diameter of 12 to 13 mm to standardize the techniques and minimize bias, as reported by Miguel et al. [17]. All staple lines were strengthened using a sero-serosa running polypropylene suture and tested with methylene blue solution.

Anthropometric Variables

All of the patients were monitored according to the multidisciplinary clinical protocols of the Bariatric Surgery Program. Monitoring analyses were based on data related to body weight (kg) [18], BMI (kg/m²) [19], waist circumference (WC) [20], percentage body fat (%BF), and lean body mass (%BM), which were measured by the electric bioimpedance [21] method (EB) with the use of the Body Stat® 5000 device.

To evaluate the percentage of excessive weight that was lost (%EWL), an ideal weight was calculated based on the tables of Metropolitan Life Insurance, as recommended by Deitel and Greenstein [22] and the Society for Brazilian Bariatric Surgery [23] (ideal weight [kg] = 53.975 + [(height[m] - 1.524) × 53.5433]). Weight loss was defined

as the difference in weight before and after surgery (weight loss [kg] = weight before surgery – weight after surgery) and evaluated by the following formula: %EWL = weight loss (kg)/(weight before surgery [kg] – ideal weight [kg]) × 100.

We also calculated the percentage of excess BMI that was lost (%EBMIL) based on the difference between the BMI before and after the surgery ($\text{EBMIL} (\text{kg}/\text{m}^2) = \text{BMI}_{\text{before}} - \text{BMI}_{\text{after}}$), as well as a calculation of the excess BMI (BMI before surgery, 24.9), which was 24.9 kg/m² above the normal range of BMI according to the World Health Organization [19]. Therefore, the %EBMIL was calculated using the formula: $\% \text{EBMIL} = \text{loss of BMI} (\text{kg}/\text{m}^2) / \text{excessive BMI} (\text{kg}/\text{m}^2) \times 100$, adapted from Deitel and Greenstein [22] and Deitel et al. [24]. The percent body fat loss (%BFL) was evaluated by the reduction in body fat multiplied by 100 and divided by body fat before surgery ($\% \text{BFL} = [\text{BF}_{\text{before}} - \text{BF}_{\text{after}}] \times 100 / \text{BF}_{\text{before}}$). The reduction in WC (LWC) was evaluated as the difference between the WC values before and after surgery ($\text{LWC} = \text{WC}_{\text{before}} - \text{WC}_{\text{after}}$).

Blood and Adipose Tissue Samples

Blood samples were collected after 10 h of fasting. The samples were centrifuged, and the sera were collected. Subcutaneous adipose tissue (SAT) from the abdominal wall and visceral adipose tissue (VAT) from an omental site were collected during the RYGB and SG surgeries. Sera and adipose tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analysis. Data related to biochemical levels of fasting glucose, triglycerides, and total and relative fractions of cholesterol (HDL and LDL) were analyzed according to routine biochemical laboratory analyses. The Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) was evaluated according to the criteria of the International Diabetes Federation (<http://www.idf.org/fact-sheets/impaired-glucose-tolerance>).

Serum Measurements of IL-6 and TNF- α

The serum concentrations of IL-6 and TNF- α were determined by the enzyme linked immuno-sorbent assay method using the Invitrogen™ Human TNF- α UltraSensitive kits (average intra-assay coefficient of variation, %CV=5.9; average inter-assay percentage, %CV=8.5; sensitivity < 0.09 pg/mL) and Invitrogen™ Human IL-6 US Ultra Sensitive (average intra-assay coefficient of variation, %CV=6.41; average inter-assay percentage, %CV=7.8; sensitivity < 104 fg/mL).

The plates were analyzed with a DIAS Microplate Reader device (Dynex Technologies The Microtiter® Company) at a wavelength of 450 nm. The absorbance values were used

to calculate the concentrations of IL-6 and TNF- α in pg/mL, using linear equations based on the standard curves. These measurements were carried out in duplicate and the average of the two values was used for data analyses. Samples with values under detection limits were substituted with the minimum detectable value. The difference (Dif) of TNF- α and IL-6 was calculated as differences between the serum cytokine concentrations before and after surgery using the following formulas: $\text{Dif IL-6} = \text{IL-6}_{\text{before}} - \text{IL-6}_{\text{after}}$ and $\text{Dif TNF-}\alpha = \text{TNF-}\alpha_{\text{before}} - \text{TNF-}\alpha_{\text{after}}$.

RNA Isolation from Adipose Tissues and Synthesis of cDNA

A total of 80–100 mg of SAT and VAT from 33 women was homogenized with Tissue Ruptor (Qiagen), and the total RNA from homogenate was isolated using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). During extraction, the RNA was treated with DNase I (RNase-Free DNase set, Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA quality and concentration were evaluated using Nanodrop 1000 and agarose gel. Only samples measuring the 260/280 nm absorbance ratio=1.8–2.1 were used in the quantitative PCR (qPCR). cDNA was synthesized from 2,000 ng of total RNA using Superscript II (Invitrogen™), according to the manufacturer's recommendations, and stored at –20 °C. Some patient samples were excluded from analyses due to poor-quality RNA.

Quantitative PCR Analysis

qPCR was used to verify the IL-6 and TNF- α mRNA expression levels in the SAT and VAT of obese women. A total of 1 μ l (30 ng) of each cDNA sample was mixed with 2.5 μ l of 1 μ M each primer, 12.5 μ l of 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and DNase/RNase-free water to a total volume of 25 μ l. qPCR reactions were performed in triplicate using ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) with a standard temperature protocol. Primers were designed with the assistance of Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (genes—IL-6: 5'AATTCGGTACATCCTCGACG3' [forward] and 5'TTCTGCCAGTGCCTCTTTG3' [reverse]; TNF- α : 5'TCTCGACTTTGCCGAGTCTG3' [forward] and 5'CGTTTGGGAAGGTTGGATGT3' [reverse]; endogenous—SDHA [succinate dehydrogenase complex subunit A]: 5'TGGGAACAAGAGGGCATCTG3' [forward] and 5'CCACCACTGCATCAAATTCATG3' [reverse]; HPRT1 [hypoxanthine phosphoribosyltransferase] 1: 5'TGACACTGGCAAAACAATGCA3' [forward] and 5'GGTCCTTTTACCAGCAAGT3' [reverse]; transcript control genes—GAPDH [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase]: 5'CCATCTTCCAGGAGCGAGAT3' [forward] and 5'

Table 1 Baseline and 1 year post-surgery characteristics

Variable	Baseline ^a			1 year post-surgery ^a		
	n (%)			n (%)		
	RYGB + SG	RYGB	SG	RYGB + SG	RYGB	SG
Menopause	2 (4)	0 (0)	2 (8)	NA	NA	NA
Co-morbidities						
Hypertension	34 (71)	16 (66)	18 (53)	10 (21)	4 (16)	6 (25)
Dyslipidemia						
Triglycerides ≥150 mg/dL	18 (38)	10 (42)	8 (33)	1 (2)	1 (4)	0 (0)
Total cholesterol >200 mg/dL	20 (42)	8 (33)	12 (50)	5 (10,4)	1 (4)	4 (16)
HDL ≤50 mg/dL	40 (83)	20 (83)	20 (83)	19 (40)	8 (33)	11 (46)
Hyperglycemia						
Type 2 diabetes	11 (23)	2 (8)	9 (37)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IGT	8 (17)	4 (16)	4 (16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No classification	1 (2)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA

Analysis of frequency was calculated using Fisher's exact test

RYGB Roux-en-Y gastric bypass, SG sleeve gastrectomy, HDL high-density lipoprotein, IGT intolerance glucose test, NA not applicable

^aBaseline: RYGB vs. SG, $p > 0.05$; 1 year post-surgery: RYGB vs. SG, $p > 0.05$; Baseline vs. 1 year post-surgery, $p < 0.05$

TTCTCCATGGTGGTGAAGAC3' [reverse]). The cycle threshold (Ct) was defined as the cycle number at which a significant increase in the fluorescence signal was first detected. A standard curve for each primer set was generated by serial dilution of a randomly chosen cDNA sample based on the linear relationship between the Ct and the logarithm of the initial cDNA amounts. Each sample was run in duplicate, and the mean values of the duplications were used to calculate the slope. The amplification efficiency (E) of each primer was calculated according to the equation $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. GeNom v3.4 was used to determine the most stable endogenous controls (SDHA, HPRT1, and GAPDH) and to calculate the normalization factors for each sample [25]. Expression values were calculated according to [26].

Statistical Analysis

The results are presented as medians and means with standard error of means (SEM). Nonparametric Wilcoxon signed-rank test for matched pairs and Mann–Whitney test were used to compare data as indicated. To analyze correlations between variables, we used Spearman correlation test, and frequency analyses were calculated with Fisher's exact test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 for Windows (version 5.00.288).

Results

Preoperative Period

The mean age of enrolled women was 35.5 ± 1.1 years, with no differences between the group mean ages (RYGB = $33.8 \pm$

1.3 years vs. SG = 37.2 ± 1.7 years, $p = 0.179$). The data relating co-morbidities, anthropometry, body composition, and biochemical levels are described in Tables 1 and 2. Women in the RYGB group were heavier and had more body fat than women in the SG group. Although participants in the RYGB group began the study weighing 8 kg more than women in the SG group, both groups had similar BMIs, which is likely due to the height differences between groups (RYGB = 1.66 ± 0.01 m vs. SG = 1.60 ± 0.01 m, $p = 0.005$).

In all patients, no differences were observed between the relative expression levels of IL-6 and TNF- α for SAT and VAT prior to bariatric surgery. No group differences were identified in cytokine expression (Fig. 1). Furthermore, there were no differences in IL-6 and TNF- α serum concentrations between the RYGB and SG groups before bariatric surgery (Fig. 2). In both types of adipose tissue examined, no correlations were observed between mRNA IL-6 and mRNA TNF- α expression (SAT $n = 20$, $r = -0.08$, $p = 0.75$; VAT $n = 25$, $r = 0.22$, $p = 0.29$), between IL-6 mRNA levels and IL-6 serum concentration (SAT $n = 17$, $r = -0.09$, $p = 0.73$; VAT $n = 17$, $r = 0.07$, $p = 0.77$), nor between TNF- α mRNA levels and TNF- α serum concentration (SAT $n = 17$, $r = -0.09$, $p = 0.72$; VAT $r = 0.12$, $p = 0.62$). A correlation was observed between IL-6 and TNF- α levels in serum ($n = 35$, $r = 0.33$, $p = 0.053$).

Relative expression and serum levels of cytokines did not correlate with anthropometric parameters or body composition parameters, including weight, BMI, body fat, WC, %BF, and %BM (data not shown). The analysis of biochemical parameters demonstrated that IL-6 serum levels were positively correlated with LDL levels, whereas TNF- α serum levels were positively correlated with fasting glucose, glucose tolerance, and triglyceride levels (Table 3). Baseline data demonstrated homogeneity between the groups prior to surgery (Tables 1 and 2).

Table 2 Anthropometry, body composition, and biochemical parameters

Variables	Baseline**			1 year post-surgery**		
	Median (mean ± SEM)			Median (mean ± SEM)		
	RYGB + SG (n=48)	RYGB (n=24)	SG (n=24)	RYGB + SG (n=48)	RYGB (n=24)	SG (n=24)
Weight (kg)	109.8 (111.4±1.4)	115.1 (115.4±2.2)**	106.8 (107.4±1.5)**	72.4 (72.7±1.4)	74.3 (74.3±1.9)	74.6 (71.1±2.0)
BMI (kg/m ²)	42.6 (42.5±0.2)	42 (42.5±0.4)	42.7 (42.5±0.3)	27.3 (27.5±0.4)	27.2 (27.3±0.6)	69.6 (27.7±0.5)
Waist circumference (cm)	119.5 (119.2±1.0)	122 (120.4±1.7)	118.3 (118.0±1.1)	91 (90.3±1.0)	91 (90.9±1.6)	89 (89.7±1.4)
Body fat (kg)	53.6 (54.4±0.9)	56.6 (56.7±1.5)*	51.3 (52.3±0.9)*	21.9 (22.6±0.9)	21.7 (22.5±1.3)	22.3 (22.7±1.2)
%body fat	49.1 (48.8±0.4)	49.8 (49.0±0.6)	48.7 (48.7±0.5)	30.3 (30.7±0.7)	29.8 (30.0±1.1)	31.5 (31.5±1.0)
%body mass	51 (51.2±0.4)	50.2 (51.0±0.6)	51.4 (51.3±0.5)	69.8 (69.3±0.7)	70.3 (70.0±1.1)	68.6 (68.5±1.0)
Glucose (mg/dL)	93.5 (104.8±5.9)	93 (98.3±5.9)	97.5 (111.3±10.2)	81 (81.6±0.9)	81.5 (82.6±1.3)	81 (80.5±1.2)
OGTT (mg/dL)	119 (129.8±7.9) a	110 (115.3±9.8) b	125 (149.2±11.6) c	75 (75.1±3.5) d	68 (68.2±5.0) e	80 (79.4±4.5) f
Triglycerides (mg/dL)	123.5 (196.5±45)	132.5 (253.3±87.8)	115.5 (139.8±16.8)	74 (87.6±8.5) g	71 (92.0±17.4) h	79 (83.8±5.7) i
Total cholesterol (mg/dL)	192 (197.6±9.0)	179 (199.6±16.2)	198.5 (195.6±8.1)	156 (163.3±5.6) g	148 (151.9±9.0)** h	164 (173.2±6.4)** i
HDL (mg/dL)	39 (41.2±1.5)	40 (40.8±2.0)	39 (41.6±2.3)	50 (50.1±1.4) g	51.5 (49.8±2.0) h	50 (50.4±2.1) i
LDL (mg/dL)	116 (122.9±6.7)	106 (117.9±11.2)	130.6 (127.9±7.3)	91 (94.7±4.6) g	82.9±6.5** h	95.4 (105.0±5.7)** i

Data are presented as median values with mean and SEM in parentheses. To intergroup and intragroup comparisons, Mann–Whitney test and Wilcoxon signed-rank test were used, respectively RYGB Roux-en-Y gastric bypass, SG sleeve vertical gastrectomy, BMI body mass index, OGTT oral glucose tolerance test, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein

** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, intergroup comparison: RYGB vs. SG in baseline and 1 year post-surgery; ** $p < 0.01$ to all groups, intragroup comparison

^a $n = 40$

^b $n = 19$

^c $n = 21$

^d $n = 34$

^e $n = 13$

^f $n = 21$

^g $n = 43$

^h $n = 20$

ⁱ $n = 23$

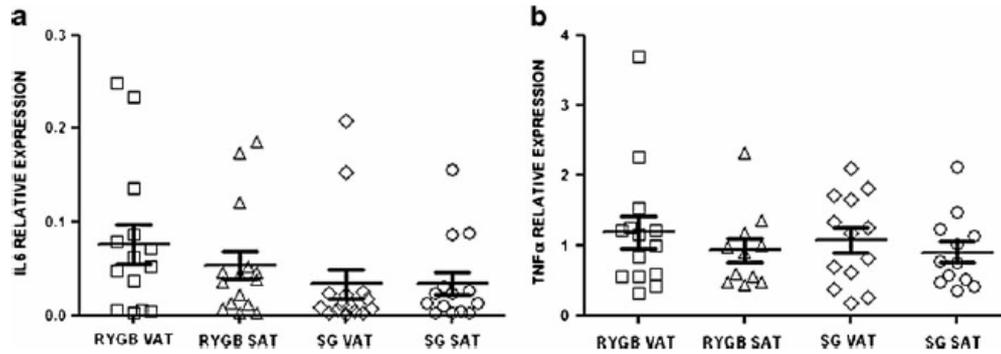


Fig. 1 Relative IL-6 and TNF- α gene expression levels in visceral adipose tissue (*VAT*) and subcutaneous adipose tissue (*SAT*). Data are expressed as median values with interquartile range indicated. **a** IL-6 mRNA relative expression levels in the RYGB and SG groups. Intragroup comparison to VAT vs. SAT= $p>0.05$ to all groups. Intergroup

comparison to VAT and SAT= $p>0.05$ between groups RYGB vs. SG. **b** TNF- α mRNA relative expression levels in RYGB and SG groups. Intragroup comparison VAT vs. SAT= $p>0.05$ to all groups. Intergroup comparison to VAT and SAT= $p>0.05$ between groups RYGB vs. SG

Post-operative Period

At 1 year post-surgery, there was a significant reduction in the IL-6 and TNF- α serum concentrations in both groups (intragroup comparison; Fig. 2). Remarkably, no post-operative differences in cytokine concentrations were observed for participants in either the RYGB or SG groups (intergroup comparison; Fig. 2).

An analysis of inflammatory biomarkers of all participants (RYGB + SG), as well as between the RYGB and SG groups, indicated no correlation between IL-6 and TNF- α serum levels. A negative correlation was observed between HDL levels and IL-6 serum concentration (Table 3).

No differences were observed in Dif IL-6 and Dif TNF- α between the RYGB and SG groups (Dif IL-6: RYGB= 2.27 ± 0.39 pg/mL and SG= 2.89 ± 0.50 pg/mL, Mann-Whitney $p=0.377$; Dif TNF- α : RYGB= 0.47 ± 0.14 pg/mL and SG= $0.84 \pm$

0.23 pg/mL; Mann-Whitney $p=0.145$). In all participants (RYGB + SG), the Dif IL-6 was correlated with Dif TNF- α (Fig. 3).

Patients in both groups displayed a reduction in BMI (35.1 ± 0.9 %; min=17.5 %; max=50.7 %). It is noteworthy that, 1 year post-surgery, only 11 patients (23 %) were classified as obese, with a BMI range of 30–33 kg/m². Both RYGB and SG groups presented with reductions in anthropometry and body composition parameters (Table 2). RYGB and SG procedures had similar effects on anthropometric parameters, such as %EWL (RYGB= 76.4 ± 2.7 % vs. SG= 74.3 ± 3 %; $p=0.836$), %EBMIL (RYGB= 86.4 ± 3.1 % vs. SG= 84.9 ± 2.9 %; $p=0.476$), %BFL (RYGB= 37.7 ± 2.0 % vs. SG= 34.6 ± 1.9 %; $p=0.235$), and LWC (RYGB= 29.8 ± 1.9 cm vs. SG= 28.5 ± 1.3 cm; $p=0.483$). However, the RYGB group showed greater reductions in body fat than the SG group (RYGB= 34.2 ± 1.5 kg vs. SG= 29.6 ± 0.9 kg; $p=0.031$).

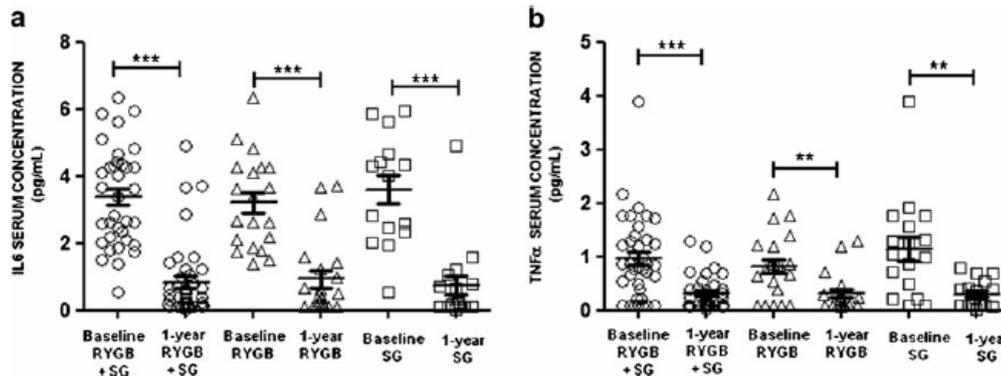


Fig. 2 Serum IL-6 and TNF- α concentrations. Data are expressed as median values with interquartile range indicated. **a** Intragroup comparison to IL-6 serum, *** $p<0.0003$ to all groups. Intergroup comparison to IL-6 serum in baseline and 1 year post-surgery moments, $p>0.05$. **b** Intragroup comparison to TNF- α serum, *** $p<0.0001$ to RYGB+,

** $p<0.008$ to RYGB and SG groups. Intergroup comparison to TNF- α serum in baseline and 1 year post-surgery moments, $p>0.05$. To intergroup and intragroup comparisons, Mann-Whitney test and Wilcoxon signed-rank test were used, respectively

Table 3 Correlation between biochemical parameters and serum IL-6 and TNF- α concentrations

	IL-6		TNF- α	
	Baseline	1 year post-surgery	Baseline	1 year post-surgery
Glucose (mg/dL)	0.15 (36)	0.25 (38)	0.35* (38)	0.10 (36)
OGTT (mg/dL)	0.21 (30)	0.29 (26)	0.35* (32)	0.01 (26)
Triglycerides (mg/dL)	0.01 (33)	0.21 (33)	0.35* (36)	0.00 (33)
Total cholesterol (mg/dL)	0.30 (33)	-0.13 (33)	0.17 (36)	0.00 (33)
HDL (mg/dL)	-0.21 (35)	-0.45** (34)	-0.22 (38)	-0.03 (33)
LDL (mg/dL)	0.44** (35)	0.01 (34)	0.21 (38)	0.00 (33)

The data were tested by Spearman correlation. Data are expressed as r , coefficient of correlation, and the sample size in parentheses

OGTT oral glucose tolerance test, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (baseline and 1 year post-surgery)

With the exception of total cholesterol and LDL levels, the RYGB and SG groups presented with similar biochemical profiles (Tables 1 and 2). The RYGB group presented with lower total cholesterol and LDL levels than the SG group. Participants from the RYGB group were classified as optimal regarding their LDL values (< 100 mg/dL), whereas the participants from the SG group had LDL levels classified as near optimal (100–129 mg/dL) [27].

There was a significant reduction in the frequency of comorbidities across both groups (Table 1).

Discussion

The major goal of this study was to determine whether RYGB and SG procedures impact the serum IL-6 and TNF- α concentrations in women 1 year post-bariatric surgery. Furthermore, the correlations between serum IL-6 and TNF- α levels and gene expression profiles, biochemical marker levels, anthropometric parameters, and body composition were determined.

Our results demonstrated that both the RYGB and SG procedures effectively reduced serum IL-6 and TNF- α

concentrations 1 year post-surgery and were associated, in part, with the loss of body fat. Other studies have reported no noticeable reductions in these serum cytokine concentrations following different types of bariatric surgery procedures. Miller et al. [28] observed that IL-6 and TNF- α serum levels were not different at baseline, at 3 weeks, or at 3 and 6 months post-laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. Similarly, Laimer et al. [29] did not find significant differences in levels of either 1 year post-gastric banding intervention. However, it is worth mentioning that patients in the above study had a mean post-surgery BMI ≥ 30 kg/m²; therefore, they were still classified as obese. Studies have demonstrated that reductions in BMI values between 40 and 30 kg/m² slightly affected IL-6 and TNF- α plasma concentrations in morbidly obese patients [28, 29].

Our study demonstrated that the surgical procedures were effective in reducing anthropometry and altering body composition 1 year post-surgery. Patients from the RYGB group presented with greater weight and body fat reduction than patients from the SG group. This observation was supported by the work of Tice et al. [30], which demonstrated that RYGB patients lost more weight than patients in other treatment groups. Furthermore, the post-RYGB %EWL recorded for patients in the present study was comparable to levels described by Kruseman et al. (71.7 \pm 19.1 %) [31]. Weight loss in SG procedures varies significantly (from 36.0 to 85.0 %) depending on the timing of follow-up assessments after surgery (ranging from 3 to 36 months) [31–33]. In our study, SG induced a considerable %EWL (approximately 70 %) at 1-year follow-up.

The decreases in IL-6 and TNF- α serum concentrations observed in our study could be explained by the significant reductions in BMI (from 42.5 to 27.5 kg/m² 1 year post-surgery). Indeed only 11 patients presented with post-surgical BMI ranges between 30 and 33 kg/m².

Despite the fact that women in the RYGB group presented with greater body fat loss than women from the

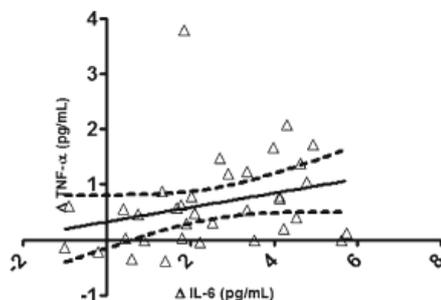


Fig. 3 Spearman correlation between Δ IL-6 and Δ TNF- α . All the RYGB + SG data ($n = 35$) were used in this analysis [$r = 0.38$, confidence interval = 0.042 to 0.69, * $p = 0.02$]. Dotted lines represent the 95 % CI

SG group, both groups showed similar reductions in serum IL-6 and TNF- α concentrations post-surgery.

There is evidence that a decrease in fat mass leads to a reduction in IL-6 and TNF- α serum levels [34] and that lean subjects show lower IL-6 and TNF- α serum concentrations compared to those of obese subjects [34, 35], suggesting that adipose tissue plays a central role in regulating serum cytokine concentrations.

Previous studies indicated that VAT and SAT tissues are biologically distinct based on their gene expression profiles [36, 37]. It has been proposed that VAT gene expression is more strongly related to damaged metabolism than SAT in obese individuals [38, 39]. In our study, VAT and SAT exhibited similar IL-6 and TNF- α gene expression levels, in accordance with a previous study conducted on obese patients [40]. Furthermore, the literature indicates that the expression of IL-6 VAT and SAT in obese individuals is normally higher than tissue expression in normal weight individuals [41]. Higher values of TNF- α expression in the VAT of obese subjects compared to lean subjects have also been reported [42].

The present study demonstrated a positive correlation between serum IL-6 and TNF- α concentrations ($p=0.053$) prior to surgery. It is important to note that previous work has demonstrated crosstalk between IL-6 and TNF- α expression [43, 44], and the expression of these cytokines was affected by the NF- κ B regulatory network [45]. Accordingly, in all of the patients in our study, the differences in serum cytokine concentrations demonstrated a link between IL-6 and TNF- α .

In our study, cytokine mRNA expression levels in adipose tissue did not correlate with circulating levels in morbidly obese women in either the RYGB or SG groups.

Our results indicated that the preoperative serum IL-6 and LDL concentrations were positively correlated. Furthermore, a negative correlation between TNF- α and plasma glucose and triglyceride concentrations was also observed. After surgery, HDL was negatively correlated with serum IL-6 concentrations, in agreement with previous work [46–48].

Although Brolin et al. [49] reported that a 1-year follow-up period may be considered a relatively short time to evaluate lipid profiles between different surgical procedures, our study revealed improvement in these biochemical parameters. RYGB successfully decreased fasting glucose levels and oral glucose tolerance test responses, as previously demonstrated [50–53], and the fasting glucose levels were also similar for women receiving the SG procedure, as previously described by our group [54] and Vidal et al. [55]. Additionally, both procedures resulted in improved plasma lipid concentrations (Table 2). The results of both surgical procedures can be attributed to caloric restriction, whereas outcomes of the RYGB procedure can also be associated with nutrient malabsorption [56]. These changes observed in both groups were associated with a reduced frequency of co-morbidities.

Conclusion

RYGB and SG procedures had similar impact on cytokine levels in women 1 year post-surgery. Both types of bariatric surgery were effective in facilitating weight loss and reducing the frequency of co-morbidities. Both techniques may improve chronic diseases and the state of inflammation associated with obesity.

Acknowledgments We thank the members of the Laboratory of Experimental Hypertension of the Department of Physiological Sciences/UFES, the members of the NDI/UFES (Center of Infectious Diseases), the students of the Department of Morphofunctional Sciences—EMESCAM College of Health, as well as the employees of the Human Genome Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience—University of Sao Paulo for their support in collecting and analyzing samples in their laboratory; Ms. Ilma O'Reilly for her voluntary contribution in monitoring the follow-up assessments; and the members of the Bariatric Surgery Program of the HUCAM/UFES, Cassiano Antonio Moraes University Hospital, Federal University of Espirito Santo for their logistical support. We gratefully thank all of the subjects who participated in this study.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316:129–39.
- Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314:1–16.
- Frøhbeck G, Salvador J. Role of adipocytokines in metabolism and disease. *Nutr Res*. 2004;24:803–26.
- Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007;132:2169–80.
- World Health Organization—WHO. Global database on body mass index an interactive surveillance tool for monitoring nutrition transition. Available at <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>. Accessed April 5, 2009.
- Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes*. 2003;27:S25–8.
- Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, et al. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53:145–50.
- Apovian CM, Bigornia S, Mott M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1654–9.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:745–51.
- Fontana MA, Wohlgenuth SD. The surgical treatment of metabolic disease and morbid obesity. *Gastroenterol Clin N Am*. 2010; 39:125–33.
- Fobi MAL, Lee H. Silastic ring vertical banded gastric bypass for the treatment of obesity: two years of follow up in 84 patients. *J Nati Med Assoc*. 1994;86:125–8.

12. Silecchia G, Boru C, Pecchia A, et al. Effectiveness of laparoscopic sleeve gastrectomy (first stage of biliopancreatic diversion with duodenal switch) on co-morbidities in super-obese high-risk patients. *Obes Surg*. 2006;16:1138–44.
13. Gagner M, Deitel M, Kalberer TL, et al. The second international consensus summit for sleeve gastrectomy, March 19–21, 2009. Symposium review. *Surg Obes Relat Dis*. 2009;5:476–85.
14. Gluck B, Movitz B, Jansma S, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy is a safe and effective bariatric procedure for the lower BMI (35.0–43.0 kg/m²) population. *Obes Surg*. 2011;21:1168–71.
15. International Diabetes Foundation (IDF). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 2006. Available at http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf. Accessed Feb 10, 2012.
16. clinicaltrials.gov (NCT00873405). Banded sleeve gastrectomy versus banded ring gastric bypass in morbidly obese patients. Available at <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00873405?term=NCT00873405&rank=1>. Accessed April 5, 2009.
17. Miguel GPS, Azevedo JLMC, Souza PHO, et al. Erosive esophagitis after bariatric surgery: banded vertical gastrectomy versus banded Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2011;21:167–72.
18. Jelliffe DB. Evaluación Del estado nutrición de la comunidad. Ginebra: OMS; 1968 (Serie de monografías, 53).
19. World Health Organization (WHO). Obesity. Report of WHO Consultation on Obesity. Geneva, 7–15, 1998.
20. World Health Organization (WHO). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases (DRAFT). Report of WHO Consultation on Obesity. Geneva, 28 January–1 February, 1–54, 2002.
21. Lukaski HC, Johnson PE, Bolonchuk WW, et al. Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr*. 1985;41:810–7.
22. Deitel M, Greenstein RJ. Recommendations for reporting weight loss. *Obes Surg*. 2003;13:159–60.
23. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Cirurgia Laparoscópica, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Consenso Brasileiro Multissocietário em Cirurgia da Obesidade. 2006. Available at: http://www.sbcbm.org.br/membros_consenso_bariatrico.php. Access: jan 2010.
24. Deitel M, Gawdat K, Melissas J. Reporting weight loss 2007. *Obes Surg*. 2007;17:565–8.
25. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;18:3.
26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2002–7.
27. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP)—Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)—final report. *Circulation* 106:3143–421, 2002.
28. Miller GD, Nicklas BJ, Fernandez A. Serial changes in inflammatory biomarkers after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2011;7:618–24.
29. Laimer M, Ebenbichler CF, Kaser S, et al. Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention. *Int J Obes*. 2002;26:659–62.
30. Tice JA, Karliner L, Walsh J, et al. Gastric banding or bypass? A systematic review comparing the two most popular bariatric procedures. *Am J Med*. 2008;121:885–93.
31. Kruseman M, Leimgruber A, Zumbach F, et al. Dietary, weight, and psychological changes among patients with obesity, 8 years after gastric bypass. *J Am Diet Assoc*. 2010;110:527–34.
32. Brethauer AS, Hammel JP, Schauer PR. Systematic review of sleeve gastrectomy as staging and primary bariatric procedure. *Surg Obes Relat Dis*. 2009;5:469–75.
33. Bohdjalian A, Langer FB, Shakeri-Leidenmüller S, et al. Sleeve gastrectomy as sole and definitive bariatric procedure: 5-year results for weight loss and ghrelin. *Obes Surg*. 2010;20:535–40.
34. Bastard J, Jardel C, Bruckert E, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3338–42.
35. Hansen D, Dendale P, Beelen M, et al. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109:397–404.
36. Tchkonja T, Lenburg M, Thomou T, et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E298–307.
37. Wolfs MGM, Rensen SS, Bruin-Van Dijk EJ, et al. Co-expressed immune and metabolic genes in visceral and subcutaneous adipose tissue from severely obese individuals are associated with plasma HDL and glucose levels: a microarray study. *BMC Med Genomics*. 2010;3:34.
38. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21:697–738.
39. Baranova A, Collantes R, Gowder SJ, et al. Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes Surg*. 2005;15:758–65.
40. Pardina E, Ferrer R, Baena-Fustegueras JA, et al. Only C-reactive protein, but not TNF- α or IL6, reflects the improvement in inflammation after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012;22:131–9.
41. Gletsu N, Lin E, Zhu J, et al. Increased plasma interleukin 6 concentrations and exaggerated adipose tissue interleukin 6 content in severely obese patients after operative trauma. *Surgery*. 2006;140(140):50–7.
42. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Rotellar F, Valentí V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Frühbeck G. Increased levels of chemerin and its receptor, chemokine-like receptor-1, in obesity are related to inflammation: tumor necrosis factor- α stimulates mRNA levels of chemerin in visceral adipocytes from obese patients. *Surg Obes Relat Dis*. 2011. doi:10.1016/j.soard.2011.11.001.
43. Kellera M, Mazucha J, Abrahama U, et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *PNAS*. 2009;106:21407–12.
44. Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, et al. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E999–1003.
45. Peng SC, Wong DSH, Tung KC, et al. Computational modeling with forward and reverse engineering links signaling network and genomic regulatory responses: NF- κ B signaling-induced gene expression responses in inflammation. *BMC Bioinforma*. 2010;11:308–21.
46. Pedersen BK, Febbraio MA. Point: interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol*. 2007;102:814–6.
47. Mooney RA. Counterpoint: interleukin-6 does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol*. 2007;102:816–8.
48. Niesler CU, Prins JB, O'Rahilly S, et al. Adipose depot-specific expression of cIAP2 in human preadipocytes and modulation of expression by serum factors and TNF α . *Int J Obes*. 2001;25:1027–33.
49. Brodin RE, Bradley LJ, Wilson AC, et al. Lipid risk profile and weight stability after gastric restrictive operations for morbid obesity. *J Gastrointest Surg*. 2000;4:464–9.

50. Campos GM, Rabl C, Peeva S, et al. Improvement in peripheral glucose uptake after gastric bypass surgery is observed only after substantial weight loss has occurred and correlates with the magnitude of weight lost. *J Gastrointest Surg.* 2010;14:15–23.
51. le Roux CW, Aylwin SJB, Batterham RL, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg.* 2006;243:108–14.
52. Hans-Erik J, Arvo H, Margareta O, et al. Alterations in proinsulin and insulin dynamics, HDL cholesterol and ALT after gastric bypass surgery. A 42-months follow-up study. *Obes Surg.* 2009;19:601–7.
53. Carvalho PS, Moreira CLCB, Barelli MC, et al. Cirurgia Bariátrica Cura Síndrome Metabólica? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51:79–85.
54. Miguel GPS, Azevedo JLMC, Neto CG, et al. Glucose homeostasis and weight loss in morbidly obese patients undergoing banded sleeve gastrectomy: a prospective clinical study. *Clinics.* 2009;64:1093–8.
55. Vidal J, Ibarzabal A, Romero F, et al. Type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome following sleeve gastrectomy in severely obese subjects. *Obes Surg.* 2008;18:1077–82.
56. Tchkonja T, Lenburg M, Thomou T, et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E298–307.

4.4 CAPÍTULO 4

A expressão do gene VEGFA é reduzida em tecido adiposo subcutâneo de mulheres com obesidade grave e alterações na tolerância à glicose.

Artigo em preparação.

A expressão do gene VEGFA é reduzida em tecido adiposo subcutâneo de mulheres com obesidade grave e alterações na tolerância à glicose

Fabiano P S Honorato, Karine L Araujo-Dasilio, Elaine C Viana, Gustavo P S Miguel, Flávia de Paula, Nazaré S Bissoli, Maria Rita S Passos-Bueno, Flávia I V Errera

1. INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é altamente vascularizado e sua expansão durante a progressão da obesidade depende de intensa atividade angiogênica (CAO, 2007; FOLKMAN, 2006). O VEGFA é o principal fator envolvido na angiogênese e atua diretamente no endotélio vascular, induzindo a proliferação e migração de células endoteliais, promovendo a vascularização do tecido. Desse modo, é crescente o número de pesquisas indicando que o VEGFA está relacionado ao desenvolvimento e expansão do tecido adiposo, sendo considerado um novo alvo terapêutico no tratamento contra a obesidade (CELEC e YOUNEMITSU, 2004; FERRARA, 2004).

Sabendo que uma expansão ineficiente do tecido adiposo está associada a um pior perfil metabólico, neste trabalho foi verificado i) se a expressão do gene VEGFA é diferente entre tecido adiposo subcutâneo (TAS) e visceral (TAV) de mulheres com obesidade grave, ii) se a expressão do VEGFA em TAS e TAV de mulheres com obesidade grave é diferente entre aquelas com e sem alterações na tolerância à glicose e iii) se há correlação entre a expressão do VEGFA e adiponectina.

2. METODOLOGIA

2.1 Sujeitos e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, com o protocolo número 049/06. A amostra deste estudo foi constituída por um total de 33 pacientes do sexo feminino com obesidade grau III e participantes do Programa de Cirurgia Bariátrica do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes, da Universidade Federal do Espírito Santo

(HUCAM/UFES). Os seguintes critérios de exclusão foram utilizados: a) presença de doenças inflamatórias, a não ser a obesidade, b) presença de doenças infecciosas e tireoidianas previamente conhecidas; c) uso de anti-depressivos ou drogas anti-obesidade durante o período do estudo e d) pacientes que se declaravam no período de climatério ou pós-menopausa.

O DM2, o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e a hipertensão foram classificados de acordo com critérios da IDF (2006). Foram realizadas análises na amostra total e também em amostras estratificadas por alterações da glicemia, de modo que tanto a presença de DM2 quanto de tolerância diminuída à glicose (IGT) foram consideradas alterações na tolerância à glicose. As principais características clínicas das pacientes encontram-se expostas na Tabela 1.

2.2 Antropometria, Composição Corporal e Parâmetros Bioquímicos

Todas as pacientes foram acompanhadas seguindo os protocolos clínicos multidisciplinares do Programa de Cirurgia Bariátrica, os quais viabilizaram a obtenção dos dados dessa pesquisa. Foram analisados dados relativos ao peso corporal (kg), IMC (Índice de Massa Corporal) (kg/m²) e circunferência abdominal (cm), bem como porcentagem de gordura corporal (%) e porcentagem de massa magra (%), os quais foram medidos pelo método de bioimpedância elétrica com uso do Body Stat® 5000 device. Além disso, também foram verificados dados bioquímicos relativos aos níveis do TOTG, Teste de Glicemia em Jejum, Triglicerídeos, Colesterol Total e frações.

2.3 Amostras de Tecido Adiposo, Extração de RNA e Síntese de cDNA

As amostras de TAS, da parede abdominal, e TAV, do omento, foram coletadas durante a cirurgia bariátrica. Essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o isolamento do RNAm. Um total de 80-100 mg de cada amostra de TAS e TAV das 33 pacientes foi homogeneizado em Qiazol com auxílio do Tissue Ruptor (Qiagen). O RNA total foi tratado com DNase I (Kit RNase-Free DNase set, Qiagen) e isolado usando o Kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen). A qualidade e a concentração do RNA foram avaliadas usando NanoDrop® ND-1000 e gel de agarose 1%. O cDNA foi sintetizado a partir de 2000ng de RNA usando Kit Superscript II (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante, e

armazenado a -20°C até a realização da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

24 .Análise de PCR quantitativa em tempo real

Um total de 1 µl (30ng) de cada amostra de cDNA foi misturada a 2.5 µl de primer específico a 1 µM, 12.5 µl de 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e DNase/RNase-free water para um volume final de 25 µl. As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas usando ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) com protocolo de temperatura padrão. Os primers dos genes controles endógenos (SDHA, HPRT1 e GAPDH) e dos genes VEGFA e ADIPOQ estão listados na Tabela 2. O Ct (Cycle threshold) foi definido como o número do ciclo em que um aumento significativo no sinal da fluorescência foi detectado pela primeira vez.

Uma curva padrão para cada conjunto de primers foi gerada pela diluição em série de amostras aleatórias de cDNA, com base na relação linear entre o Ct e o logaritmo da quantidade inicial de cDNA. Cada uma dessas reações foi feita em duplicata e as médias foram usadas para calcular o declive. A eficiência de amplificação (E) de cada primer foi calculada de acordo com a equação $E=10^{(-1/\text{declive})}$. O programa GeNorm v3.4 foi usado com todos os 3 genes endógenos para calcular o fator de normalização para cada amostra. Os valores de expressão foram calculados de acordo com Pfaffl (2001).

2.5 Análises Estatísticas

Como os valores referentes à glicemia em jejum, colesterol total, HDL, triglicerídeos e expressão gênica não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não-paramétricos para a análise de dados. O número exato de pacientes foi diferente para cada análise e encontra-se especificado nos resultados. O teste pareado de Wilcoxon foi usado para comparação de valores relativos de expressão gênica entre TAS e TAV. Para a comparação entre dois grupos não pareados a significância estatística foi avaliada de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Coeficientes de Correlação de Spearman foram calculados para avaliar a força da associação. Para as análises estatísticas foi adotada uma significância de $p<0.05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5 para Windows (versão 5.00.288).

3. RESULTADOS

3.1 Expressão de VEGFA nos depósitos TAS e TAV e sua Correlação com parâmetros clínicos e Adiponectina

Foram observados valores médios de expressão de VEGFA semelhantes entre TAS e TAV (0.021 ± 0.002 vs. 0.021 ± 0.003 , $p=0.76$, $n=25$). No TAS, a idade foi correlacionada negativamente ao VEGFA ($n=29$, $r=-0.4409$, $p=0.0167$). No TAV, este gene foi positivamente associado ao excesso de peso ($n=28$, $r=0.3824$, $p=0.044$) e negativamente associado aos níveis de colesterol total ($n=27$, $r=-0.3957$, $p=0.0411$) e HDL ($n=28$, $r=-0.4130$, $p=0.0289$). Nenhuma correlação significativa foi encontrada em relação ao IMC, circunferência abdominal e porcentagem de gordura corporal. A expressão de RNAm do gene VEGFA foi positivamente correlacionada à expressão de Adiponectina tanto no TAS ($n=29$, $r=0.5793$, $p=0.001$) quanto no TAV ($n=28$, $r=0.5523$, $p<0.01$).

3.2 Expressão de VEGFA entre pacientes com DM2/IGT e NGT

A amostra total foi subdividida em pacientes com alteração na tolerância à glicose (com DM2 e IGT) e aquelas com tolerância normal à glicose (NGT). Foi possível observar que, no TAV, pacientes DM2/IGT apresentaram expressão de VEGFA menor que NGT ($n=19$; $p=0,0491$) (Figura 1). Nesses grupos, não foram observadas diferenças significativas entre a expressão de VEGFA do TAS e do TAV, assim como na amostra total. A expressão de RNAm do gene VEGFA foi positivamente correlacionada à expressão de adiponectina tanto no TAS ($n=11$, $r=0.66$, $p<0.05$) quanto no TAV ($n=9$, $r=0.86$, $p<0.01$) do grupo DM2/IGT e também no TAS e TAV grupo de NGT (TAS: $n=18$, $r=0.57$, $p=0.01$; TAV: $n=19$, $r=0.40$, $p<0.01$).

4. DISCUSSÃO

A adipogênese está diretamente relacionada à angiogênese do tecido adiposo e nesse contexto o gene VEGF desempenha função importante. Assim, alguns estudos relatam o aumento dos níveis séricos (SILHA et al., 2005; MIYAZAWA-HOSHIMOTO et al., 2003) e de RNAm no tecido adiposo (LEDOUX et al., 2008) deste gene na obesidade. Alguns autores encontraram correlações positivas entre os níveis de VEGF e o IMC, sugerindo a associação dessa molécula com o excesso de peso (MIYAZAWA-HOSHIMOTO et al., 2003; LOEBIG et al., 2010; SIERVO et al., 2012). Nesses estudos a amostra geralmente apresentava grande variação nos valores de IMC. No entanto, a amostra do presente estudo (Tabela 1) apresentou apenas indivíduos com obesidade grau 3 e IMC variando entre 40,0 e 44,9. É possível que essa característica da amostra inviabilizou correlações de expressão gênica com este índice. Apesar disso, a expressão de VEGFA foi correlacionada positivamente à variável excesso de peso, a qual influencia no cálculo do IMC.

Miyazawa-Hoshimoto et al. (2003), em uma amostra de 38 obesos, mostram que as concentrações séricas de VEGF circulante são positivamente correlacionadas à área de TAV e não à área de TAS, obtidas por meio de tomografia computadorizada. Nesse estudo, a expressão de VEGFA foi similar em TAS e TAV. Dados semelhantes também foram observados por Ledoux et al. (2008) em um modelo de estudo *in vivo*, no qual uma porção de tecido adiposo dos indivíduos da amostra (obesos, constituindo de homens e mulheres, com 22% de diabéticos) foi mergulhada e estimulada em membrana corioalantóide de frango. Nesses resultados foi mostrado que não houve diferenças significativas entre TAS e TAV quanto à expressão de RNAm dos genes VEGFA e VEGFC. Nesse, a expressão de VEGFA permaneceu semelhante entre os depósitos mesmo quando a amostra foi subdividida, de acordo com presença de alterações na tolerância à glicose, indicando que TAS e TAV expressam VEGFA em níveis bastante próximos e simultaneamente, mesmo em grupos com perfis diferentes.

No presente estudo, a expressão do gene VEGFA também foi associado a dados bioquímicos e parâmetros clínicos, estando esse gene negativamente correlacionada aos níveis de HDL e Colesterol total no TAV. Alguns estudos indicam efeitos específicos na angiogênese gerados por dislipidemias ou

hipercolesterolemias (BLANN et al., 2001; RYU et al., 2006; JANG et al., 2000). Esses estudos mostram que altos níveis lipídicos podem prejudicar o desenvolvimento de vasos sanguíneos em diferentes tecidos. A correlação negativa entre níveis de colesterol e VEGFA corrobora esses dados e demonstra que esse efeito pode ocorrer durante a obesidade. Porém, essa associação ainda necessita de mais esclarecimentos.

Além desses resultados, a idade das pacientes foi correlacionada negativamente ao VEGFA, sugerindo que este parâmetro pode influenciar na expressão do gene. Alguns autores corroboram essa hipótese e discutem que a angiogênese é prejudicada pelo envelhecimento (MIENO et al., 2006; HOFSTAETTER et al., 2007; RIVARD et al., 1999).

A expressão de VEGFA no grupo das DM2/IGT é menor que em NGT (Figura 1). Estudos indicam que os níveis de glicose podem interferir na angiogênese (OREN et al., 2003; LING et al. 2012). Assim, por meio de análises *in vitro*, Dubois et al. (2010) mostraram que ilhotas pancreáticas, após receberem tratamento com altos níveis glicêmicos, apresentaram significativa diminuição das concentrações séricas de fatores pro-angiogênicos e da expressão do RNAm de VEGFA. Dessa forma, a alteração de expressão observada em DM2/IGT pode estar associada à glicotoxicidade gerada pelos altos níveis de glicose.

A hipótese da expansão do tecido adiposo propõe que esse processo não é ilimitado e que a capacidade reduzida de expansão desse tecido é um fator determinante para o surgimento de comorbidades associadas à obesidade (TAN e VIDAL-PUIG, 2008). Assim, é possível que o desenvolvimento da hiperglicemia e de outras comorbidades em obesos seja devida a uma redução na capacidade do tecido adiposo em expandir-se, a qual parece ser influenciada geneticamente. Então, a baixa expressão de VEGFA no TAV de DM2/IGT pode ser reflexo de uma adipogênese limitada mediada por uma baixa atividade angiogênica do tecido adiposo nesses indivíduos.

Um dos principais resultados desse estudo foi a correlação positiva consistente observada entre VEGFA e ADIPOQ no TAS e no TAV, mesmo depois que a amostra

total foi estratificada de acordo com as alterações na tolerância à glicose. Nesse contexto, Nannipieri et al. (2007) analisaram o gene da adiponectina no TAS e no TAV de obesos com DM2, obesos com IGT, obesos normais e magros controle e foi observado que a presença ou ausência de diabetes não gerou nenhum efeito adicional significativo na expressão de ADIPOQ. Assim, é possível que, no presente estudo, a conservação das correlações entre VEGFA e ADIPOQ, mesmo após a estratificação da amostra, seja em razão de que alterações da glicemia não geram grandes influências na expressão deste gene no tecido adiposo.

A adiponectina é sintetizada e secretada exclusivamente pelo tecido adiposo e sua atividade é muitas vezes associada a uma função protetora contra aterosclerose e diabetes (SHIBATA et al., 2004; OKAMOTO et al., 2002; UKKOLA e SANTANIEMI, 2002; YAMAUCHI et al., 2001). A produção de adiponectina decresce durante o desenvolvimento da obesidade e indivíduos obesos possuem a expressão dessa molécula em níveis menores que indivíduos não obesos (KIESS et al., 2008; KERN et al., 2003; SILHA et al., 2003). A função da adiponectina na angiogênese ainda não está bem definida e permanece controversa. Enquanto alguns estudos indicam que a adiponectina possui propriedades antiangiogênicas e antitumorais (Bråkenhielm et al. 2004) outros autores sugerem que essa molécula possui atividade promotora de angiogênese (SUN et al., 2011; SHIBATA et al., 2004; NAKAMURA et al., 2009; EREN et al., 2009; OUCHI et al., 2004). Esse resultado sugere que a redução da expressão de VEGFA e sua correlação com ADIPOQ no TAV está associado a um quadro metabólico pior em mulheres obesas.

Há evidências da presença de dimorfismo sexual nas concentrações séricas de VEGF, em que mulheres apresentam níveis maiores dessa molécula que homens (SILHA et al., 2005). Nesse contexto, a amostra deste estudo foi homogênea, sendo constituída exclusivamente por mulheres com obesidade grau III.

Em síntese, neste estudo as concentrações de RNAm de VEGFA foram semelhantes no TAS e no TAV. Alterações na tolerância à glicose e nos níveis de colesterol estão associados à expressão reduzida do VEGFA no TAV. Esses resultados são importantes, pois contribuem para gerar mais esclarecimentos sobre a expressão do gene VEGFA no tecido adiposo de mulheres obesas.

REFERÊNCIAS

BLANN, A. D. et al. Plasma Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flt-1 in Patients With Hyperlipidemia and Atherosclerosis and the Effects of Fluvastatin or Fenofibrate. **The American Journal of Cardiology**, v. 87, p. 1160-1163, 2001.

CAO, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 2362-2368, 2007.

CELEC, P.; YONEMITSU, Y. Vascular endothelial growth factor - basic science and its clinical implications. **Pathophysiology**, v. 11, p. 69-75, 2004.

DUBOIS, S. et al. Glucose inhibits angiogenesis of isolated human pancreatic islets. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 45, p. 99-105, 2010.

EREN, P. et al. Adiponectinemia Controls Pro-Angiogenic Cell Therapy. **Stem Cells**, v. 27, p.2712-2721, 2009.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 581-611, 2004.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 1-18, 2006.

HOFSTAETTER, J. G. et al. Age-dependent expression of VEGF isoforms and receptors in the rabbit anterior cruciate ligament. **Miochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 997-1002, 2007.

IDF. The International Diabetes Federation Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome, 2006.

JANG, J. J. et al. Angiogenesis Is Impaired by Hypercholesterolemia Role of Asymmetric Dimethylarginine. **Circulation**, v. 102, p. 1414-1419, 2000.

KERN, P. A. et al. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. **Diabetes**, v. 52, p. 1779–1785, 2003.

KIESS, W. et al. Adipocytes and adipose tissue. **Best Practice and Research, Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 22, p. 135-153, 2008.

LEDOUX, S. et al. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. **Diabetes**, v. 57, p. 3247-3257, 2008.

LING, L. et al. Worse Clinical Outcomes in Acute Myocardial Infarction Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Relevance to Impaired Endothelial Progenitor Cells Mobilization. **PLoS ONE**, v. 7, p. e50739 1-10, 2012.

LOEBIG, M. et al. Evidence for a Relationship between VEGF and BMI Independent of Insulin Sensitivity by Glucose Clamp Procedure in a Homogenous Group Healthy Young Men. **PLoS ONE**, v. 5, e12610, 2010.

MIENO, S. et al. Aging is associated with an impaired coronary microvascular response to vascular endothelial growth factor in patients. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 132, p. 1348-1355, 2006.

MIYAZAWA-HOSHIMOTO, S. et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. **Diabetologia**, v. 46, p. 1483-1488, 2003.

NAKAMURA, N. et al. Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1. **FEBS Letters**, v. 583, p. 2457-2463, 2009.

NANNIPIERI, M. et al. Pattern of expression of adiponectin receptors in human adipose tissue depots and its relation to the metabolic state. **International Journal of Obesity**, v. 31, p. 1843-1848, 2007.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 106, p. 276-2770, 2002.

OREN, Z. et al. Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast Impairment in Migration, Vascular Endothelial Growth Factor Production, and Response to Hypoxia. **American Journal of Pathology**, v. 162, p. 303-312, 2003.

OUCHI, N. et al. Adiponectin Stimulates Angiogenesis by Promoting Cross-talk between AMP-activated Protein Kinase and Akt Signaling in Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 1304-1309, 2004.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

RIVARD, A. et al. Age-Dependent Impairment of Angiogenesis. **Circulation**, v. 99, p. 111-120, 1999.

RYU, J. K. et al. Downregulation of angiogenic factors and their downstream target molecules affects the deterioration of erectile function in a rat model of hypercholesterolemia. **Urology**, v. 67, p. 1329-1334, 2006.

SIERVO, M. et al. Body mass index is directly associated with biomarkers of angiogenesis and inflammation in children and adolescents. **Nutrition**, v. 28, p. 262-266, 2012.

SILHA, J. V. et al. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 1308-1314, 2005.

SILHA, J. V. et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, p. 331-335, 2003.

SHIBATA, R. et al. Adiponectin Stimulates Angiogenesis in Response to Tissue Ischemia through Stimulation of AMP-activated Protein Kinase Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 28670-28674, 2004.

SUN, K. et al. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 2094-2101, 2011.

TAN, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 935-940, 2008.

UKKOLA, O.; SANTANIEMI, M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, p. 696-702, 2002.

WHO (World Health Organization). Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO Technical Report Series**, Geneva, v. 894, 2000.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, p. 941- 946, 2001.

Tabela 1: Características clínicas das pacientes.

	Média ± DP	Varição
Idade (anos)	35.5 ± 5.4	21.0 - 43.0
IMC (kg/m ²)	42.5 ± 1.6	40.0 - 44.9
Peso (kg)	111.5 ± 10.7	92.7 - 139.0
Excesso de peso (kg)	54.6 ± 6.6	43.9 - 71.8
Circunferência abdominal (cm)	119.8 ± 6.5	107.0 - 138.0
%Gordura	48.9 ± 2.5	41.0 - 52.1
Glicose (mg/dL)	91.9 ± 12.9	70.0 - 125.0
TOTG (mg/dL)	118.9 ± 36.4	63.0 - 195.0
Triglicerídeos (mg/dL)	137.8 ± 69.8	68.0 - 228.0
Colesterol total (mg/dL)	183.6 ± 33.4	104.0 - 258.0
HDL (mg/dL)	40.0 ± 10.0	16.0 - 74.0
LDL (mg/dL)	122.6 ± 49.9	67.6 - 289.0

IMC: índice de massa corporal. TOTG: Teste oral de tolerância à glicose. HDL: Lipoproteína de alta densidade. LDL: Lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 2: Lista primers usados na qPCR para medir os níveis de transcrição dos genes-alvo estudados e dos genes-controle SDHA, HPRT1 e GAPDH.

Gene	Primer Senso	Primer Anti-senso
ADIPOQ	CCCTGGTGAGAAGGGTGAGA	AAAGCCTCGGGGACCTTCAG
VEGFA	CTTTCTGCTGTCTTGGGTGC	TCGTGATGATTCTGCCCTCC
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
HPRT1	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
GAPDH	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT	TTCTCCATGGTGGTGAAGAC

Todas as sequências estão listadas no sentido 5' - 3'. ADIPOQ = Adiponectina; VEGFA = Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (todas isoformas); SDHA = Complexo Succinato Desidrogenase, Subunidade A; HPRT1 = Hipoxantina Fosforibosiltransferase 1; GAPDH = Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase.

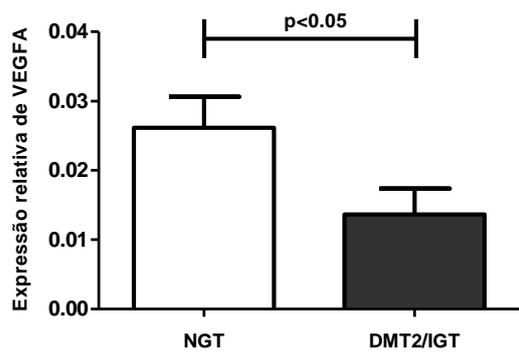


Figura 1. Expressão do gene VEGFA em TAV de pacientes DM2/IGT e NGT.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que a obesidade é considerada uma condição crônica, sendo um fator de risco importante para o surgimento de doenças de alta morbidade e mortalidade, muitas pesquisas estão sendo realizadas a fim de elucidar os mecanismos que ocasionam a obesidades e suas comorbidades.

Algumas hipóteses foram descritas para explicar como a disfunção do WAT poderia influenciar no aparecimento das alterações metabólicas observadas em indivíduos com obesidade. Nessas hipóteses, a inflamação e a diminuição da adipogênese parecem exercer forte influência sobre a disfunção do WAT, portanto, este trabalho verificou se a expressão de alguns genes envolvidos nesses processos biológicos difere nos distintos depósitos de WAT e se está correlacionada aos parâmetros metabólicos de indivíduos com obesidade.

Os principais resultados obtidos mostraram que i) a expressão do gene CEBPA é maior em SAT que em VAT das mulheres com obesidade, ii) a expressão do gene CEBPA é maior no SAT das mulheres com obesidade e T2DM/IGT que nas mulheres com NGT, iii) os genes SFRP1 e VEGFA estão menos expressos no VAT das mulheres com obesidade e T2DM/IGT que nas mulheres com NGT e iv) a expressão do gene COL18A1 em VAT foi associada a melhores níveis de HDL e tolerância à glicose.

Os diferentes depósitos de WAT exercem distintos efeitos sobre o metabolismo, sendo que o SAT está frequentemente associado a um melhor perfil cardio-metabólico que o VAT. O armazenamento eficiente do excesso de gordura no SAT, onde ocorre a expansão adequada do WAT que está associada a hiperplasia do mesmo, parece contribuir para esse efeito protetor do SAT. Assim, a expressão aumentada do gene CEBPA no SAT das mulheres com obesidade, principalmente nas pacientes com T2DM/IGT, pode refletir o maior índice de adipogênese nesse depósito, como um mecanismo compensatório que possa levar a melhora do perfil metabólico.

Uma vez que as proteínas sFRP1 inibem a sinalização WNT, a expressão reduzida do gene SFRP1 no VAT das mulheres com T2DM/IGT pode resultar na diminuição da inibição da via WNT/ β -catenina e, conseqüentemente, diminuição da adipogênese, o que pode refletir em alterações na tolerância à glicose, como o observado nas pacientes com T2DM/IGT. A redução da expressão do *VEGFA* no VAT dessas mulheres, também reforça que a expansão limitada do VAT está associada a um pior quadro clínico.

A composição e a dinâmica da ECM do WAT são elementos essenciais para a função normal dos adipócitos. Diante da importância do *COL18A1* para a adipogênese, há um grande interesse do nosso grupo em estudar esse gene em indivíduos com obesidade. Neste trabalho, a expressão do *COL18A1* em VAT parece resultar em um melhor perfil metabólico.

Muitos estudos tentam caracterizar mudanças metabólicas decorrentes de alterações na tolerância à glicose, através da comparação entre indivíduos com NGT e com T2DM. Em muitas pesquisas, entretanto, os indivíduos com T2DM e IGT também são obesos, enquanto os indivíduos com NGT não são obesos. Além disso, os grupos são compostos por homens e mulheres. A homogeneidade das características principais das pacientes utilizadas nesta pesquisa – todas mulheres, com obesidade grau III – é um ponto importante neste trabalho. Todavia, sendo a amostra de material biológico de origem humana, principalmente de tecido, difícil de obter, os critérios de exclusão deste estudo serem bastante rigorosos, além da dificuldade de obtenção de RNAm em tecido com alto teor de lipídios, a amostra pequena foi o principal fator limitante deste estudo.

Estudos adicionais, principalmente com abordagens funcionais, ainda são necessários para confirmar a participação dos genes CEBPA, SFRP1 e COL18A1 no surgimento das comorbidades associadas à obesidade. Este trabalho, entretanto, contribuiu para proporcionar novas perspectivas de identificação de genes com potencial de se tornarem: i) biomarcadores de risco para complicações metabólicas, auxiliando na identificação de indivíduos com maior necessidade de intervenção precoce, e ii) novos alvos para a prevenção e tratamento do excesso de peso, bem como para as comorbidades associadas à obesidade.

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética da UFES.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Vitória-ES, 29 de junho de 2006

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Dr. Gustavo Peixoto Soares Miguel
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Avaliação da equivalência entre a operação de Fobi-Capela (gastroplastia vertical com anel e By-pass gástrico em Y de Roux) e a operação de Mason modificada (gastrectomia vertical com anel) para o tratamento da obesidade mórbida”**

Senhor Pesquisador,

Através deste informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa, No. de Registro no CEP-049/06, intitulado: **“Avaliação da equivalência entre a operação de Fobi-Capela (gastroplastia vertical com anel e By-pass gástrico em Y de Roux) e a operação de Mason modificada (gastrectomia vertical com anel) para o tratamento da obesidade mórbida”**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 28 de junho de 2006,

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico / UFES

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7504

ANEXO 2 - Protocolo de avaliação clínica.

Nome: _____ RGHC: _____

DN: _____ Idade: _____ Local do Nascimento: _____

Feminino () Masculino () Cor: B () MC () MM () ME () N ()

Endereço: _____ N°: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Tel: _____ Tel: _____ Cel: _____

Altura: _____ peso: _____ IMC: _____ Cintura: _____ Quadril: _____ WHR: _____

Tem parente no ambulatório? Não () Sim () Nome: _____

_____ Tel: _____

Fumo: Não () Sim () Ex- fumante 1 ano () 5 anos () OBS: _____

Álcool: Não () Sim () Socialmente () Todos os dias () OBS: _____

Exercício: Não () Sim () Às vezes () 3x semana ou mais ()

Obesidade: Sim () Não () Tipo: _____

Operada: Não () Sim () Quando? _____

Hipertensão: () Não Sim () PA: _____ Duração: _____

Antes do DM () Após DM () Antes OB () Após OB ()

Tipo de Diabetes: Tipo I () Tipo II () Outros () Início: _____ Duração: _____

OBS: _____

Sintomas: _____

Insulina no 1º ano? Sim () Não ()

Complicações: Cardiovasculares(). Angina(). Infarto(). AVC(). Trombose().

Renais() Neurológicas(). Artrite(). Artrose().

Relacionadas a visão : Retinopatia() Refrativo() Catarata() Glaucoma()

Outras Doenças: _____

Medicação: _____

Em qual tipo abaixo você se identifica:

() branco () negro () mulato () índio () outros

Descendência Avós Maternos _____

Descendência Avós Paternos _____

Listagem de Exames Laboratoriais

Dosagens:

___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
—	—	—	—	—
Uréia	Uréia	Uréia	Uréia	Uréia
Creatinina	Creatinina	Creatinina	Creatinina	Creatinina
Colesterol	Colesterol	Colesterol	Colesterol	Colesterol
LDL	LDL	LDL	LDL	LDL
HDL	HDL	HDL	HDL	HDL
Triglicerídeos	Triglicerídeos	Triglicerídeos	Triglicerídeos	Triglicerídeos
Sódio	Sódio	Sódio	Sódio	Sódio
Potássio	Potássio	Potássio	Potássio	Potássio
TSH	TSH	TSH	TSH	TSH
T3	T3	T3	T3	T3
T4	T4	T4	T4	T4
Glicemia	Glicemia	Glicemia	Glicemia	Glicemia
Gli prandial				
Hb glicada				

Histórico Familiar:

Obesidade: _____

Diabetes: _____

Hipertensão: _____

Dislipidemias: _____

Doença Cardiovascular: _____

Tireoideopatias: _____

Câncer: _____

Asma: _____

Cefaléia: _____

Surdez: _____