RENÉE DE NAZARÉ OLIVEIRA DA SILVA

EFEITO PROTETOR DO BAÇO CONTRA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO DE CAMUNDONOGOS OBESOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2018

RENÉE DE NAZARÉ OLIVEIRA DA SILVA

EFEITO PROTETOR DO BAÇO CONTRA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO DE CAMUNDONOGOS OBESOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine.

Versão Corrigida

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva, Renee de Nazare Oliveira
Efeito protetor do baço contra a resposta inflamatória do tecido adiposo perivascular do leito mesentérico de camundongos obesos. / Renee de Nazare Oliveira Silva; orientadora Eliana Hiromi Akamine. -- São Paulo, 2018.
94 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Tecido adiposo perivascular. 2. baço. 3. dieta hiperlipídica. 4. AMPK. I. Akamine, Eliana Hiromi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renée de Nazaré Oliveira da Silva.

Título da Tese: Efeito protetor do baço contra a resposta inflamatória do tecido adiposo perivascular do leito mesentérico de camundongos obesos.

Orientador(a):Dra. Eliana Hiromi Akamine.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessãon pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.071.2017

São Paulo, 10 de agosto de 2017.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "***Participação do baço na infiltração de células imunológicas no tecido adiposo perivascular de camundongos obesos***", registrado sob o protocolo nº ***90/2013*** e aprovado em 13/08/2013, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 13/08/2021**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Mus musculus	C57BL/6	Macho	20 semanas	1º ano: 100

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Eliana Hiromi Akamine**
Departamento de **Farmacologia**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus pais amados Nilson e Renée, por todo amor, compreensão, incentivo e apoio. As minhas amadas irmãs Renaira e Raísa, pelo companheirismo e amor. O meu muito obrigada por fazerem parte da minha vida, amo muito vocês.

AGRADECIMENTO

Incialmente agradeço a Deus por toda luz, força e sabedoria concedida a mim para a realização desse trabalho.

À minha família, meus pais Nilson e Renée, minhas irmãs Renaira e Raisa, por todo amor e incentivo diário a persistir na busca pelos meus objetivos. A minha tia Rejane e minhas primas Juliana e Raielli, aos meus avós João, Lourdes, Pedro (em memória) e Maria Fausta (em memória) por toda incentivo e amor.

À minha querida orientadora professora Dra. Eliana Hiromi Akamine, pela oportunidade de receber todos seus ensinamentos. Obrigada Chefinha pela paciência na correção dos relatórios, por me tornar uma pesquisadora mais prudente e ao mesmo tempo crítica e pela amizade gerada entre nós. Serei eternamente grata.

Às professoras Dra. Zuleica Bruno Fortes e Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho pela oportunidade de convivermos e ensinamentos.

Ao professor Dr. Ricardo Ambrósio Fock e sua aluna Msc. Carolina Dias pela colaboração e todo aprendizado. Muitíssimo obrigada.

Ao Dr. Stephen Rodrigues pela colaboração, ensinamento, amizade e discussões científicas.

Ao professor Dr. Tomasz Guzik e sua equipe: Dominik, Tomasz, Eilidh e Selena, por todo aprendizado e amizade.

À professora Dra. Rhian Touyz e sua equipe: Guto Montezano, Rhèure Lopes, Karla Neves e Lívia de Lucca. Obrigada por todo ensinamento, paciência e amizade. Vocês são muito especiais.

A equipe (Japa-Índia) mais maravilhosa de todas, as irmãs que doutorado me presenteou Aline Inada e Carolina Midori. Obrigada por tanto amor, confiança, irmandade e paciência. Amo muito vocês.

Aos amigos não só de laboratório, mas pessoas que se tornaram meus grandes amigos: Cinthya Echem, Vanessa Oliveira, Tiago Januário, Maristela

Ladgraf, Andrea, Paula Barros, Bruno Marques, Anna Patsea, Vanessa Miyoshi e Beatriz Costa muito obrigada. Aos queridos técnicos Bazinha (Sônia), Rosangela, Tonho, Cidorinha, Martinha, Ritinha e a Sandra, muito obrigada por todo ensinamento e amizade. Vocês são muito especiais na minha vida.

Às queridas secretarias: Mônica, Camila, Selminha, Rosa e Laiane pela paciência com todas as minhas dúvidas. Vocês são muito especiais.

As amigas amadas que fazem parte da minha caminhada em São Paulo: Gisele Facholi Bonfim, Simone Sartoretto, Karla Santiago, Franciele Knebel, Vanessa Franco, Milene Fontes, Gisele Couto, Tainara Sartoretto e Fernanda Gonzales. Muito obrigada pelas cervejas, apoio e amizade. Vocês tornam minha vida mais leve e feliz.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número do processo:1441156/2013-0, pelo apoio financeiro.

À CAPES-PDSE, número do processo:88881.132199/2016-01, pelo apoio financeiro para a realização do Doutorado Sanduíche.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que me auxiliaram nessa jornada.

RESUMO

SILVA, R.N.O. **Efeito protetor do baço contra a resposta inflamatória do tecido adiposo perivascular do leito mesentérico de camundongos obesos**. 2018. 95 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo,2018.

Na obesidade ocorre hipertrofia dos adipócitos e inflamação do tecido adiposo visceral. O tecido adiposo perivascular (PVAT) circunda a maioria dos vasos sanguíneos. Assim como outros depósitos, o PVAT também é propenso à inflamação. A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) está presente no PVAT e está relacionada com a redução da inflamação nesse tecido. O baço é um órgão linfoide e é um importante regulador do sistema imunológico. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do baço na resposta inflamatória do PVAT do leito mesentérico e o possível envolvimento da AMPK nos camundongos obesos. Para isso, camundongos machos C57BL/6 de 4 semanas de idade foram submetidos à esplenectomia (SPX) ou à cirurgia fictícia (SHAM) e passaram a ser alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso) durante 16 semanas. O baço e o PVAT do leito mesentérico foram utilizados para analisar: o conteúdo proteico de citocinas, imunofenotipagem de leucócitos, expressão de AMPK e $pAMPK^{thr172}$ e quimiotaxia de células de baço para PVAT. A expressão do mRNA da adiponectina foi avaliada no PVAT mesentérico. Baços de camundongos selvagens (WT) e com deleção genética da AMPKa1 (KO) alimentados com dieta CT ou HF foram utilizados para avaliar a expressão de mRNA de citocinas e imunofluorescência para detecção de linfócitos totais. O baço de camundongos obesos apresentou aumento no conteúdo de TNF-α, diminuição no conteúdo de IL-10 e população similar de células imunológicas e fosforilação da AMPK. O PVAT mesentérico de OB-SHAM mostrou reduzido conteúdo de citocinas pró-inflamatórias, inalterada área de adipócitos, fosforilação de AMPK, células T e macrófagos M1 e redução de células B e macrófagos M2. Por outro lado, o PVAT mesentérico de SPX-OB mostrou hipertrofia de adipócitos, redução da fosforilação de AMPK, aumento de citocinas pró-inflamatórias, redução de células B e macrófagos M2 e aumento de macrófagos M1. No entanto, a resposta dos leucócitos migratórios do baço para o PVAT foi reduzida nos grupos OB-SHAM e OB-SPX. O baço de camundongos AMPK KO mostrou um perfil inflamatório diminuído. Em conclusão, nossos dados indicam que a associação da atividade da AMPK e a inflamação é diferente no PVAT do leito mesentérico e no baço de camundongos obesos. O baço e a AMPK expressão no PVAT podem proteger esse tecido contra os danos promovidos pela dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: Tecido adiposo perivascular, baço, dieta hiperlipídica, AMPK

Abstract

SILVA, R. N.O. **Spleen protective effect against the inflammatory response of perivascular adipose tissue from bed mesenteric of obese mice**. 2018. 95 p. Ph.D.thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2018.

Adipocyte hypertrophy and inflammation in the visceral adipose tissue are observed in obesity. The perivascular adipose tissue (PVAT) surrounds blood vessels and exerts paracrine action on the vasculature. The enzyme AMP-activated protein kinase (AMPK) appears reduce inflammation. Spleen is the largest lymphoid organ and it is an important regulator of the immune system. In this study, we investigated the influence of the spleen on the inflammatory profile of mesenteric PVAT in obese mice and whether AMPK would protect from effects promoted by high fat diet. To test this hypothesis C57BL/6 male mice were either splenectomized (SPX) or sham operated (SHAM) and received either control (CT) or high fat diet (HF, OB). Spleen and mesenteric PVAT were used to analyse: protein content of cytokines, immunephenotyping of leukocyte, AMPK and pAMPK^{thr172} expression and spleen cell chemotaxis for PVAT. Expression of adiponectin mRNA was evaluated in mesenteric PVAT. Spleens from wild type (WT) and AMPKa1 knockout (KO) mice fed CT or HF diet were used for expression of mRNA of cytokines and immunofluorescence for detection leukocyte. Spleen of obese mice showed increase in TNF-α content, decrease in IL-10 content and similar population of immune cells and AMPK phosphorylation. Mesenteric PVAT from OB-SHAM showed reduced proinflammatory cytokine content, unchanged adipocyte area and AMPK phosphorylation, T cells and M1 macrophages, and reduced B cells and M2 macrophages. On the other hand, mesenteric PVAT from SPX-OB showed adipocyte hypertrophy, reduced AMPK phosphorylation, increased proinflammatory cytokines, reduced B cells and M2 macrophages and increased M1 macrophage. However, migratory leukocyte response from spleen to PVAT was reduced in both OB-SHAM and OB-SPX groups. Spleen from AMPK KO mice showed a decreased inflammatory profile. In conclusion, ours results showed the association between AMPK activity and inflammation is different in mesenteric PVAT and spleen of obese mice. The spleen and AMPK expressed in the mesenteric PVAT may protect this tissue against deleterious effects promoted by HFD.

Keywords: Perivascular adipose tissue, spleen, high fat diet, AMPK

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição esquemática da organização arquitetônica de áreas esplênicas contendo várias células imunológicas.....**26**

Figura 2. Ganho de massa corpórea ao longo de 16 semanas.....**41**

Figura 3. Índice de Lee {[peso corporal$^{1/3}$(g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100}, massa relativa dos depósitos de gorduras.....**42**

Figura 4. Glicemia e insulinemia.....**43**

Figura 5. Análise morfológica do baço.....**44**

Figura 6. Imunofenotipagem de células isoladas do baço.....**46**

Figura 7. Avaliação do perfil inflamatório.....**47**

Figura 8. Análise morfológica do PVAT do leito mesentérico.....**48**

Figura 9. Imunofenotipagem de células do PVAT do leito.....**50**

Figura 10. Avaliação da população de macrófagos M1 e M2 no leito mesentérico **51**

Figura 11. Avaliação do conteúdo de citocinas no PVAT do leito mesentérico.....**53**

Figura 12. Migração dos leucócitos do baço para o tecido adiposo perivascular (PVAT) do leito mesentérico.....**54**

Figura 13. Análise da expressão proteica de AMPK total (A) e fosforilada no resíduo treonina 172 (B, pAMPK ^{Thr172}) no baço.....**55**

Figura 14. Análise da expressão proteica de AMPK total (A) e fosforilada no resíduo treonina 172 (B, pAMPK ^{Thr172}) no PVAT do leito mesenterico.....**56**

Figura 15. Análise da expressão de RNAm da adiponectina no PVAT do leito mesentérico.....**57**

Figura 16. Análise da expressão de RNAm relativa do (A) INF-γ, (B) t-Bet e (C) IL-10, normalizadas pelo controle endógeno GAPDH, (D) cortes de baço marcados com anticorpo anti-CD3 E (E) análise quantitativa da população de CD3 no baço de camundongos selvagens (WT) e deficiêntes para AMPKα1 (KO).....**58**

Figura 17. Análise morfológica do tecido adiposo periepididimal.....**59**

Figura 18. Imunofenotipagem de células do depósito do tecido adiposo periepididimal.....**61**

Figura 19. Avaliação da população de macrófagos M1 e M2 no tecido adiposo periepididimal.....**62**

Figura 20. Avaliação do conteúdo de citocinas no tecido adiposo periepididimal.....**63**

Figura 21. Migração dos leucócitos do baço para no tecido adiposo periepididimal.....**64**

Figura 22. Análise da expressão proteica de AMPK total (B) e fosforilada no resíduo treonina 172 (C, pAMPK ^{Thr172}) no tecido adiposo periepididimal.....**65**

Figura 23. Análise relativa da expressão do RNAm da adiponectina no tecido adiposo periepididimal **66**

Figura 24. Imunofenotipagem de células do sangue **68**

Figura 25. Imunofenotipagem de células isoladas da medula óssea **70**

Figura 26. Imunofenotipagem de células isoladas do timo.....**71**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do índice de massa corpórea (IMC) (OMS,2015) **18**

Tabela 2. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.....**35**

Tabela 3. Especificação dos oligonucleotídeos.....**38**

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
AMPKK	Quinase reguladora da AMPK
ATP	Adenosina trifosfato
CCR2	Receptor de quimiocina 2
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Sintase da óxido nítrico endotelial
FBS	Soro fetal bovino
FRDP	Fator relaxante derivado do tecido adiposo perivascular
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
IL-10	Interleucina 10
IL-1B	Interulencia 1β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corpórea
INF-γ	Interferon γ
KO	Camundongo *knockout*
M1	Macrófagos do fenótipo 1
M2	Macrófagos do fenótipo 2
MCP-1	Proteína quimioatraente de macrófagos-1
mTOR	*Mechanistic target of rapamycin*
NK	*Natural killer*
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Proteína C reativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PVAT	Tecido adiposo perivascular
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SPX	Esplenectomizado
t-Bet	Fator de transcrição para diferenciação do perfil Th1
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UCP	Proteína desacopladora
WT	Camundongo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2. OBJETIVO 28
2.1 Delineamento experimental 28
3 MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 Animais 29
3.1.1 *Linhagem SV129* 29
3.2 Esplenectomia 30
3.3 Indução da obesidade 30
3.4 Caracterização da obesidade 31
3.5 Obtenção do sangue e tecidos 31
3.6 Histologia do PVAT e do baço 31
3.7 Citometria de fluxo 32
3.7.1 *Anticorpos* 32
3.7.2 *Extração de células* 32
3.7.3 *Imunofenotipagem* 34
3.8 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias 35
3.9 Western blotting 35
3.9 Ensaio de transmigração *in vitro* 37
3.11 Determinação da expressão de RNAm por PCR em tempo real 37
3.12 Imunofluorescência do baço 38
3.13 Análise estatística 39
4 RESULTADOS 40
4.1 Caracterização do modelo experimental 40
4.1.1 *Evolução ponderal e consumo de água, ração e calorias* 40
4.1.2 *Índice de Lee, massa dos depósitos de gordura e massa magra* 42
4.1.3 *Glicemia e insulinemia* 43
4.2 Efeitos da dieta hiperlipídica no baço 44
4.2.1 *Morfologia* 44
4.2.2 *Imunofenotipagem das células imunológicas* 45
4.2.3 *Avaliação do conteúdo de citocinas* 47
4.3 Efeitos da dieta hiperlipídica e da esplenectomia no PVAT do leito mesentérico 48
4.3.1 *Morfologia* 48

4.3.2 *Imunofenotipagem das células imunológicas* 49
4.3.3 *Avaliação do conteúdo de citocinas* 52
4.4 Quimiotaxia induzida pelo PVAT do leito mesentérico 54
4.5 Expressão da AMPK 55
4.5.1 *Baço* 55
4.5.2 *PVAT do leito mesentérico* 56
4.6 Expressão o RNAm da adiponectina no PVAT do leito mesentérico 57
4.7 AMPK-KO 58
4.8 Efeito da dieta hiperlipídica e da esplenectomia no tecido adiposo periepididimal 59
4.8.1 *Morfologia* 59
4.8.2 *Imunofenotipagem de células imunológicas* 60
4.9 Quimiotaxia induzida pela gordura periepididimal 64
4.10 Expressão da AMPK no tecido adiposo periepididimal 65
4.12 Imunofenotipagem de células imunológicas do sangue periférico 67
4.13 Imunofenotipagem de células imunológicas da medula óssea 69
4.14 Imunofenotipagem de células imunológicas do timo 70
5 DISCUSSÃO 71
6 CONCLUSÃO 78
7 REFERENCIAS 79

1. INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser considerada a “Nova Síndrome do Mundo”, isso porque o número de indivíduos obesos, independente de classe social e/ou idade, cresce a cada ano (NAMMI et al., 2004). Segundo a Organização Mundial da Saúde, 1,9 bilhões de adultos, 39% da população mundial, encontra-se com excesso de peso. Destes, 11%, ou seja, 600 milhões, são obesos (OMS, 2015). No Brasil, 40% da população foi classificada com sobrepeso (OMS, 2011). Estima-se que no ano de 2025 haja 2,3 bilhões de pessoas no mundo acima do peso e, destas, 700 milhões serão classificadas como obesas. Em vista disso, a obesidade é considera uma epidemia global (OMS, 2014).

Um dos parâmetros utilizados para classificar o sobrepeso e a obesidade é o índice de massa corporal (IMC). Para tanto, calcula-se a razão entre a massa corporal do indivíduo (kg) pela altura do mesmo ao quadrado (m^2). Os valores de IMC para a classificação do peso de um indivíduo são descritos na Tabela 1 (RASOULI et al., 2007; JAMES, 2008; OMS, 2015;).

Tabela 1- Classificação do índice de massa corpórea (IMC) (OMS,2015).

Classificação	IMC
Normal	18,5-24,9
Sobrepeso	25,0-29,9
Obesidade classe I	30,0-34,9
Obesidade classe II	35,0-39,9
Obesidade classe III ou Obesidade mórbida	Acima de 40

A obesidade é definida pelo acúmulo anormal excessivo de tecido adiposo (OMS, 2015), seu desenvolvimento é atribuído a um desequilíbrio, de origem multifatorial, entre o consumo e o gasto energético, podendo estar mais associado a fatores comportamentais, tais como sedentarismo e/ou ingestão excessiva de alimentos com alto teor de gorduras e carboidratos, do que propriamente a alterações genéticas (BLOOR e SYMONDS, 2014). É importante ressaltar, ainda, que a localização do acúmulo de tecido adiposo deve ser considerada para avaliar a obesidade e, nesse sentido, a razão

cintura/quadril e a circunferência abdominal são medidas essenciais, pois avaliam o acúmulo visceral de gordura (ZRAIKA et al., 2002; WANG et al., 2008).

O sobrepeso e a obesidade são fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, tais como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, apneia do sono e câncer (como, por exemplo, o de mama) (LEAL e MAFRA, 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual o acúmulo do tecido adiposo está relacionado com essas doenças ainda não foi completamente compreendido.

Por muitos anos o tecido adiposo foi considerado apenas como um reservatório enérgico (FLIER et al., 1987), entretanto sabe-se que esse tecido participa também do metabolismo dos esteroides sexuais, da manutenção da temperatura corpórea, da regulação hormonal e da proteção mecânica visceral (FONSECA et al., 2006 e OUCHI et al., 2011). Em 1994, Zhang e colaboradores mudaram o paradigma do tecido adiposo ao descreverem que o mesmo secretava e sintetizava a leptina; a partir de então diversas substâncias bioativas, chamadas de adipocinas, foram descritas, conferindo a esse tecido funções endócrinas.

A primeira adipocina a ser descrita foi a leptina, que atua no sistema nervoso central inibindo a formação de neuropeptídios relacionados com o apetite, como o neuropeptídeo Y; e também através do aumento da expressão de neuropeptídios anorexígenos, como o hormônio estimulante de α-melanócito (α-MSH) e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) (ZHANG et al, 1994, NEGRÃO et al., 2000, WILDING, 2001).

Existe uma grande variedade de adipocinas presentes no tecido adiposo, em termos de estrutura e função (TRAYHURN, 2005), que podem ter ação local de forma parácrina e autócrina, bem como sistemicamente, de forma endócrina (GAO, 2006, KERSHAW e FLIER,2004). Esse grupo inclui, além da leptina, citocinas clássicas (TNF-α e IL-6), fatores de crescimento (fator de transformação de crescimento), proteínas do sistema do complemento alternativo (adipsina), proteínas envolvidas na hemostasia (inibidor do ativador de plasminogênio-1), na regulação da pressão arterial (angiotensinogênio), no

metabolismo de lipídeos (proteína de transferência de éster de colesterol e proteína carreadora do retinol), na homeostase da glicose (adiponectina) e na angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular); bem como as proteínas de fase aguda (proteína C-reativa - PCR) e de resposta ao estresse (haptoglobina, metalotioneína) (TRAYHURN, 2005).

O tecido adiposo é composto por adipócitos, classificados em três tipos: marrom, bege e branco (PFEIFER e HOFFMANN, 2015, GUSTAFSON et al., 2010; MAENHAUT et al., 2011). Além dos adipócitos, é formado também por pré-adipócitos, células tronco mesenquimais, células vasculares, células neurais e células do sistema imunológico, como monócitos, linfócitos e macrófagos residentes, todas elas contribuindo para a secreção de adipocinas que atuam em vários órgãos e sistemas, influenciando e modulando suas funções, como, por exemplo, o fígado, o músculo esquelético e o sistema cardiovascular (GUSTAFSON et al., 2010; MAENHAUT et al., 2011).

O tecido adiposo marrom é composto por adipócitos marrons, os quais possuem várias vesículas lipídicas, tornando-os multioculares; com um grande número de mitocôndrias, possuem alta expressão da proteína desacopladora-1 (UCP-1) e são amplamente vascularizados. A ativação da UCP-1 dissipa o gradiente de elétrons para a síntese de ATP, o que estimula a atividade da cadeia respiratória e, ao utilizar nutrientes disponíveis, resulta na geração de calor (termogênese) (BOLUS e HASTY, 2018, IKEOZA et al., 2010). Esse tipo de tecido encontra-se principalmente, em recém-nascidos e crianças, nas regiões cervicais (FONSECA et al., 20 06), em adultos na região supraclavicular e em roedores na região interscapular (BOLUS e HASTY, 2018).

O tecido adiposo branco é composto por adipócitos brancos, que contém uma única gota lipídica, tornando-os uniloculares; armazenam energia na forma de triglicerídeos e participam da regulação do balanço energético mediante ao processo de lipogênese e lipólise (BLOOR e SYMONDS, 2004), além disso, possuem alta capacidade de secretar adipocinas, conferindo a este tecido função endócrina (VÁZQUEZ-VELA et al.,2008, BOLUS e HASTY, 2018). Em humanos, o tecido adiposo branco é amplamente distribuído em dois depósitos de gordura: o depósito subcutâneo e o visceral, localizados

especificamente nas áreas retroperitoneal, mesentérica e omental; adicionalmente, esse tecido está presente também em depósitos menores que circundam o coração, os vasos sanguíneos e os rins, chamados de depósitos epi/pericárdio, perivascular e perirenal, respectivamente. Roedores, além desses depósitos, possuem também depósito gonadal (BLOOR e SYMONDS, 2004, BOLUS e HASTY, 2018).

O adipócito bege possui características morfológicas de adipócitos brancos, como armazenamento de lipídeos, e de adipócitos marrons, como a expressão da proteína UCP-1 (WALDÉN et al., 2011). Pode originar-se da transdiferenciação dos adipócitos brancos ou por meio da diferenciação e maturação de células precursoras, sendo sua origem embrionária diferente da demais (BOLUS e HASTY, 2018). Estímulos, tais como a exposição prolongada ao frio ou a fármacos, como os agonistas beta-adrenérgicos e PPAR-γ (CHEN et al., 2016), estimulam o desenvolvimento de adipócitos bege nos depósitos de tecido adiposo branco, processo chamado de “browning”. Em roedores, os adipócitos beges encontram-se principalmente na região inguinal (BLOOR e SYMONDS, 2004, BOLUS e HASTY, 2018).

Outro tipo de tecido adiposo, o tecido adiposo perivascular (PVAT), circunda os vasos sanguíneos, com exceção da microcirculação e do leito cerebral, especificamente ao redor da camada adventícia – camada mais externa do vaso sanguíneo –, não existindo uma barreira anatômica que os separe (RAJSHEKE et al., 2011, HUANG et al, 2018, MEIJER et al., 2011). Acreditava-se que este tecido era apenas um componente estrutural, cuja função seria fornecer proteção mecânica aos vasos sanguíneos durante a contração dos tecidos próximos (BROWN et a., 2014), entretanto sabemos que além do papel estrutural, o PVAT desempenha muitos outros papéis na função vascular, pois secreta adipocinas metabolicamente ativas, conferindo a esse tecido funções endócrinas e parácrinas.

O PVAT é composto por células-troncos, pré-adipócitos, fibroblastos, mastócitos e inervação (ERINGA et al., 2012; MEIJER et al., 2011 CALABRO e YEH, 2007). Dependendo de sua localização, sua estrutura e composição são diferentes (VOORDE et al., 2014): o PVAT da aorta torácica, por exemplo, é semelhante ao tecido adiposo marrom, com adipócitos multiloculares, grande

número de mitocôndrias e expressão da UCP-1 (CHATTERJEE et al., 2009; FITZGIBBONS et al., 2011), enquanto o PVAT das artérias coronarianas, mesentéricas e aorta abdominal se assemelha ao tecido adiposo branco, com células uniloculares, menor vascularização e presença de células imunológicas, como macrófagos (SZASZ e WEBB, 2012, GUZIK et al., 2013).

Embora apresente semelhanças com os demais depósitos, o PVAT parece ter origem embrionária distinta. A deleção condicionada do PPARγ em células que expressam SM22α1 impede o desenvolvimento de PVAT no leito mesentérico e na região aórtica, mas sem interferir no desenvolvimento dos depósitos interscapular, gonadal, inguinal, subcutâneo e periepididimal em camundongos (CHANG et al., 2012). A ausência de desenvolvimento do PVAT pode ser explicada pelo fato de o gene SM22α1, expresso em células do músculo liso vascular no início do desenvolvimento, ser expresso de maneira transitória em células precursoras de PVAT ou o PVAT e as células do músculo liso vascular compartilharem do mesmo precursor (BROWN et al., 2014). Em conjunto, os dados sugerem que a origem embrionária do PVAT é distinta dos demais depósitos.

Até o ano 1991, acreditava-se que o PVAT não exercia nenhuma função sob a vasculatura, por isso eram removidos para os estudos relacionados à função vascular. Porém Soltis e Casis (1991) demonstraram que o PVAT possuía ação anticontrátil sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta torácica de ratos Wistar. A partir de então, outros estudos descreveram que o efeito anticontrátil do PVAT pode ocorrer por meio da liberação de diversas substâncias vasoativas, como fator relaxante derivado do PVAT (FRDP), a angiotensina (1-7), adiponectina, peróxido de hidrogênio, leptina e óxido nítrico (NO) (FERNÁNDEZ-ALFONSO et al., 2013, GOLLASH e DUBROVSKA, 2004).

Diante do fato que componentes secretados pelo PVAT poderiam exercer ação nas células do músculo liso vascular, estudos buscaram compreender a função do PVAT em diversas doenças. Foi demonstrado, em modelos animais, que a obesidade induzida por dieta promove a perda do efeito anticontrátil (GUZIK et al., 2007; MA et al., 2010; GAO et al., 2007). Diversos fatores podem contribuir para a perda do efeito anticontrátil do PVAT,

como redução da NO sintase endotelial (eNOS) e da AMPK (MA et al., 2010; MEIJER et al., 2013). Em nosso laboratório, foi demonstrado que a obesidade, induzida por dieta hiperlipídica por 16 semanas, inibe a ação anticontrátil do PVAT em artérias de resistência do leito mesentérico, corrigida pelo tratamento com antagonista do receptor AT1 e aumento da eNOS (HASHIMOTO, 2016).

Além de fatores vasodilatadores, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6, IL-18 e MCP-1), angiotensina II e ânion superóxido também são produzidos pelo PVAT (MAENHAUT e VAN De VOORDE, 2011, MIAO e LI, 2012, SCHROETE et al., 2013, da COSTA et al., 2018), de maneira que, semelhantemente aos demais depósitos, estresse oxidativo (KETONEN et al., 2010; REBOLLEDO et al., 2010; Gil-ORTEGA et al.,2014; MARCHESI et al., 2009), hipóxia e inflamação (GREENSTEIN et al., 2009) também podem ser observados no PVAT. Cartterjee et al. (2009) demonstraram que os adipócitos brancos presentes no PVAT do leito coronariano de humanos secretam mais quimiocinas (MCP-1 e IL-8) e citocina pró-inflamatória (IL-6) e menor infiltração de linfócitos T comparados aos depósitos de tecido adiposo subcutâneo e visceral (CARTTERJEE et al.,2009). Em outro leito vascular – aorta abdominal –, foi observado aumento na produção de IL-8 e de MCP-1 em indivíduos obesos, este aumento foi relacionado com a infiltração de leucócitos neste tecido, levando a um estado pró-inflamatório (HENRICHOT et al., 2005). Em modelos animais, Police e colaboradores (2009) observaram que camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica apresentam maior liberação e expressão de MCP-1 e de seu receptor, o CCR2, em tecido adiposo periaórtico da aorta abdominal, cujo fenótipo é de tecido adiposo branco. No entanto, o PVAT de aorta torácica de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresenta reduzida infiltração de macrófagos em relação ao PVAT da aorta abdominal (FITZGIBBONS et al., 2011).

A inflamação do PVAT pode estar associada à perda da função anticontrátil. Aoqui e colaboradores (2014) constataram que a perda da função anticontrátil do PVAT do leito mesentérico ocorreu apenas quando houve infiltração de células inflamatórias e aumento da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Almabrouk e colaboradores (2018) apontaram que a proteína AMPK pode ser o elo entre a perda da função anticontrátil e a

inflamação do PVAT em camundongos obesos. Esses autores mostraram que camundongos deficientes de AMPKα1 não obesos apresentaram perda da função anticontrátil e infiltração de células inflamatórias no PVAT, de maneira similar aos camundongos obesos, que também apresentaram reduzida ativação da AMPK.

A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) é uma proteína heterotrimétrica que consiste em uma subunidade α catalítica e subunidades β e γ regulatórias. Em mamíferos existem múltiplas isoformas de cada subunidade (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2 e γ3), as quais são codificadas por diferentes genes e diferentemente expressas em vários tecidos (HARDIE, 2003). Sua ativação baseia-se no envolvimento da ligação da AMP à subunidade γ, o que induz uma mudança conformacional no complexo AMPK, que alostericamente ativa a subunidade α catalítica, pelo aumento da fosforilação do resíduo Treonina 172 (Thr ^{172}), promovido por uma quinase reguladora da AMPK (AMPKK) (HAWLEY et al., 1996; HARDIE, 2003).

A AMPK é um sensor da energia intracelular e regula o metabolismo de glicose e lipídeos (HARDIE, 2011). Essa proteína é ativada por aumento intracelular da razão AMP/ATP (adenosina monofosfato/adenosina trifosfato) em resposta ao estresse metabólico, levando à inibição de vias anabólicas que consomem ATP – como o da síntese proteica, de colesterol e de triglicerídeos –, e à estimulação de vias catabólicas que produzem ATP, como, por exemplo, oxidação de ácidos graxos e captação de glicose e glicólise (HARDIE, 2011). No sistema vascular, a AMPK é essencial para a manutenção da função e estrutura vascular, podendo proteger contra os danos acometidos pela obesidade e por doenças cardiovasculares (ALMABROUK et al., 2018, NAGATA e HIRATA, 2010; EWART e KENNDY, 2011).

Além de seu papel regulatório no metabolismo, a AMPK inibe a resposta inflamatória. Nos adipócitos, a AMPK reduz a secreção de IL-6, IL-8 e MCP-1 (LIHN et al., 2008, MORITA et al., 2018). Camundongos obesos deficientes de AMPKβ1 apresentam aumento das adipocinas pró-inflamatórias TNF-α, MCP-1 e leptina no sangue periférico e aumento de TNF-α e IL-1β no tecido adiposo periepididimal (GALIC et al., 2011). Nos macrófagos, a AMPK reduz a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 (YANG et al., 2010),

aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (SAG et al., 2008, GALIC et al., 2011) e promove polarização para o fenótipo anti-inflamatório M2 (SAG et al., 2008). A expressão proteica da AMPK foi reduzida em macrófagos e células T isolados do baço em um modelo de encefalomielite autoimune; a indução desse modelo em camundongos com deleção da AMPKα1 promoveu uma doença mais severa, aumentada produção de citocinas pró-inflamatórias em células do baço e maior infiltração dessas células no sistema nervoso central (NATH et al., 2009). Ainda, a ativação da AMPK com AICAR ou metformina impediu a mobilização de monócitos da medula óssea para a circulação e reduziu o número de leucócitos no baço, resultando em reduzida infiltração de macrófagos na placa aterosclerótica de camundongos com deleção de ApoE alimentados com dieta ocidental (WANG et al., 2017).

A mobilização de células imunológicas para a circulação responde ativamente aos estímulos inflamatórios e imunológicos (TROTTIER et al., 2012). O baço é o maior órgão linfoide secundário e importante origem das células imunológicas recrutadas por estímulos inflamatórios; o mesmo é envolvido por uma cápsula elástica e fibrosa com trabéculas emergentes voltadas para o parênquima interno, garantindo a estabilidade e a manutenção de uma estrutura bem organizada (TARANTINO et al., 2011, CEST, 2006). As arteríolas centrais partem do ramo da artéria esplênica nas trabéculas para posteriormente mergulhar na área de polpa branca, que é constituída bainha perivascular de linfócitos T, circundada por folículo de linfócito B e uma zona marginal, que faz interface com a polpa vermelha, constituída por linfócitos B e macrófagos. Neste ponto, o sangue flui através da zona marginal que circunda a polpa branca em direção à área da polpa vermelha, onde o sangue é direcionado para os seios venosos (Figura 1); então o sangue flui novamente através da trabécula e é transportado para a veia esplênica. A polpa vermelha esplênica supervisiona o processo de filtração do sangue, no qual macrófagos residentes fagocitam eritrócitos antigos, ativam a resposta à infiltração bacteriana e permitem a reciclagem de ferro (TARANTINO et al., 2011).

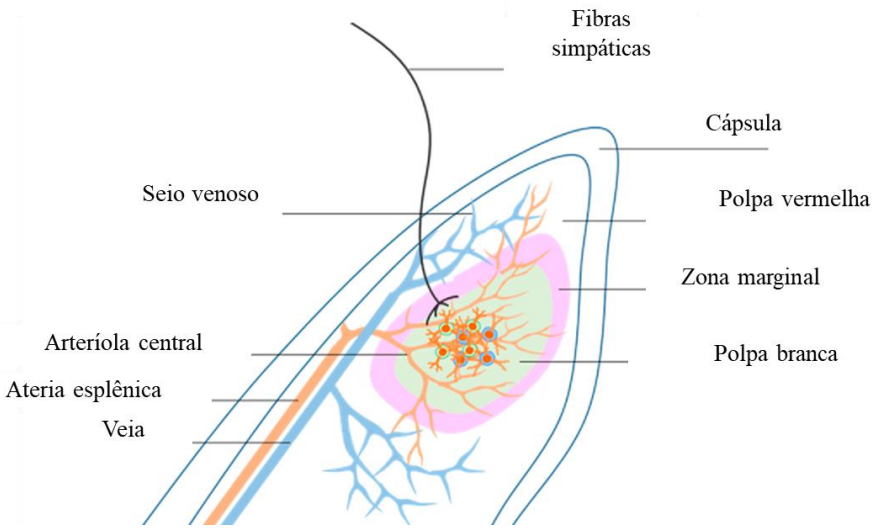

Figura 1: Descrição esquemática da organização arquitetônica de áreas esplênicas contendo várias células imunológicas: Polpa Branca (PB) e Polpa Vermelha (PV) com fibras nervosas simpáticas que inervam as Zonas Marginais (MZ) (modificado a partir: TARANTINO et al., 2011).

Inúmeros estudos mostram uma relação entre o sistema imunológico e doenças cardiovasculares, e o baço pode ter uma participação importante. Swirski *et al*. (2009) demonstraram que monócitos não diferenciados residem no baço em número maior do que na medula óssea. Em resposta à injúria isquêmica no miocárdio, ocorre mobilização em massa dos monócitos do baço, que se acumulam na área isquêmica para auxiliar no processo de reparação (SWIRSKI et al., 2009). O estímulo hipertensivo (infusão de angiotneisna II por 28 dias) promove descarga simpática no baço e mobilização das células T para os vasos sanguíneos e rins, que representam locais alvos para os danos da elevação da pressão arterial (CARNEVALE et al., 2016).

O baço também pode ter uma participação na inflamação observada na obesidade, mas o seu papel ainda não está estabelecido. No início da dieta hiperlipídica há recrutamento de células B derivadas desse órgão, produtoras de citocina anti-inflamatória IL-10, para o tecido adiposo visceral, mas com a expansão desse tecido a demanda dessas células B é superior ao recrutamento, que pode resultar em inflamação (WU et al., 2014). Por outro lado, Gotoh e colaboradores (2012, a) demonstraram que no baço de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica há menor produção de células B ($B220^+$) e, consequentemente, menor síntese de citocina anti-inflamatória IL-10. Ainda, Wang et al. (2013) demonstraram que células T

reguladoras estão em menor proporção no sangue periférico e no órgão em questão, resultando em maior concentração de citocinas pró-inflamatórias no sangue e no baço de camundongos obesos em relação ao grupo controle.

Tendo em vista que a obesidade promove infiltração de células imunológicas no tecido adiposo visceral, a origem embrionária do PVAT difere dos demais depósitos, o baço participa da mobilização de células imunológicas diante de um estímulo inflamatório e a AMPK atenua a resposta inflamatória; a hipótese do nosso trabalho consiste na concepção de que a dieta hiperlipídica por 16 semanas promoveria inflamação no PVAT do leito mesentérico, estando o baço participando desta resposta inflamatória e a sinalização via AMPK envolvida na proteção contra os impactos causados pela dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVO

Avaliar a participação do baço no perfil inflamatório do PVAT do leito mesentérico e o possível envolvimento da AMPK em camundongos obesos.

2.1. Delineamento experimental

- Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica durante 16 semanas, em camundongos com e sem baço, sobre o peso corporal, adiposidade e homeostase metabólica.

- Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica durante 16 semanas, em camundongos com e sem baço, sobre a infiltração de células imunológicas e a secreção de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias no baço, PVAT do leito mesentérico e gordura periepididimal (utilizada como controle para o fenótipo inflamatório).

- Avaliar o potencial quimiotáxico do PVAT do leito mesentérico de células do baço de camundongos alimentados com ração hiperlipídica por 16 semanas.

-Avaliar a expressão da AMPK no PVAT do leito mesentérico e no baço de camundongos obesos.

- Avaliar o envolvimento da AMPK na resposta inflamatória no baço de camundongos obesos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (nº 90, folha 3, livro 9, em 13.08.2013), que segue os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Camundongos C57BL/6J machos de 21 dias de idade foram adquiridos do Biotério de Produção de Camundongos da Faculdade de Medicina (USP) e mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno acondicionadas no Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia (ICB/USP), que mantém temperatura controlada de 22 ± 2 ºC e ciclo claro-escuro de 12 horas/12 horas, com livre acesso à água e ao alimento.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais:

1) camundongos que receberam ração padrão (Controle-Sham);

2) camundongos esplenectomizados que receberam ração padrão (Controle-SPX);

3) camundongos que receberam dieta hiperlipídica (Obeso-Sham);

4) camundongos esplenectomizados que receberam dieta hiperlipídica (Obeso-SPX).

3.1.1. Camundongos SV129 com deleção genética de AMPKα1

Camundongos SV129 com deleção genética de AMPKα1 (AMPKα1$^{-/-}$) foram utilizados para o estudo em colaboração com a Universidade de Glasgow. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade de Glasgow (licenças de projeto 60/4224 e 70/8572) e foram realizados de acordo com o *Animals (Scientific Procedure) Act* 1986 e as diretrizes do Parlamento Europeu sobre a proteção dos animais utilizados para fins científicos (Diretiva 2010/63 / EU). Os camundongos Sv129 selvagens (WT) foram comprados da *Harlan Laboratories*

(Oxon, UK) e os camundongos SV129 AMPKα1$^{-/-}$ foram gentilmente fornecidos por Benoit Viollet (Institut Cochin, Paris, França) e a geração desses animais foi descrito anteriormente (JØRGENSEN et al., 2004). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno acondicionadas no Centro de pesquisa central da Universidade de Glasgow, que mantém temperatura controlada de 22 ± 2 ºC e ciclo claro-escuro de 12 horas/12 horas, com livre acesso à água e ao alimento. Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais:

1) camundongos WT que receberam ração padrão (Controle-WT);

2) camundongos AMPKα1$^{-/-}$ que receberam ração padrão (Controle-KO);

3) camundongos WT que receberam dieta hiperlipídica (Obeso-WT);

4) camundongos AMPKα1$^{-/-}$ que receberam dieta hiperlipídica (Obeso-KO).

3.2. Esplenectomia

Camundongos com 4 semanas de idade foram anestesiados com isoflurano (indução 3% e manutenção 2%). Uma pequena incisão cutânea e muscular foi realizada no quadrante superior esquerdo do abdômen, o baço foi removido e os vasos sanguíneos cauterizados. Os camundongos não esplenectomizados (sham) passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas não tiveram o baço removido.

Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam tramadol (5 mg/kg, s.c.) durante 3 dias.

3.3. Indução da obesidade

Após a cirurgia de esplenectomia ou a falsa cirurgia, os camundongos passaram a receber ração hiperlipídica, cujo conteúdo calórico é de 5,4 kcal/g (composição: carboidrato, 26%; proteína, 15%; gordura, 59%) (PragSoluções, Brasil), conforme descrito por de SOUZA et al. (2005). A ração padrão apresenta conteúdo calórico de 3,8 kcal/g (composição: carboidrato, 70%;

proteína, 20%; gordura, 10%) (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A., Brasil). Os camundongos receberam dieta padrão ou hiperlipídica da 4ª semana à 20ª semana de idade por 16 semanas.

3.4. Caracterização da obesidade

A obesidade foi caracterizada pelo índice de Lee {[massa corporal$^{1/3}$ (g) /comprimento naso-anal (cm)] x 100}, massa relativa (mg/g massa corpórea) das gorduras (periepididimal e retroperitoneal) e magra (músculo gastrocnêmio). A glicose foi determinada por fitas reativas “OneTouch-Ultra” e glicosímetro “OneTouch-Lifescan” (Johnson & Johnson, EUA) em amostra de sangue obtida por punção caudal de animais acordados e em restrição total de alimentos por 4 horas. A dosagem de insulina sérica foi determinada por ELISA (SPI-Bio, França).

3.5. Obtenção do sangue e tecidos

Camundongos foram anestesiados com isoflurano (indução 3% e manutenção 2%) e amostras de sangue foram coletadas por punção do ventrículo esquerdo e transferidas para tubos contendo EDTA (BD Biosciences). Em seguida, foram removidos o baço, depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal, músculo gastrocnêmio, PVAT do leito mesentérico, fêmur e timo.

3.6. Histologia do PVAT e do baço

O PVAT, gordura periepididimal e o baço foram fixados em formalina tamponada (10%) (Sigma) por 2 e 24 horas, respectivamente. Após o período de fixação, o PVAT e o baço passaram por banhos de álcool e xilol e foram emblocados em parafina. Cortes transversais semi-seriados de 5 μm foram obtidos utilizando-se um micrótomo (Leica) e estes foram montados em lâminas de vidro tratadas com poli-lisina. Os cortes foram submetidos à bateria histológica e à coloração de hematoxilina e eosina.

Imagens foram capturadas por uma câmera acoplada em microscópio óptico (Nikon) com aumento de 100x. Com auxílio de um programa de análise de imagens (ImageJ, NIH, EUA), foram avaliados o número e a área dos adipócitos e o número de polpa branca de três campos de cinco cortes de cada animal.

3.7. Citometria de fluxo

Células imunológicas do baço, PVAT, gordura periepididimal, sangue total, medula óssea e timo foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando-se o aparelho FacsCalibur (BD). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio de software FlowJo, v.10 (TREE STAR, Inc.- USA).

3.7.1. Anticorpos

Os anticorpos utilizados para o estudo foram: anti-rato CD3 (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), B220 (RA3-6B2), F4/80 (BM8), Mac-1 ou CD11b (myM1/70), Gr-1 (RB6-8C5), CD45 (30-F11), CD206 (19.2), CD11c(HL3), $AMPK^{Thr172}$ (D79.5E) e Goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 (ab150077) conjugados com aloficocianina (APC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-ciano 7 (PE-Cy7), isotiocianato de fluorocianina (FITC) e adquiridos da Pharmingen Becton Dickinson™ (EUA). Estes anticorpos foram escolhidos de acordo com LEON et al. (2011), NOGUEIRA-PEDRO et al*.* (2011) e SKIBA et al., (2016).

3.7.2. Extração de células

3.7.2.1. PVAT e gordura periepididimal

O PVAT foi isolado da artéria mesentérica e a gordura periepididimal foram obtidas de camundongos anestesiados com isoflurano (indução 3% e manutenção 2%). Os tecidos foram levemente triturados com tesoura sem ponta e digeridos usando colagenase do tipo XI (125 $U \cdot cm^{-3}$), colagenase tipo IS (450 $U \cdot cm^{-3}$) e hialuronidase IV-S (60 $U \cdot cm^{-3}$) em solução de HBSS com cálcio e magnésio (GIBCO), por 20 min a 37 ° C, sob agitação de 600rpm. Em

seguida, as amostras foram filtradas em filtro de 70µm (Corning, EUA) e adicionado 25 ml de PBS, centrifugadas por 8 minutos a 400g, foi removido o sobrenadante por inversão e o pellet contendo leucócitos, células endoteliais, pre-adipócitos entre outras células, foi ressuspendido com PBS contendo 1% de Soro Fetal Bovino (FBS), o processo foi repedido 2 vezes. Por último, as células foram ressuspendidas em 500µl de PBS contendo 1% de FBS e destinadas a marcação e análise por citometria de fluxo como descrito no item 3.7.3.

3.7.2.2. Baço e timo

O baço e timo foram passados através de uma peneira com 3 mL de PBS para dispersar as células. As células foram, então, centrifugadas a 1500 g por 6 minutos e o sobrenadante descartado. A lise das hemácias foi realizada por incubação das células com uma solução hipotônica de cloreto de sódio (0,2%), seguida de incubação com uma solução hipertônica de cloreto de sódio (1,6%), geladas, por 30 segundos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 g por 6 minutos e o sobrenadante descartado. O processo foi repetido de três a cinco vezes.

3.7.2.3. Sangue periférico

Amostra de sangue foi incubada com 1,5 mL da solução FACS Lysing (BD) por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 g por 6 minutos e o sobrenadante foi descartado. O processo foi repetido 5 vezes.

3.7.2.4. Medula óssea

A extração da medula óssea foi realizada através da perfusão de 1 mL de PBS nos orifícios distal e proximal dos fêmures com ajuda de seringa e agulha de 0,80 x 25 mm. Em seguida, a suspensão celular foi diluída em Azul de Tripan (0,1%) e as células foram quantificadas em câmara de Neubauer.

3.7.3. Imunofenotipagem

Para a determinação das populações de células imunológicas foram separadas e utilizadas em torno de 10^5 células. As células foram incubadas com 0,1 µg/mL de cada anticorpo, durante 20 minutos. Após as marcações com os anticorpos (Tabela 2), as células foram ressuspendidas em PBS para análise no citômetro de fluxo, com detecção dos fluoróforos nos seguintes canais: FITC (FL1), PE (FL2), PE/Cy7 (FL3) e APC (FL4). Para $pAMPK^{Thr172}$, as células foram fixadas com paraformoldeído 2% durante 20 minutos, lavadas com glicina 0,1 M e permeabilizadas com Triton X-100 0,001% durante 15 minutos, para marcação da $pAMPK^{Thr172}$. Após lavagem com PBS, as células foram marcadas com os anticorpos primários contra a proteína descrita. O anticorpo foi diluído na proporção de 1:200 e adicionados no tubo e revelados com o anticorpo secundário Goat anti-rabbit conjugado com Alexa Fluor 488 (4 µg/mL) segundo a origem do anticorpo primário, sendo incubados por 40 minutos. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS + albumina 1% + Azida 0,05%. Em todas as amostras foram colocados CD45-FTIC. A quantificação das moléculas foi realizada nas populações do PVAT do leito mesentérico e do baço total. A autofluorescência e a marcação inespecífica vão ser descontadas de uma amostra marcada com todos os anticorpos secundários na ausência dos marcadores primários. A aquisição dos dados no citômetro de fluxo (com prévia compensação das emissões capturadas pelos detectores) consistiu entre 50.000 eventos totais capturados. As células imunológicas foram marcadas com os anticorpos descritos na Tabela 2 para reconhecer populações específicas.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados na citometria de fluxo

População	Marcador	Fenótipo
Leucócitos totais	CD45-FITC	$CD45^+$
Subtipos de linfócitos T	CD3-PE, CD4-FITC, CD8-Cy7/PE	$CD3^+CD4^+$ $CD3^+CD8^+$
Linfócitos B	CD3-APC, B220-PE	$CD3^-B220^+$
Células mielóides maduras	F4/80-FITC, CD11b-PE/Cy7, Gr-1-PE	Macrófagos/monócitos ($CD11b^+F4/80^+$) Mielocíticas ($CD11b^+Gr\text{-}1^+$)
Macrófago M1 e M2	CD206-FITC CD11c-PE	M1 ($CD11c^+$ $CD206^-$) M2 ($CD206^+$ $CD11c^-$)
AMPK ^{thr172}	$AMPK^{thr172}$Alex Fluor 488 CD45-FITC	AMPK-Alex Fluor 488^+ $CD45^+$
PE: ficoeritrina; APC: aloficocianina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; Cy: cianina.		

3.8. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias

O PVAT e gordura periepididimal foram homogeneizados como descrito para a técnica de *Western blotting* e a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-α, IFN-γ e IL-1β) foram determinadas por kits de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante (Merck-Millipore). A concentração de citocinas foi normalizada pela concentração de proteínas totais da respectiva amostra.

3.9. *Western blotting*

Amostras dos tecidos, assim que coletadas, foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C. Posteriormente, os tecidos mantidos a -80 °C foram pulverizados em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo, homogeneizados e incubados por 30 minutos com 30 µL (PVAT) ou 50 µL (baço) ou 30 µL (gordura periepididimal) de tampão de lise RIPA a 4 °C. Os extratos do PVAT e da gordura periepididimal foram, primeiramente, centrifugados a 3.500 g, a 4 °C, por 5 minutos para separação da gordura. Posteriormente, os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 g, a 4 °C, por 30 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e utilizado para a quantificação do conteúdo proteico total, utilizando-se o método BCA (ácido bicincônínico, Thermo Scientific). As amostras foram, então, tratadas com tampão de Laemmli

contendo DTT (ditiotreitol, 200 mM). Cinquenta µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS PAGE, 10%) e submetidas à eletroforese em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, EUA) a 100 V. Em cada gel foi aplicado também um marcador de peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de PVDF, utilizando-se aparelho da BioRad por 1hora e 30 minutos a 100 V.

As membranas de PVDF foram, então, incubadas com solução bloqueadora (albumina bovina, 3%) em temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos na membrana. Posteriormente, as membranas foram incubadas individualmente com os anticorpos primários anti-IL-10 (1:1000, Novus Biologicals/ JES5-2A5), anti-TNF-α (1:500, Chemicon/GF046), AMPK (1:1000, Cell Signaling, 2532) e $pAMPK^{Thr172}$ (1:1000, Cell Signaling, 41885), diluídos em solução bloqueadora (albumina bovina, 3%), por 16 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com solução TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 Mm e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos secundários IgG anti-Rat (1:2000, Abcam, para IL-10), anti-Hamster (1:2000, Immuno Research, para TNF-α) e anti-rabbit (1:5000, abcam, AB6721, para AMPK e pAMPK) conjugados com peroxidase, diluídos em solução bloqueadora (albumina bovina, 3%). O procedimento de lavagem foi repetido novamente e, então, as membranas foram incubadas com solução quimioluminescente por 5 minutos, como descrito pelo fabricante do kit (Signal West Pico Chemiluminescent, Thermo Scientific). A quimioluminescência foi detectada em um fotodocumentador (Gel Logic) e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização do programa ImageJ (NIH, EUA). A densidade óptica foi normalizada pela densidade óptica das bandas da respectiva amostra coradas com Ponceau (Romero-Calvo *et al*., 2010) e os valores expressos em unidade arbitrária (UA).

3.10. Ensaio de transmigração *in vitro*

Para avaliar a capacidade quimiotática do PVAT e da gordura periepididimal de células imunológicas presentes no baço, utilizamos o sistema de *transwell*, empregando membranas de policarbonato com 6,5 mm de diâmetro e poros de 8 µm (Millipore). Inicialmente as células do baço foram dissociadas como descrito no item 3.7.2.2. Alíquota da suspensão celular contendo 1,5 x 10^6 células foi acondicionada no compartimento superior da *transwell*, em meio R10 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Millipore). No compartimento inferior da *transwell,* foram adicionados 80~100 mg de PVAT ou da gordura periepididimal. Como controle da técnica, em uma *transwell*, apenas 0,2 mL de meio R10 foram adicionados no compartimento inferior e, em outra *transwell*, amostra de PVAT foi acondicionada no compartimento inferior, mas células do baço não foram acondicionadas no compartimento superior. As placas foram incubadas por 1 hora (atmosfera úmida, 37 °C, 5% de CO_2) e, após este período, foi coletado o sobrenadante da parte inferior da *transwell* e as células migradas foram contatas em câmara de Neubauer. O ensaio foi realizado em duplicata e o número de células foi normalizada pela massa do PVAT ou da gordura periepididimal adicionado no compartimento inferior da *transwell*.

3.11. Determinação da expressão de RNAm por PCR em tempo real

As expressões de RNAm para adiponectina, INF-γ, t-BET e IL-10, foram realizadas por PCR em tempo real (PCR-RT) em PVAT do leito mesentérico, gordura periepididimal e baço de camundongos controles e obesos. O PVAT foi dissecado de artérias obtidas de camundongos anestesiados com isoflurano (indução 3% e manutenção 2%) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o processamento.

O RNA total foi obtido para o PVAT e gordura periepididimal utilizando-se o método de kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Para o baço foi utilizado o método de Trizol (Invitrogen, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A integridade do RNA foi observada pela presença das bandas 18S e 28S em gel de agarose 1%. Após esse procedimento, 1 µg (para o baço) e 3 µg (para

PVAT e gordura periepeididimal) do RNA total de cada amostra foram utilizados para obtenção da fita de cDNA utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). PCR em tempo real foi realizado em um volume final de 12 µL contendo oligonucleotídeos específicos (Tabela 3), que foram construídos a partir de informações retiradas do GENEBANK (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando-se o sistema QuantStudio™ Real-Time PCR Software ou SDS Software. A expressão de RNAm foi quantificada utilizando-se o cálculo do $2^{\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001). A normalização dos resultados foi realizada pelo RNAm da GAPDH (controle interno padronizado). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias normalizadas pela expressão de RNAm de GAPDH.

Tabela 3 - Especificação dos oligonucleotídeos

Gene	Sense	Anti-sense
Adiponectina	TTGCAAGCTCTCCTGTTCCT	ATCCAACCTGCACAAGTTCC
INF-γ	GCGTCATTGAATCACACCTG	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
t-BET	CGCTCACTGCTCGGAACTCT	TCCTGTCTCCAGCCGTTTCT
IL-10	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

INF-γ- interferon γ; t-Bet- fator de transcrição para diferenciação do perfil Th1; IL-10- interleucina 10; GAPDH- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

3.12. Imunofluorescência do baço

Baços obtidos dos camundongos SV129 WT e AMPKα1$^{-/-}$ foram fixados com paraformaldeído (10%) durante 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para solução de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) contendo sacarose (30%), para crioproteção, por um período de 48 horas. As amostras foram emblocadas em gel de congelamento e cortes de 4 µm foram obtidos. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro e foram lavados com tampão fosfato 0,1%. Em seguida, os cortes foram incubados, a 4 °C, durante a noite com solução contendo anticorpo monoclonal contra CD3 (Cell Signaling,

1:200). Após período de incubação, os cortes foram lavados com tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), triton X-100 (0,3%) e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpo secundário Goat anti-rabbit Alex Fluor 488 (ab150077, 1:500). Em seguida, foi adicionado 10ul de DAPI (SIGMA) marcador de núcleo. Foram usados cortes sem o anticorpo primário como controle negativo. As imagens foram obtidas usando o miscroscópio de fluorescência (Axio Observer Z.1, Zeiss, Germany) com o software ZEN (Zeiss, Germany) e foram analisadas utilizando um programa de análise de imagens (ImageJ, NIH, EUA).

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (epm). Teste *t-Student* não pareado ou análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer, foram utilizados quando necessários. O nível de significância mínima aceitável foi $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo experimental

4.1.1. Evolução ponderal e consumo de água, ração e calorias

A dieta hiperlipídica induziu maior ganho de massa corpórea nos camundongos C57BL/6 em comparação com o grupo alimentado com ração padrão. Não houve diferença do ganho de massa corpórea entre os grupos controle-SHAM e controle-SPX e entre os grupos obeso-sham e obeso-SPX (Figura 2A). O consumo de ração foi semelhante entre os grupos controle-SPX e controle-SHAM, entretanto, os camundongos obesos induzidos pela dieta hiperlipídica (OB-SHAM) apresentaram redução no consumo de ração e a esplenectomia (OB-SPX) não alterou esse parâmetro (Figura 2B). Apesar da diferença na quantidade de ração ingerida, o consumo de calorias diárias foi semelhante entre todos os grupos experimentais (Figura 2C). A esplenectomia (controle-SPX) não alterou o consumo de água quando comparado com o controle-SHAM, entretanto a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (OB-SHAM) reduziu esse consumo que não sofreu alteração na ausência do baço (obeso-SPX) (Figura 2D).

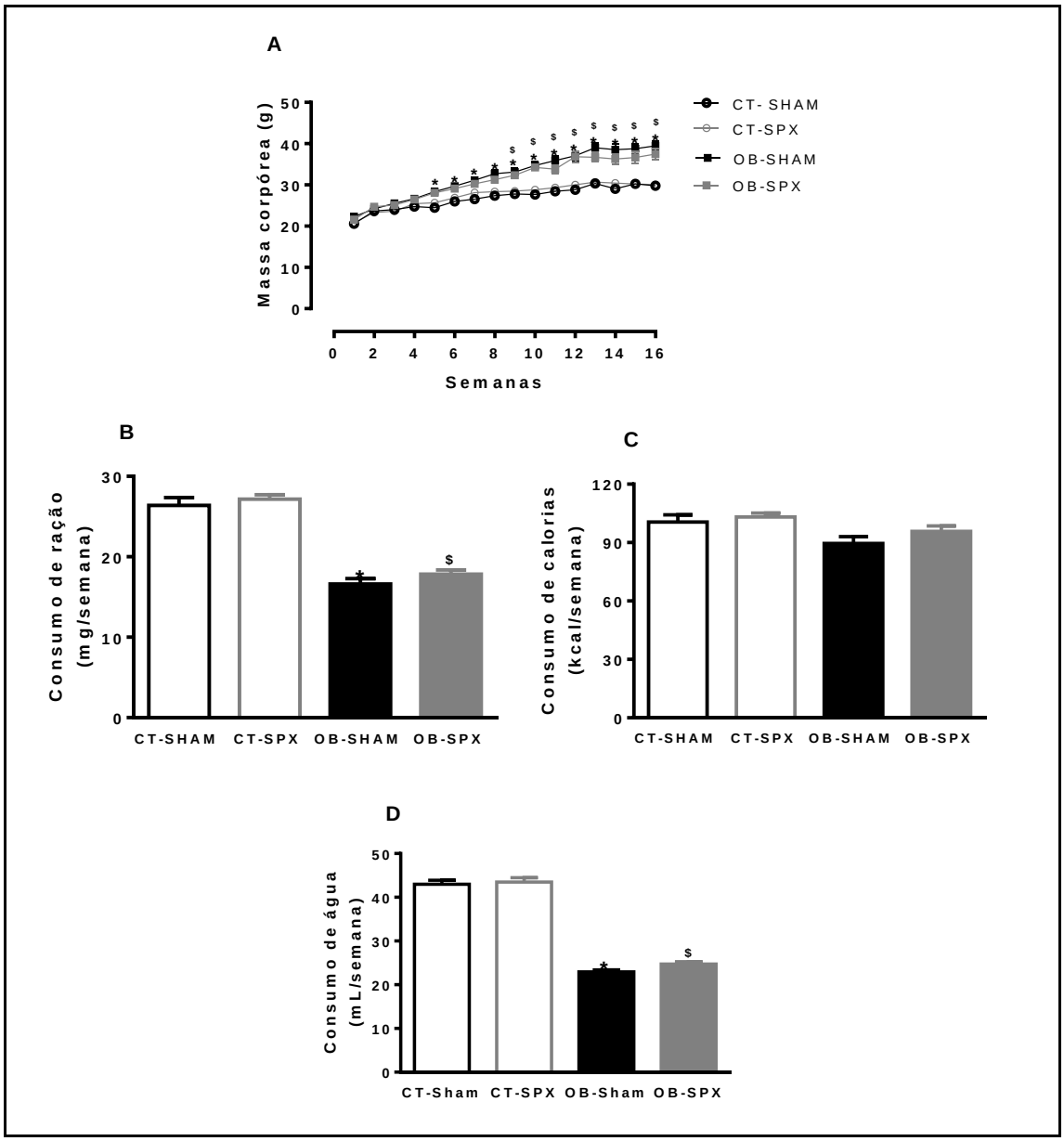

Figura 2 - Ganho de massa corpórea ao longo de 16 semanas. (A) e consumo médio por semana de ração (B), calorias (C) e água (D) de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenectomizados (SPX), que receberam ração padrão (controle – CT) ou ração hiperlipídica (obeso, OB). No gráfico A: cada ponto representa a média do ganho de massa corpórea ± EPM; * $P < 0,05$, CT-SHAM versus OB-SHAM, e $^{\$}$ $P < 0,05$, CT-SPX versus OB-SPX (ANOVA-duas vias); n = 15-17 animais/grupo. Nos gráficos B, C e D: as barras representam média do consumo médio/animal/semana ± EPM; * $P < 0,05$ versus CT-SHAM e $^{\$}$ $P < 0,05$ versus CT-SPX (ANOVA-duas vias); n = 8 caixas/grupo.

4.1.2. Índice de Lee, massa dos depósitos de gordura e massa magra

A dieta hiperlipídica (OB-SHAM) aumentou o índice de Lee (Figura 3A) e a massa das gorduras periepididimal (Figura 3B) e retroperitonial (Figura 3C) em relação ao grupo CT-SHAM, sendo que a remoção do baço não alterou nenhum desses parâmetros nos grupos CT e OB. O peso do músculo gastrocnêmio foi semelhante entre os grupos experimentais (Figura 3D).

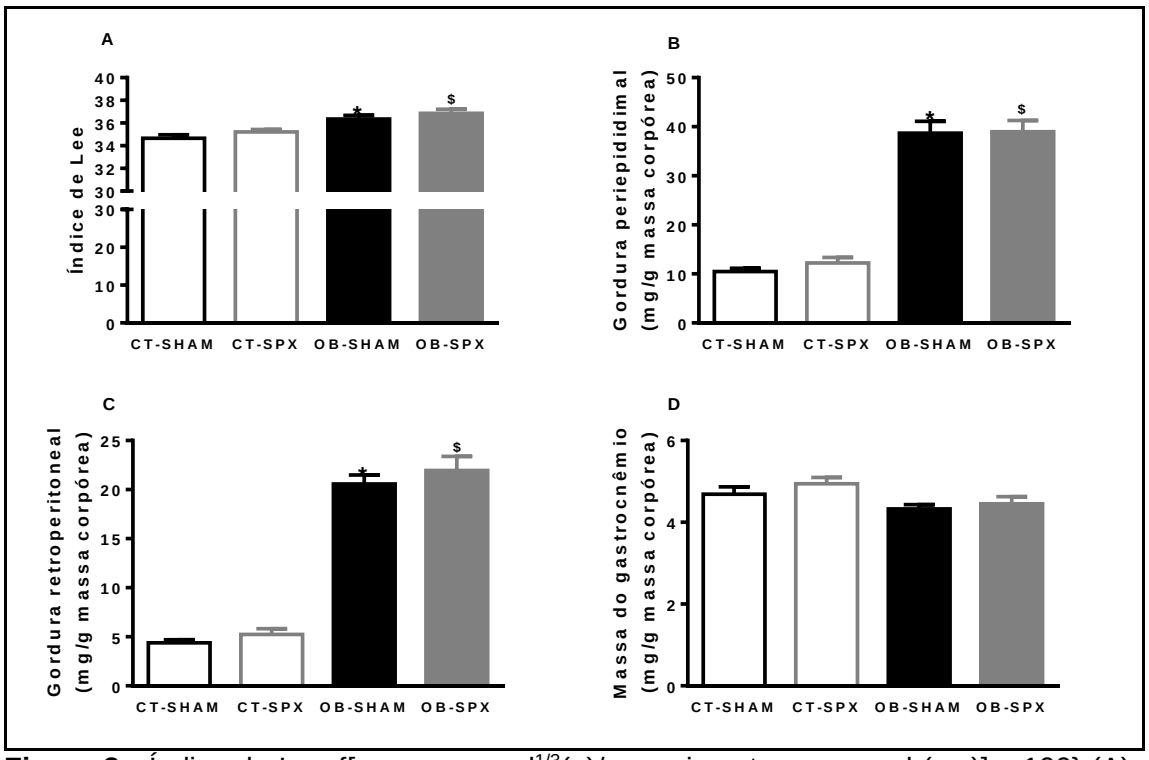

Figura 3 - Índice de Lee {[peso corporal$^{1/3}$(g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100} (A), massa relativa dos depósitos de gorduras: (B) periepididimal e (C) retroperitoneal e (D) do músculo gastrocnêmio de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenectomizados (SPX), que receberam ração padrão (controle, CT) ou ração hiperlipídica (obeso, OB) durante 16 semanas. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM; $^{\$}$ $P < 0,05$ versus CT-SPX. n = 31/34 animais/grupo.

4.1.3 Glicemia e insulinemia

A dieta hiperlipídica promoveu aumento da concentração sérica de glicose em camundongos sham em relação aos camundongos controles SHAM (Figura 4A). A esplenectomia não modificou a glicemia em camundongos controles, mas reduziu a glicemia em camundongos alimentados com ração hiperlipídica (Figura 4A).

Camundongos do grupo obeso-SHAM apresentaram aumento na concentração sérica de insulina quando comparados com camundongos do grupo controle-SHAM. A esplenectomia não modificou a concentração sérica de insulina em camundongos controles. Entretanto, a concentração sérica de insulina foi aumentada no grupo obeso-SPX em relação ao grupo obeso-SHAM (Figura 4B).

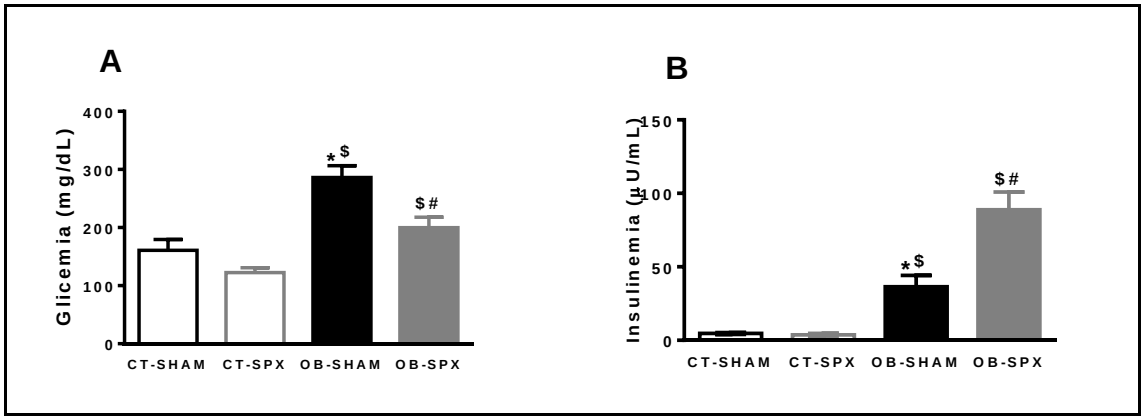

Figura 4 – Dosagem sérica de glicose e insulina. Glicemia (A) e insulinemia (B) de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenectomizados (SPX), que receberam ração padrão (controle, CT) ou ração hiperlipídica (obeso, OB) durante 16 semanas. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM; $^{\$}$ $P < 0,05$ versus CT-SPX; $^{\#}$ $P < 0,05$ versus OB-SHAM. N = 8-11 animais/grupo.

4.2 Efeitos da dieta hiperlipídica no baço

4.2.1. Morfologia

Camundongos obesos apresentaram aumento no número de polpa branca em relação aos camundongos do grupo controle (Figura 5). O peso (Figura 5D) e o comprimento (Figura 5E) do baço de camundongos obesos foi reduzido em relação aos os camundongos controles.

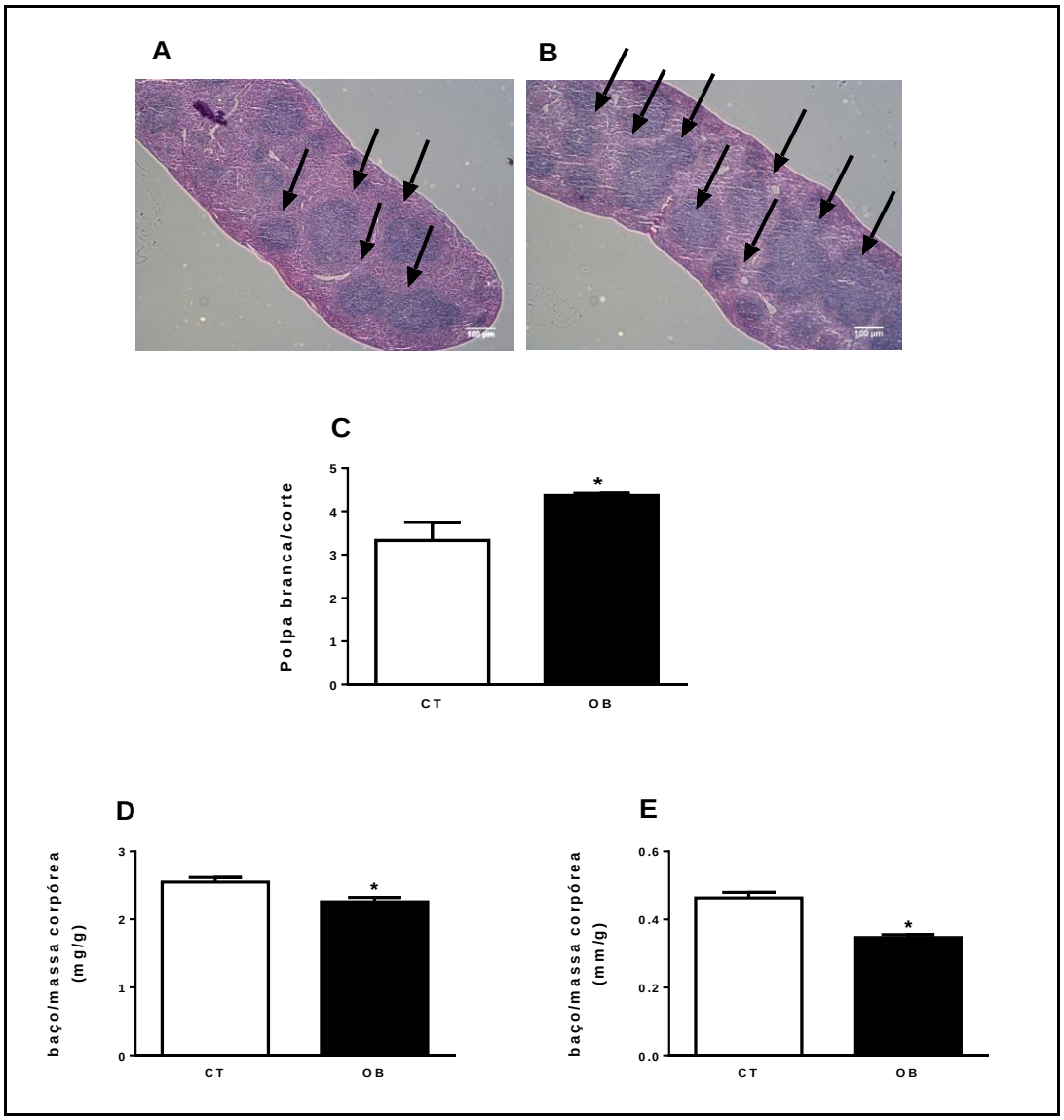

Figura 5 – Análise morfológica do baço. Imagens representativas de cortes histológicos de baço corados com hematoxilina e eosina de camundongos que receberam ração padrão (controle, CT; A) ou ração hiperlipídica (obeso, OB; B). As setas indicam polpas brancas. Quantificação do número de polpa branca (C). Peso (D) e comprimento (E) do baço. As barras representam média ± EPM. Teste *t-Student*: * $P < 0,05$ versus CT. n =5 animais/grupo.

4.2.2. Imunofenotipagem das células imunológicas

O número de células imunológicas no baço dos camundongos obesos foi reduzido em comparação ao de camundongos do grupo controle (Figura 6A). A população de linfócitos T $CD4^+$ (Figura 6B), linfócitos T $CD8^+$ (Figura 6C), linfócitos B (B220+) (Figura 6D) e macrófagos residentes ($CD11b^+F4/80^+$) (Figura 6E) foi semelhante entre os grupos experimentais. Porém, a população de células mielocíticas ($CD11b^+Gr\text{-}1^+$) foi reduzida no baço de camundongos obesos (Figura 6F).

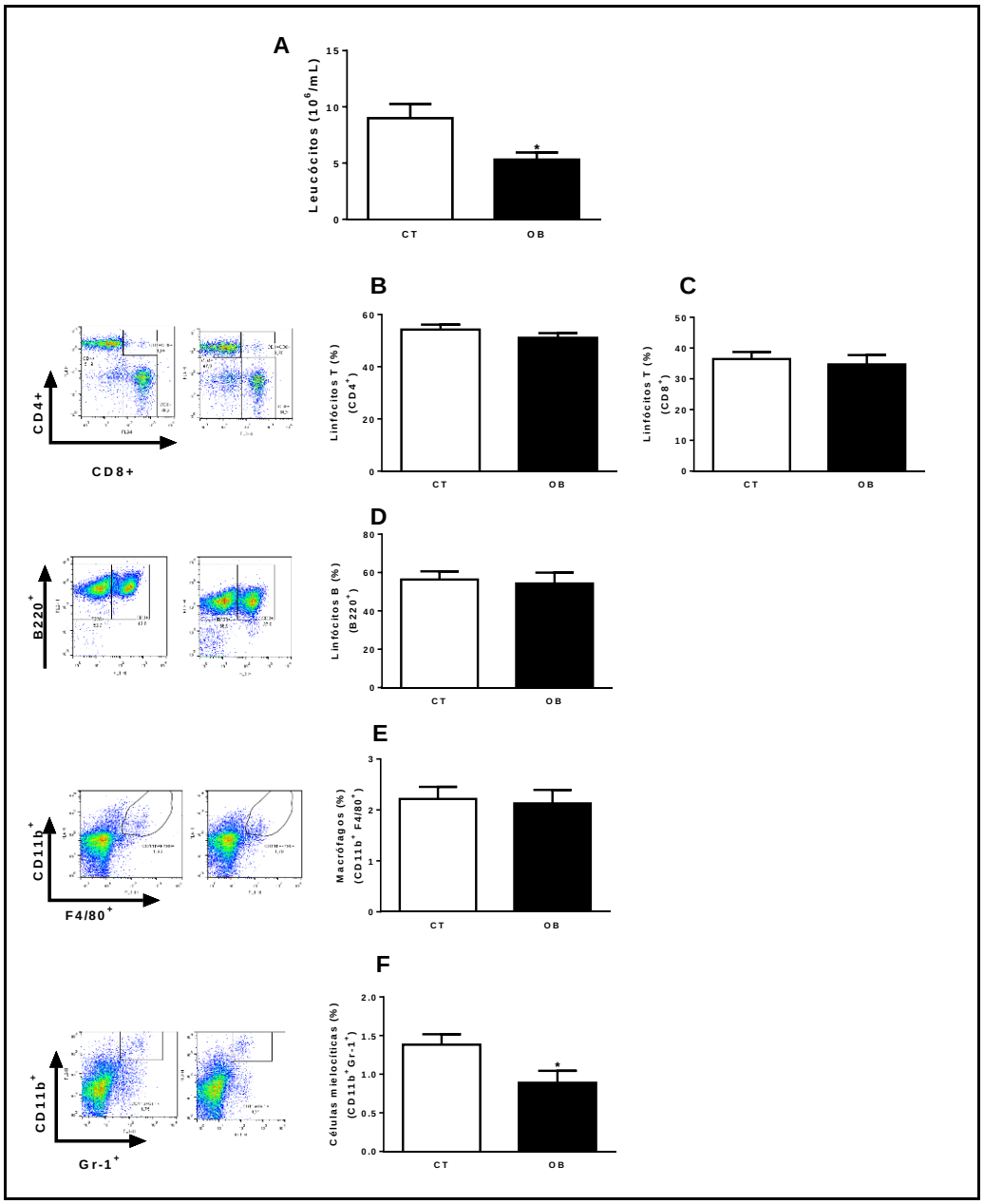

Figura 6 - Imunofenotipagem de células isoladas do baço. Camundongos que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. Número de células totais (A), porcentagem de células das populações: (B) $CD4^+$ (subtipo de linfócito T), (C) $CD8^+$ (subtipo de linfócito T), (D) $B220^+$ (linfócitos B), (E) $Mac\text{-}1^+F4/80^+$ (macrófago/monócito), (F) $Mac\text{-}1^+Gr\text{-}1^+$ (células mielocíticas). As barras representam média ± EPM. Teste *t-Student*: * $P < 0{,}05$ versus CT. n= 10-13 animais/grupo.

4.2.3. Avaliação do conteúdo de citocinas

No grupo obeso, o conteúdo de TNF-α (Figura 7A e B) apresentou-se aumentado e de IL-10 (Figura 7A e C) diminuído quando comparados com o do grupo controle.

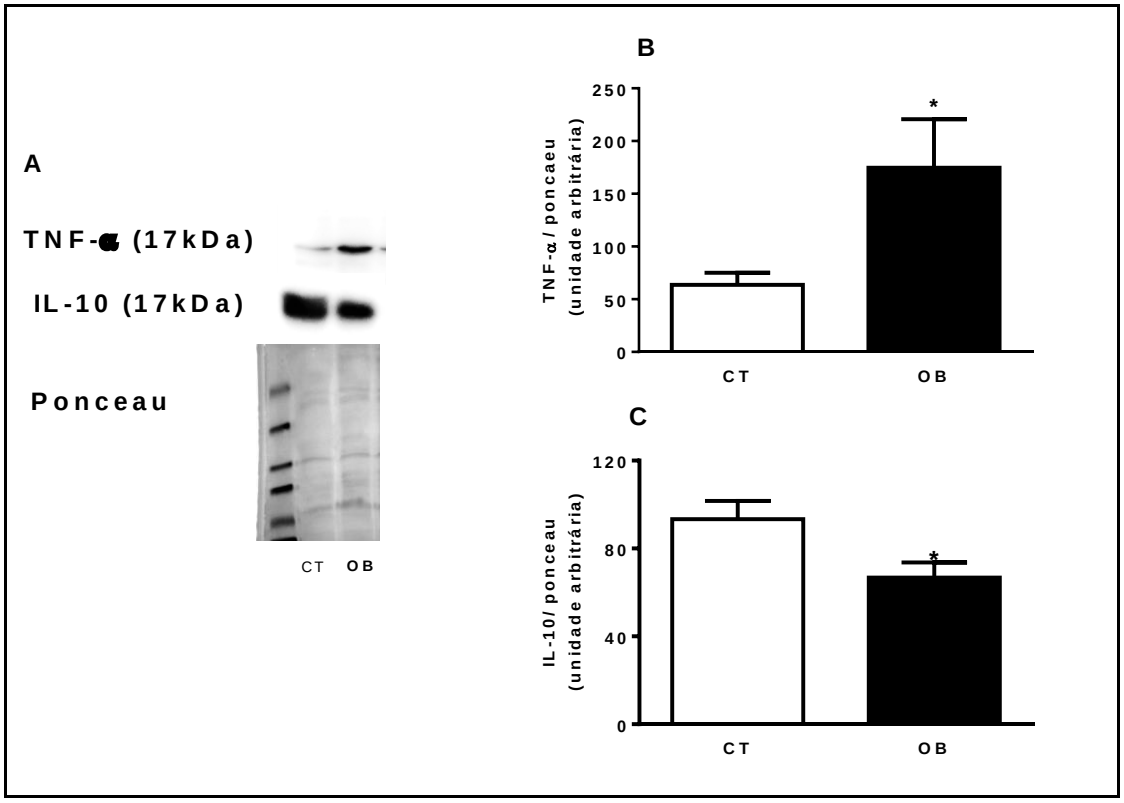

Figura 7- Avaliação do perfil inflamatório. Conteúdo das citocinas TNF-α e IL-10 no baço de camundongos que foram alimentados com ração padrão (controle, CT) ou ração hiperlipídica (obeso, OB) durante 16 semanas. Imagens representativas dos *imunoblottings* e da respectiva membrana corada com Ponceau (A). Densidade óptica referente às bandas de TNF-α (B) e IL-10 (C) normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau. As barras representam média ± EPM. Teste *t-Student*: * $P < 0,05$ versus CT. n= 4-7 animais/grupo.

4.3. Efeitos da dieta hiperlipídica e da esplenectomia no PVAT do leito mesentérico

4.3.1. Morfologia

A massa total do PVAT foi aumentada no grupo obeso-SHAM em comparação com ambos os grupos controles e a esplenectomia (obeso-SPX) não alterou esse parâmetro (Figura 8E). Avaliando a hipertrofia dos adipócitos, os grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM apresentaram área do adipócito semelhante, entretanto a esplencetomia no grupo obeso (obeso-SPX) aumentou esse parâmetro (Figura 8F).

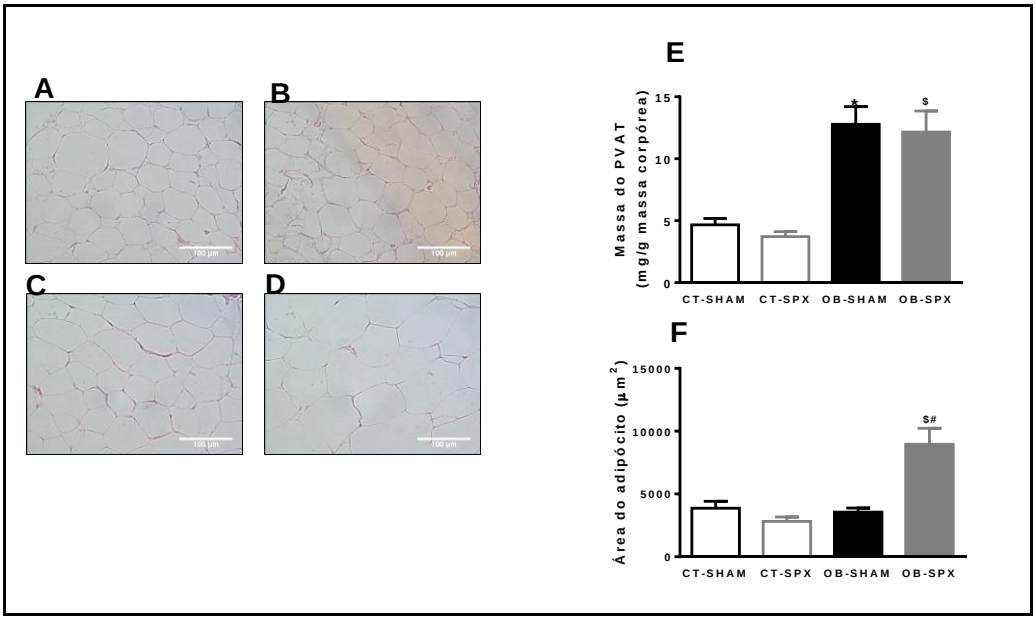

Figura 8- Análise morfológica do PVAT do leito mesentérico. Imagens representativas de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina do tecido adiposo perivascular (PVAT) de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenectomizados (SPX), que receberam ração padrão (controle, CT) ou ração hiperlipídica (obeso, OB). A: CT-SHAM. B: CT-SPX; C: OB-SHAM; D: OB-SPX. Massa relativa (E) e área (F) do PVAT do leito mesentérico. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM; $^{\$}$ $P < 0,05$ versus CT-SPX; $^{\#}$ $P < 0,05$ versus OB-SHAM. n= 5-10 animais/grupo.

4.3.2. Imunofenotipagem das células imunológicas

A população de leucócitos totais ($CD45^+$) foi semelhante nos camundongos do grupo controle-SHAM e controle-SPX, o mesmo foi observado nos camundongos obeso-SHAM. Contudo, camundongos do grupo obeso-SPX apresentaram um aumento na população de leucócitos, marcados com $CD45^+$, com relação aos demais grupos (Figura 9A).

A população de linfócitos T ($CD4^+$) no PVAT foi semelhante entre os grupos estudados (Figura 9B). Os linfócitos T ($CD8^+$) foram semelhantes entre os grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM, mas foram reduzidos em camundongos do grupo obeso-SPX (Figura 9C). Os linfócitos B ($B220^+$) no PVAT de camundongos do controle-SPX foram reduzidos em comparação aos do grupo controle-SHAM. Camundongos do grupo obeso-SHAM também apresentaram uma redução na população de linfócitos B ($B220^+$) com relação aos grupos controles. O grupo obeso-SPX não apresentou diferença em comparação aos grupos estudados (Figura 9D). Os macrófagos/monócitos ($CD11b^+F4/80^+$) foram semelhantes nos grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM, porém foram aumentados no grupo obeso-SPX (Figura 9E).

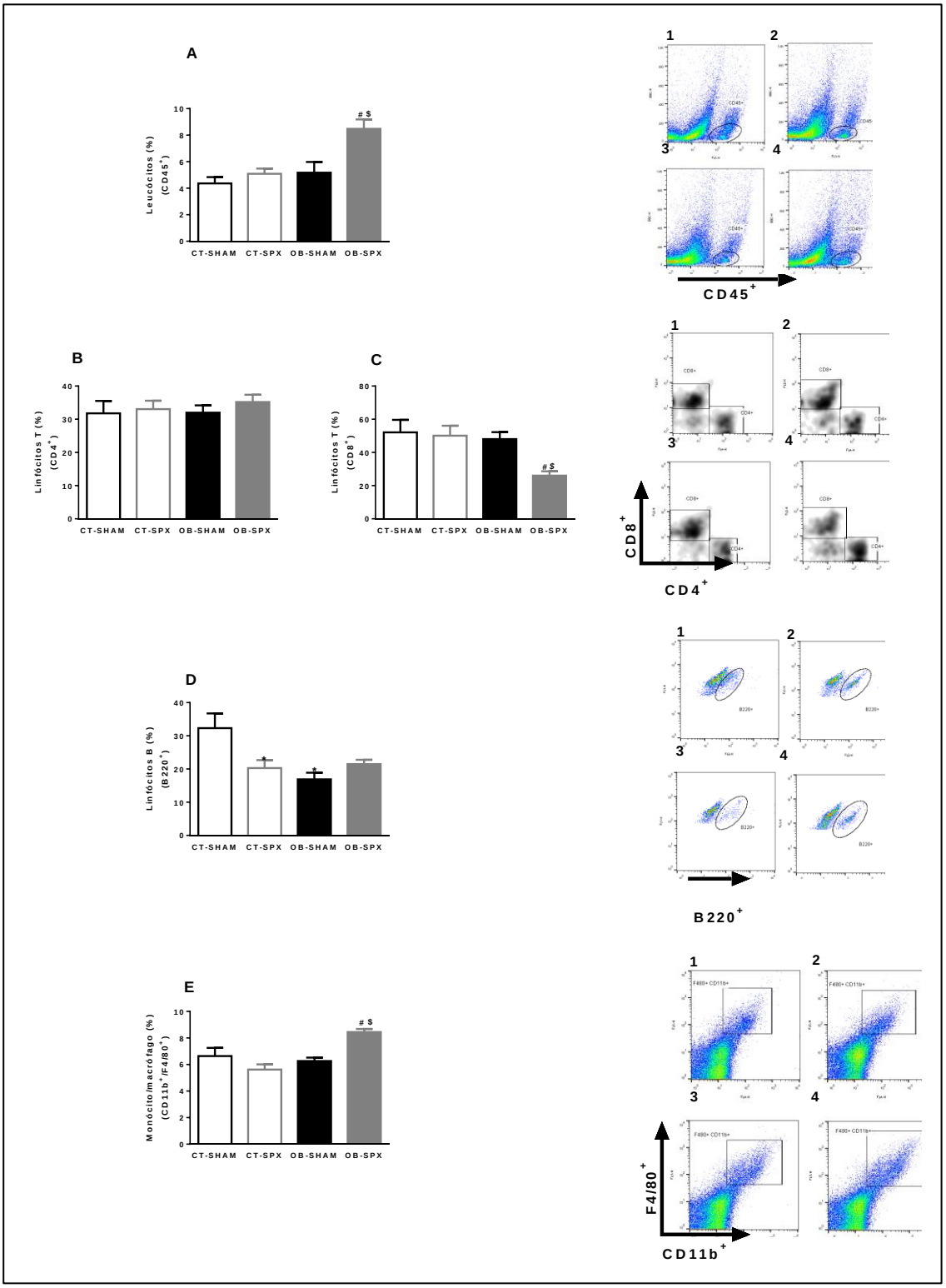

Figura 9 - Imunofenotipagem de células do PVAT do leito mesentérico. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. Dot plot representativos: (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX. Porcentagem de células das populações: (A) $CD45^+$ (leucócitos totais), (B) $CD4^+$ (subtipo de linfócito T), (C) $CD8^+$ (subtipo de linfócito T), (D) $B220^+$ (linfócitos B), (E) $CD11b^+F4/80^+$ (macrófagos originados do sangue periférico). As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM, $^{\#}$ $P < 0,05$ versus OB-SHAM, $^{\$}P < 0,05$ versus CT-SPX. n= 10-13 animais/grupo.

As subpopulações de macrófagos M2 (F4/80^{+}/CD206^{+}) (Figura 10A) e M1 (F4/80^{+}/CD11c^{+}) (Figura 10B e C) foram semelhantes nos grupos controle-SHAM e controle-SPX. Macrófagos M2 (F4/80^{+}/CD206^{+}), mas não macrófagos M1 (F4/80^{+}/CD11c^{+}), foram reduzidos no PVAT de camundongos do grupo obeso-SHAM em relação aos do grupo controle-SHAM (Figura 10). A subpopulação de macrófagos M2 (F4/80^{+}/CD206^{+}) foi reduzida e a de macrófagos M1 (F4/80^{+}/CD11c^{+}) foi aumentada no PVAT do grupo obeso-SPX com relação ao grupo controle-SPX (Figura 10A e B).

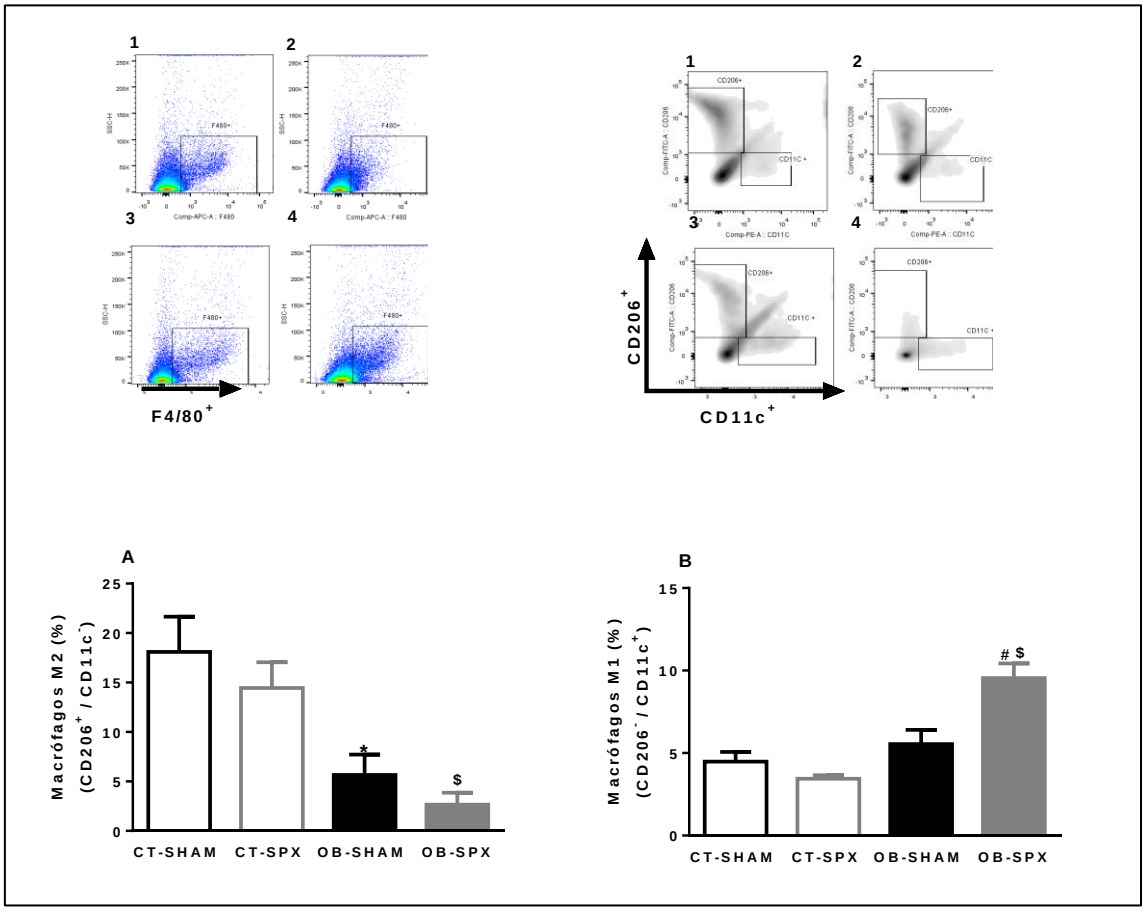

Figura 10– Avaliação da população de macrófagos M1 e M2 no PVAT do leito mesentérico. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. Dot plot representativos: (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX. Porcentagem de células das populações: (A) CD206^{+} (macrófagos com fenótipo M2- anti-inflamatório) e (B) CD11c^{+} (macrófagos com fenótipo M1-pró-inflamatório). As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: $^{\#}$ $P < 0,05$ versus Grupo-SHAM, $^{\$}P < 0,05$ versus CT-SPX. n= 5 animais/grupo.

4.3.3. Avaliação do conteúdo de citocinas

A concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 11A), TNF-α (Figura 11B) e INF-γ (Figura 11C) no PVAT foi reduzida no grupo obeso-SHAM com relação ao grupo controle-SHAM, mas a concentração da IL-1β não foi diferente entre os dois grupos (Figura 11D). O PVAT dos camundongos do grupo controle-SPX apresentou reduzida concentração das citocinas IL-6 (Figura 11A) e TNF-α (Figura 11B) em relação aos do grupo controle-SHAM, mas a concentração de INF-γ (Figura 11C) e IL-1β (Figura 11D) foi semelhante entre os dois grupos. A concentração de IL-6 (Figura 11A), TNF-α (Figura 11B), INF-γ (Figura 11C) e IL-1β (Figura 11D) foi aumentada no grupo obeso-SPX com relação aos grupos controle-SPX e obeso-SHAM.

O conteúdo da citocina anti-inflamatória IL-10 no PVAT de camundongos dos grupos obeso-SHAM e obeso-SPX foi aumentado com relação aos grupos controles e foi semelhante entre os grupos controle-SHAM e controle-SPX (Figura 11E).

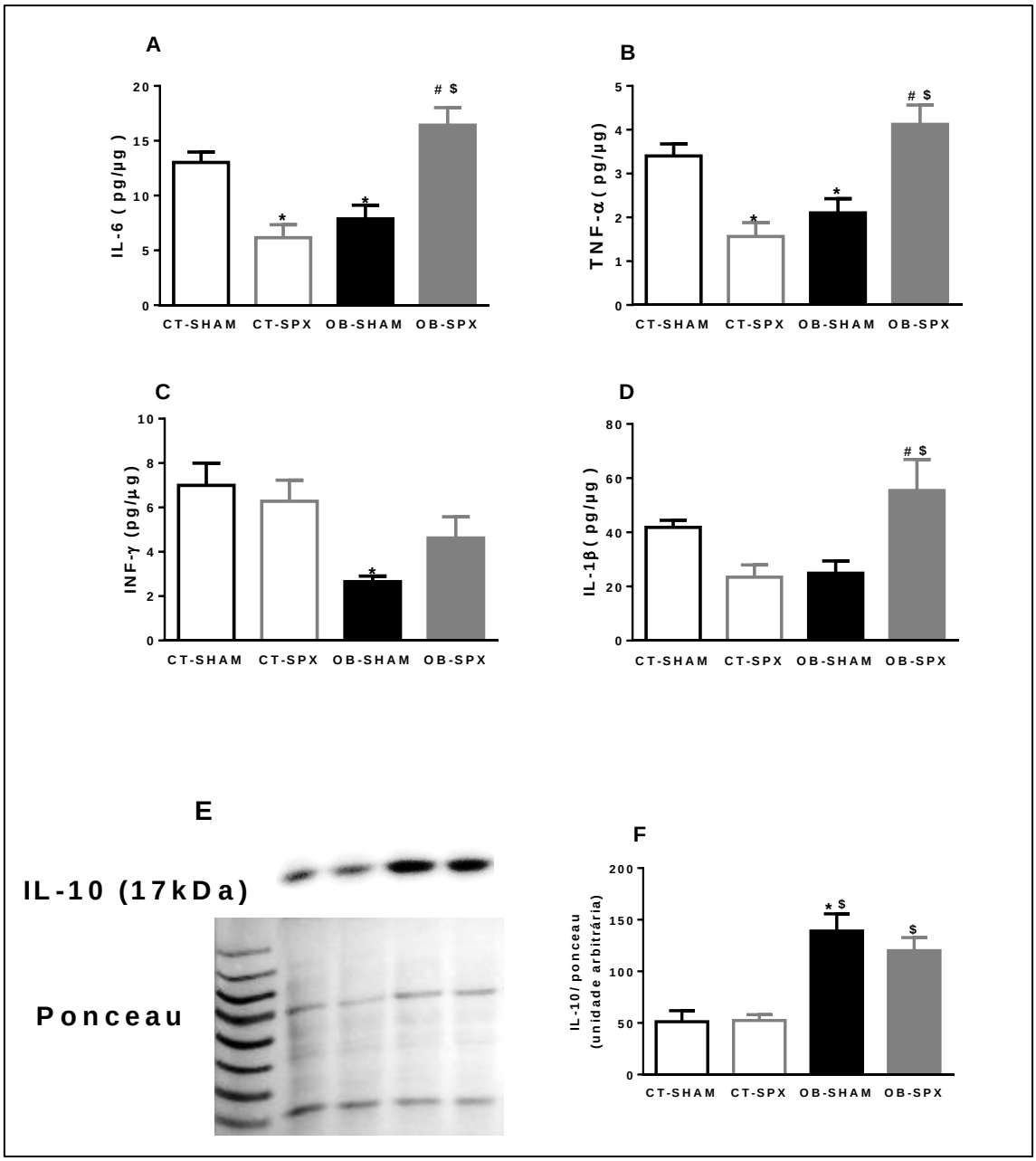

Figura 11 – Avaliação do conteúdo de citocinas no PVAT do leito mesentérico. IL-6 (A), TNF-α (B), INF-γ (C) e IL-1β (D), determinado por método de ELISA, e de IL-10 (E), determinado por *Western Blloting*, de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso). Imagens representativas do *imunoblotting* e da respectiva membrana corada com Ponceau: (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM, $^{\$}$ $P < 0,05$ versus CT-SPX, $^{\#}$ $P < 0,05$ versus OB-SHAM. n= 5-7 animais/ grupo.

4.4. Quimiotaxia induzida pelo PVAT do leito mesentérico

A obesidade provoca a infiltração de células do sistema imunológico para o tecido adiposo, gerando uma cascata inflamatória. Nesse sentindo, avaliamos a mobilização das células do baço para o PVAT utilizando sistema de *transwell*. O número de leucócitos migrados para o PVAT do grupo controle-SHAM foi maior do que o número de leucócitos migrados para o compartimento controle que continha apenas meio ou PVAT (Figura 12). A migração dos leucócitos do baço para o PVAT do grupo obeso-SHAM e do grupo obeso-SPX foi reduzida em comparação ao do grupo controle-SHAM, não sendo diferente da migração observada na *transwell* controle que continha apenas meio ou PVAT (Figura 12).

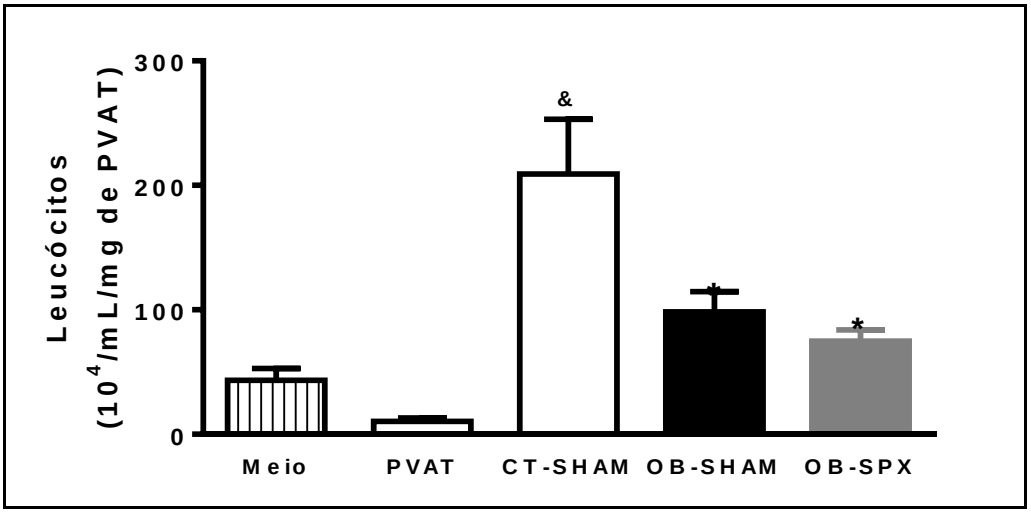

Figura 12- Migração dos leucócitos do baço para o tecido adiposo perivascular (PVAT) do leito mesentérico. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou hiperlipídica (OB-obeso), avaliada em sistema de *transwell*. Como controles da técnica, no compartimento inferior de uma transwell foi acondicionado apenas meio (Meio) e, em outra *transwell*, células do baço não foram acondicionadas no compartimento superior (PVAT). As barras representam média ± EPM de leucócitos presentes no compartimento inferior normalizados pela massa do PVAT. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM; $^{\&}$ $P < 0,05$ versus Meio ou PVAT. N = 4-5 animais/grupo.

4.5. Expressão da AMPK

4.5.1. Baço

Nós observamos que expressão da proteína AMPK total (Figura 13A e C) e fosforilada no resíduo treonina 172 (Figura 13B e C) não foram diferentes entre grupo obeso e grupo controle. Avaliamos a fosfo-AMPK nos leucócitos totais ($CD45^{+}$) do baço e não observamos diferenças na expressão entre os grupos estudados (Figura 13D).

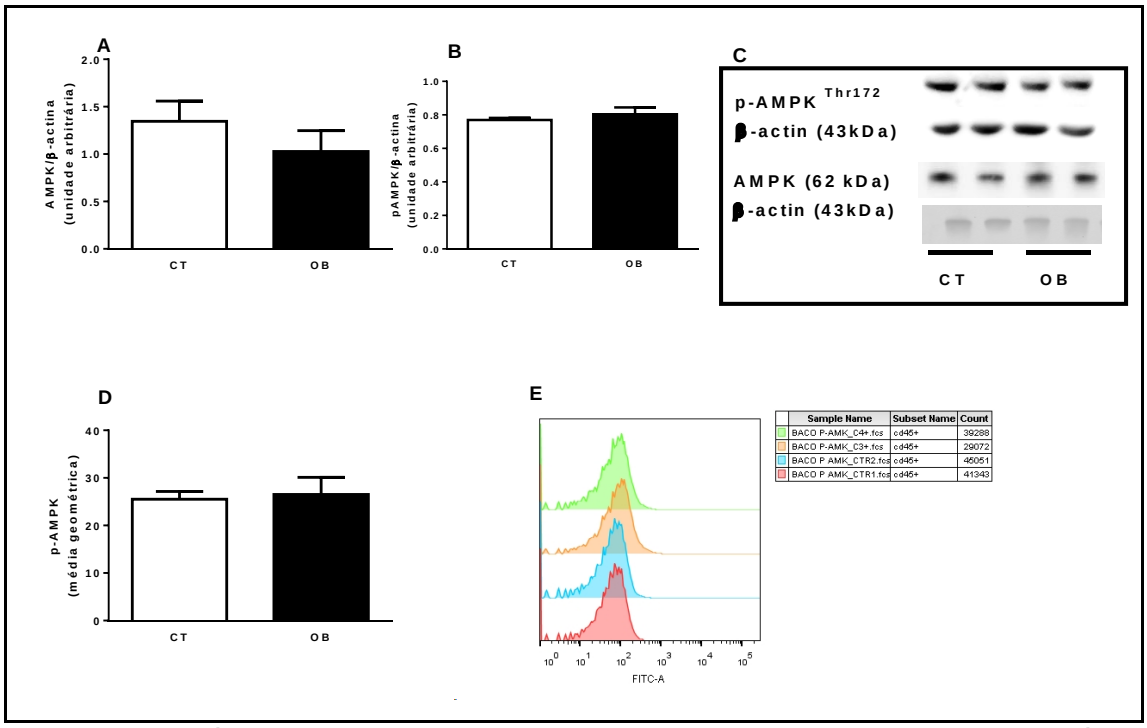

Figura 13 – Análise da expressão proteica de AMPK total (A) e fosforilada no resíduo treonina 172 (B, pAMPK ^{Thr172}) no baço. Determinada por Western blot, de camundongosque que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso). (C) Imagens representativas dos imunoblottings para AMPK total e fosforilada e β-actina. Expressão da pAMPK em leucócitos (D) e imagem representativa do pico de expressão de pAMPK (E). As barras representam média ± EPM. Teste t-Student: * $P < 0,05$ versus CT. n= 4 animais/grupo.

4.5.2. PVAT do leito mesentérico

No PVAT do leito mesentérico, a expressão da AMPK total foi similar entre os grupos estudados (Figura 14A e C). A expressão da AMPK fosforilada no resíduo treonina 172 foi semelhante entre os grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM, mas foi reduzida no grupo obeso-SPX em relação aos grupos controle-SPX e obeso-SHAM (Figura 14B e C). A fosfo-AMPK expressa nos leucócitos totais (CD45^{+}), do PVAT do leito mesentérico, não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 14D).

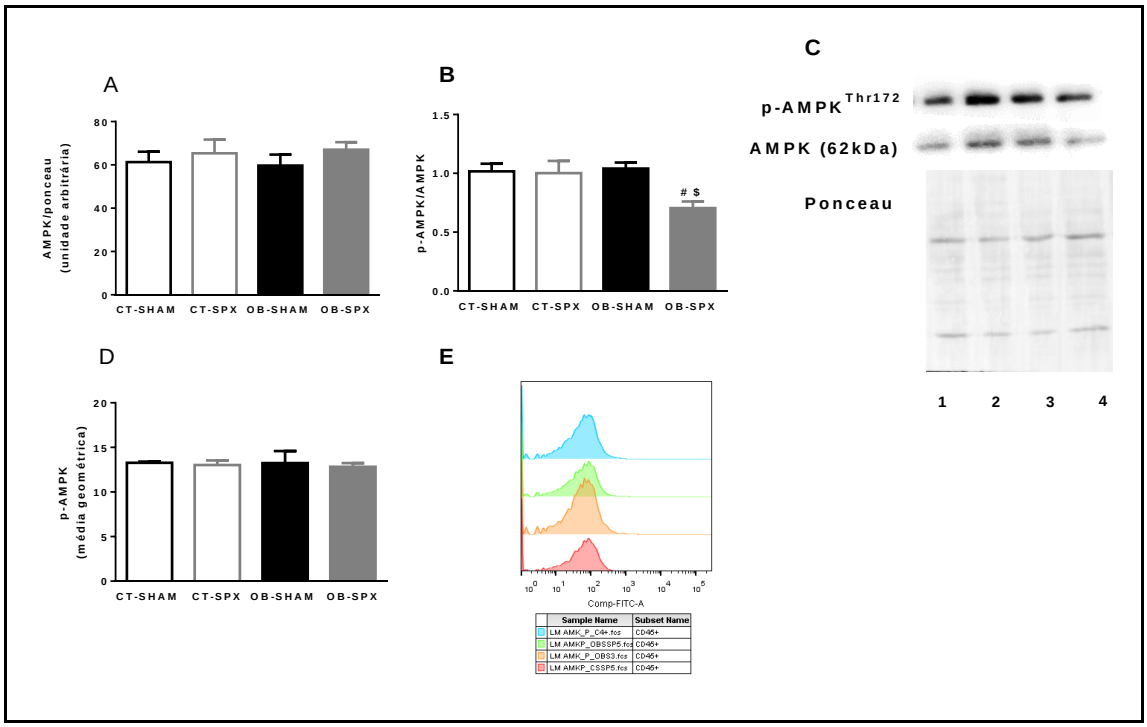

Figura 14 – Análise da expressão proteica de AMPK total (A) e fosforilada no resíduo treonina 172 (B, pAMPK ^{Thr172}) no PVAT do leito mesentérico. Determinada por *Western blot,* de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso). Imagens representativas dos *imunoblottings* e das respectivas membranas coradas com Ponceau (C): (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX. Análise da média geométrica da fosfo-AMPK dos leucócitos (CD45+) derivados do PVAT do leito mesentérico (D) e imagem representativa do pico de expressão de pAMPK (E). As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: $^{\$}$ *P* <0,05 versus CT-SPX, $^{\#}$ *P* <0,05 versus OB-SHAM. n= 4 animais/ grupo.

4.6. Expressão do RNAm da adiponectina no PVAT do leito mesentérico

Avaliamos a expressão do RNAm da adiponectina no PVAT do leito mesentérico. Os grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM apresentaram semelhante expressão de RNAm da adiponectina (Figura 15). Contudo, a expressão do RNAm da adiponectina foi aumentada no grupo obeso-SPX com relação aos grupos controle-SPX e obeso-SHAM (Figura 15).

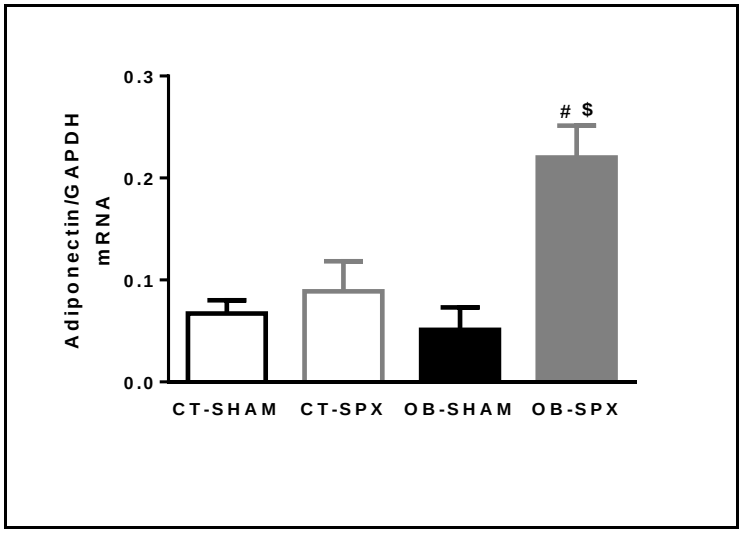

Figura 15 – Análise da expressão de RNAm da adiponectina no PVAT do leito mesentérico. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso), normalizada pelo controle interno GAPDH. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: $ *P* <0,05 versus CT-SPX, # *P* <0,05 versus grupo OB-SHAM. n= 4 animais/ grupo.

4.7. AMPK-KO

Avaliamos o baço dos camundongos AMPKα1$^{-/-}$ (KO) e selvagem (WT), alimentados com dieta padrão ou hiperlipidica, por 12 semanas. As citocinas pró-inflamatórias INF-γ e t-BET foram similares nos grupos controle-WT e controle-KO. A dieta hiperlipídica aumentou a expressão das citocinas INF-γ e t-BET no grupo obeso-WT com relação aos grupos controle-WT e controle-KO, mas esse aumento não foi observado no grupo obeso-KO (Figura 16A e B). A citocina anti-inflamatória IL-10 foi reduzida nos grupos controle-KO, obeso-WT e obeso-KO em relação ao grupo controle-WT (Figura 16C). A população de linfócitos T (CD3^{+}) foi semelhante nos grupos controle-WT e controle-KO. A dieta hiperlipídica aumentou a população de linfócitos T no grupo obeso-WT em relação ao grupo controle-WT, mas esse aumento não foi observado no grupo obeso-KO (Figura 16D e E).

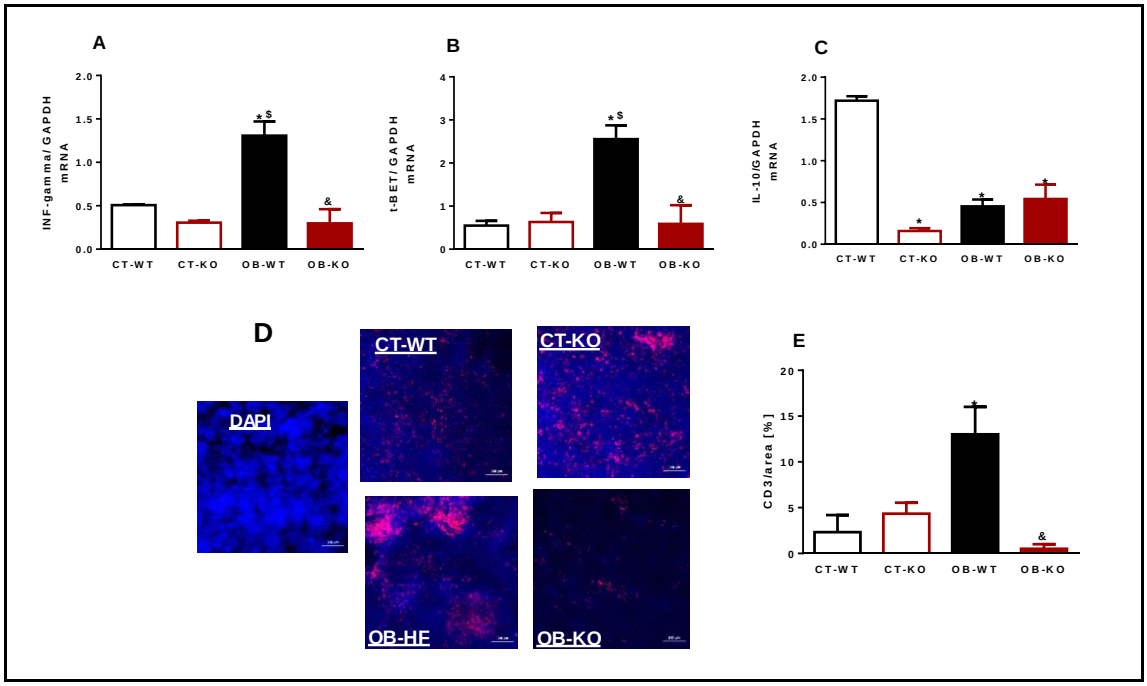

Figura 16– Análise da expressão de RNAm relativa do (A) INF-γ, (B) t-Bet e (C) IL-10, normalizadas pelo controle endógeno GAPDH, (D) cortes de baço marcados com anticorpo anti-CD3 e (E) análise quantitativa da população de CD3 no baço de camundongos selvagens (WT) e deficiêntes para AMPKα1 (KO). Camundongos que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso), durante 12 semanas. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * *P* <0,05 versus CT-WT, $^{\$}$ *P* <0,05 versus CT-KO, $^{\&}$ *P* <0,05 versus OB-WT. n= 4 animais/ grupo.

4.8. Efeito da dieta hiperlipídica e da esplenectomia no tecido adiposo periepididimal

4.8.1. Morfologia

A massa total do depósito de gordura periepididimal foi aumentada nos grupos OB-SHAM e OB-SPX (Figua 17D). Avaliando a hipertrofia dos adipócitos, o grupo obeso-SHAM apresentou aumento na área do adipócito em relação ao grupo controle-SHAM e o grupo obeso-SPX apresentou maior área do adipócito do que o obeso-SHAM (Figura 17E).

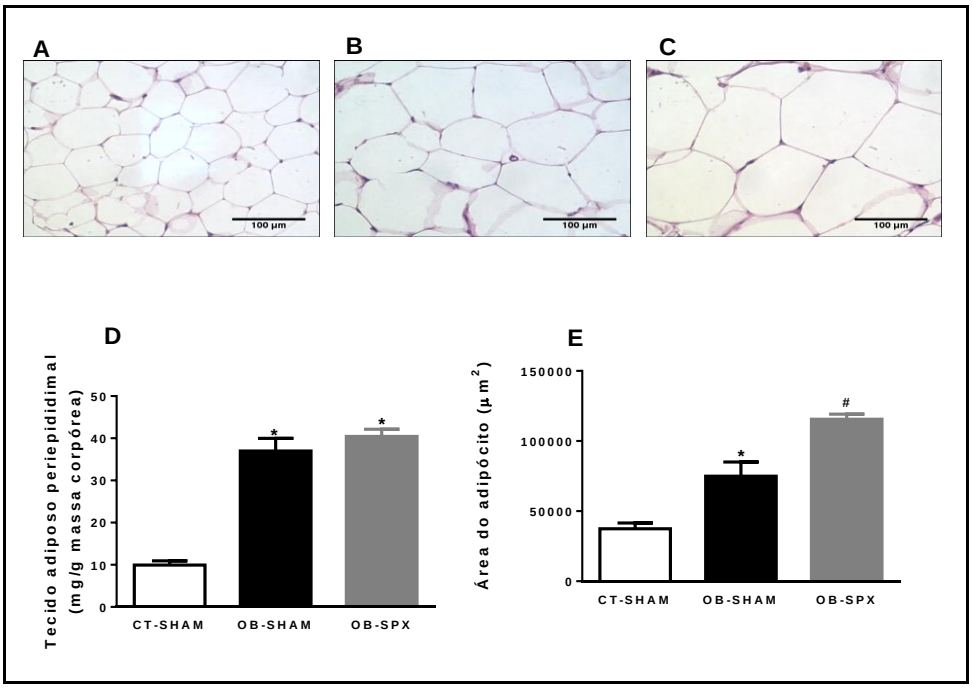

Figura 17 – Análise morfológica do tecido adiposo periepididimal. Imagens representativas de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina da gordura periepididimal de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenectomizados (SPX), que receberam ração padrão (controle, CT) ou ração hiperlipídica (obeso, OB). A: CT-SHAM. B: OB-SHAM; C: OB-SPX. Massa relativa (D) e área dos adipócitos (E) do tecido adiposo periepididimal. As barras representam média ± EPM. ANOVA-uma via: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM; # $P < 0,05$ versus OB-SHAM. n= 4-5 animais/grupo.

4.8.2. Imunofenotipagem de células imunológicas

A população de leucócitos totais ($CD45^+$) foi semelhante nos camundongos controle-SHAM e controle-SPX, porém os grupos obeso-SHAM e obeso-SPX apresentaram aumento na população de leucócitos com relação aos demais grupos (Figura 18A).

A população de linfócitos T ($CD4^+$) e linfócitos T ($CD8^+$) foram semelhantes entre os grupos estudados (Figura 18B e C). A população de linfócitos B ($B220^+$) foi semelhante entre os grupos controle-SHAM e controle-SPX. Porém, os grupos obeso-SHAM e obeso-SPX apresentaram redução na população de linfócitos B ($B220^+$) com relação aos grupos controles (Figura 18D).

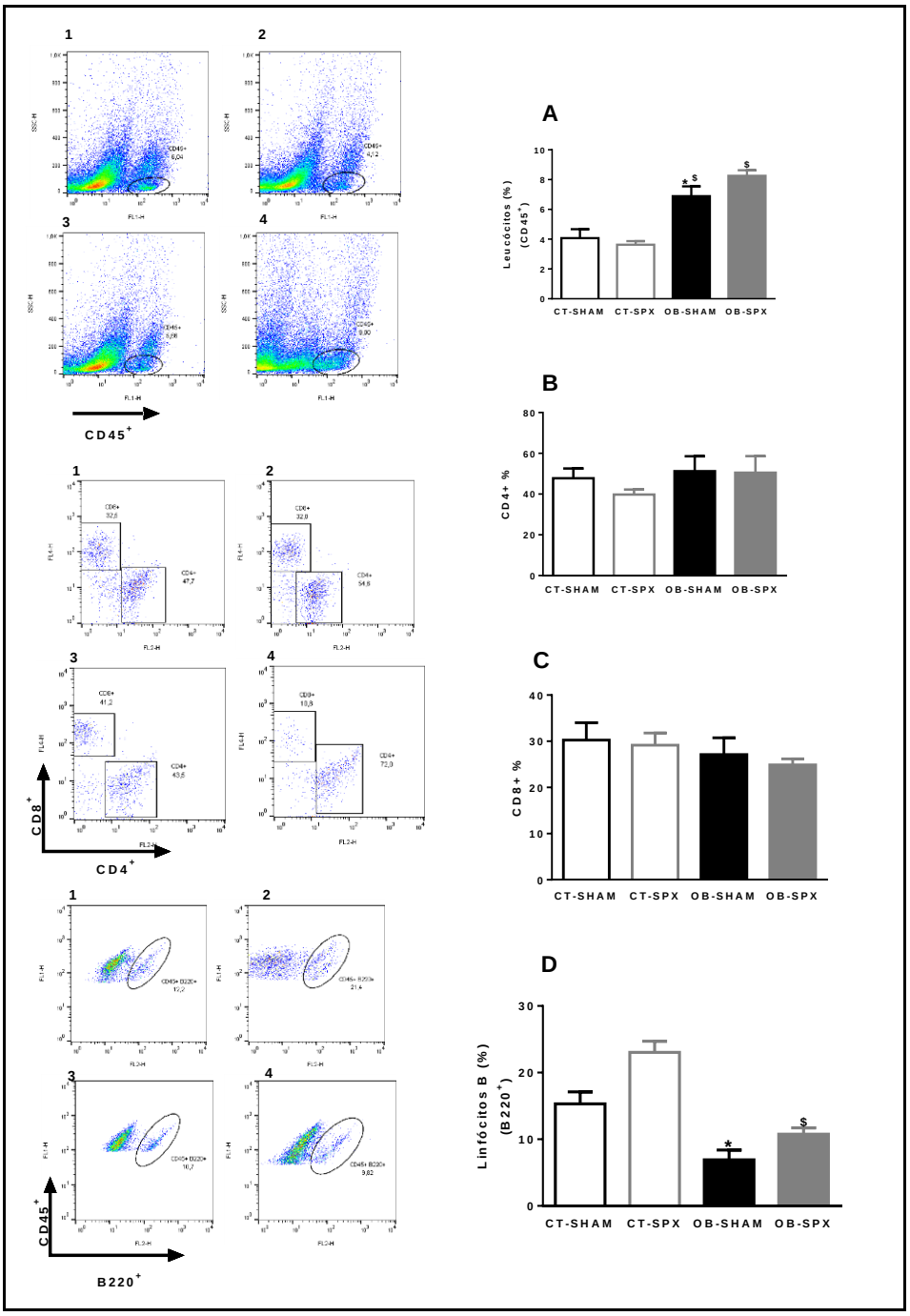

Figura 18 - Imunofenotipagem de células do depósito do tecido adiposo periepididimal. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. Dot plots representativos: (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX. Porcentagem de células das populações: (A) $CD45^+$ (leucócitos totais), (B) $CD4^+$ (subtipo de linfócito T), (C) $CD8^+$ (subtipo de linfócito T) e (D) $B220^+$ (linfócitos B). As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM, $^{\#}$ $P < 0,05$ versus OB-SHAM, $^{\$}P < 0,05$ versus CT-SPX. n= 10-13 animais/grupo.

As subpopulações de macrófagos M2 (CD206$^+$) e M1 (CD11c$^+$) foram semelhantes nos grupos controle-SHAM e controle-SPX (Figura 19). A população M2 na gordura periepididimal de camundongos não foi diferente entre os grupos controle-SHAM e obeso-SHAM, mas foi reduzido no grupo obeso-SPX em relação ao controle-SPX (Figura 19A). Os grupos obeso-SHAM e obeso-SPX apresentaram aumentada população de macrófagos M1 (CD11c$^+$) na gordura epididimal em relação aos grupos controles (Figura 19B).

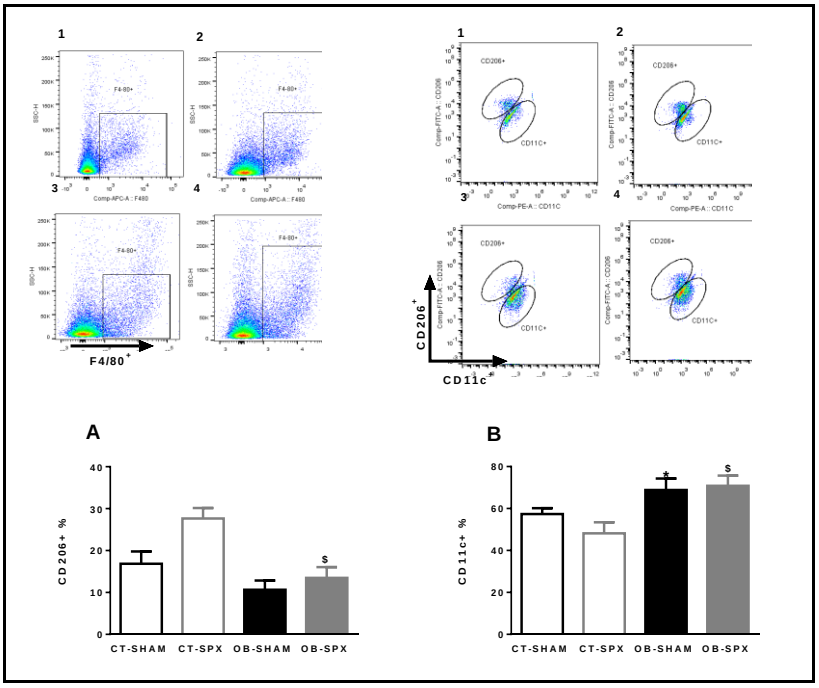

Figura 19– Avaliação da população de macrófagos M1 e M2 no tecido adiposo periepididimal. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. Dot plots representativos: (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX. Porcentagem de células das populações: (A) CD206$^+$ (macrófagos com fenótipo M2- anti-inflamatório) e (B) CD11c$^+$ (macrófagos com fenótipo M1-pró-inflamatório). As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: * P < 0,05 versus CT-SHAM, $^\$P$< 0,05 versus CT-SPX. n= 5 animais/grupo.

4.8.3. Conteúdo de citocinas

A concentração da citocina pró-inflamatória TNF-α na gordura periepididimal não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 20A). A concentração das citocnias IL-1β (Figura 20B) e IL-6 (Figura 20C) foi semelhante entre os grupos obeso-SHAM e controle-SHAM, mas foi aumentada no grupo obeso-SPX.

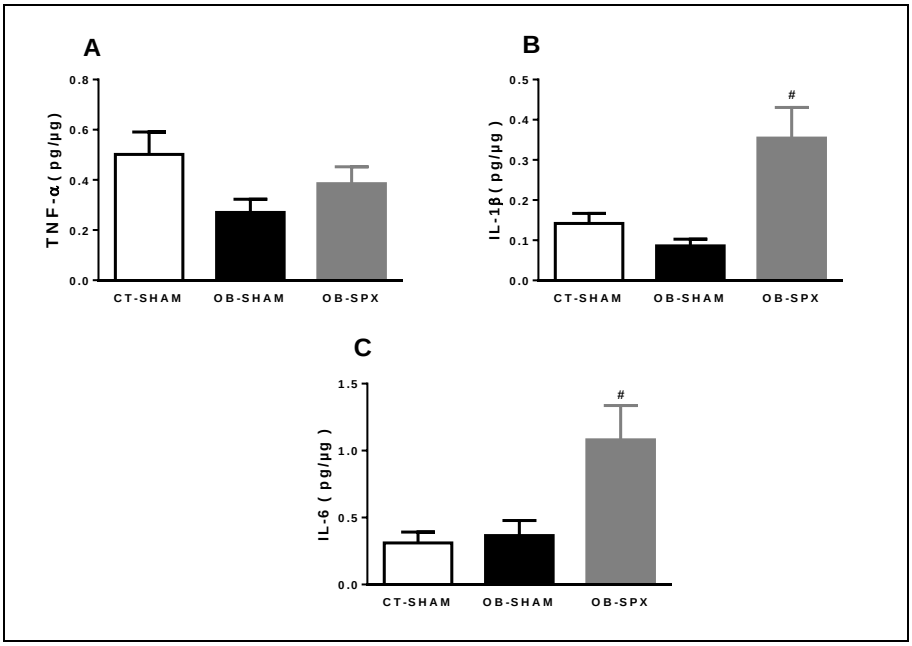

Figura 20 - Avaliação do conteúdo de citocinas no tecido adiposo periepididimal. TNF-α (A), IL-1β (B) e IL-6 (C) de camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso), determinado por ELISA. As barras representam média ± EPM. ANOVA-uma via: # $P < 0,05$ versus OB-sham. n= 5-8 animais/ grupo.

4.9. Quimiotaxia induzida pela gordura periepididimal

Avaliamos a mobilização das células do baço para o depósito de gordura periepididimal utilizando sistema de *transwell*. O número de leucócitos do baço migrados para o depósito de gordura periepididimal dos grupos obeso-SHAM e obeso-SPX foi menor do que do grupo controle-SHAM (Figura 21).

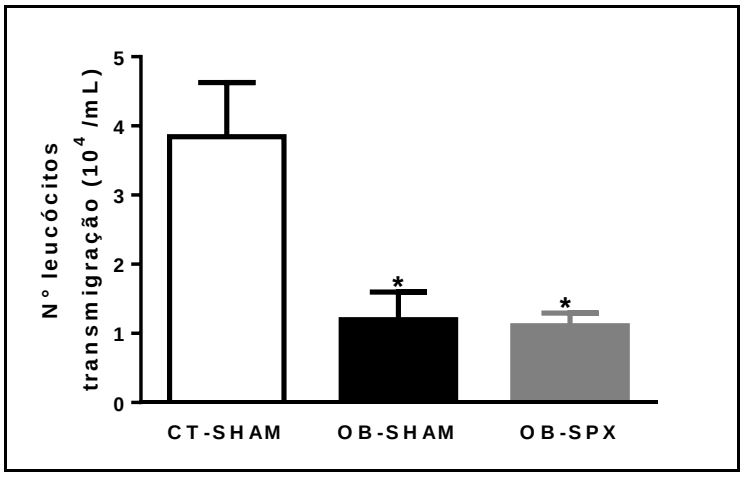

Figura 21- Migração dos leucócitos do baço para o depósito de gordura periepididimal. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou hiperlipídica (OB-obeso), avaliada em sistema de *transwell*. As barras representam média ± EPM de leucócitos presentes no compartimento inferior normalizados pela massa do depósito de gordura periepididimal. ANOVA-duas vias: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM. n= 5 animais/grupo.

4.10 Expressão da AMPK no tecido adiposo periepididimal

Não houve diferença na expressão proteica da AMPK total entre os grupos estudados (Figura 22A e B). Da mesma forma, todos os grupos apresentaram semelhante expressão da AMPK fosforilada em resíduo treonina 172 (Figura 22C).

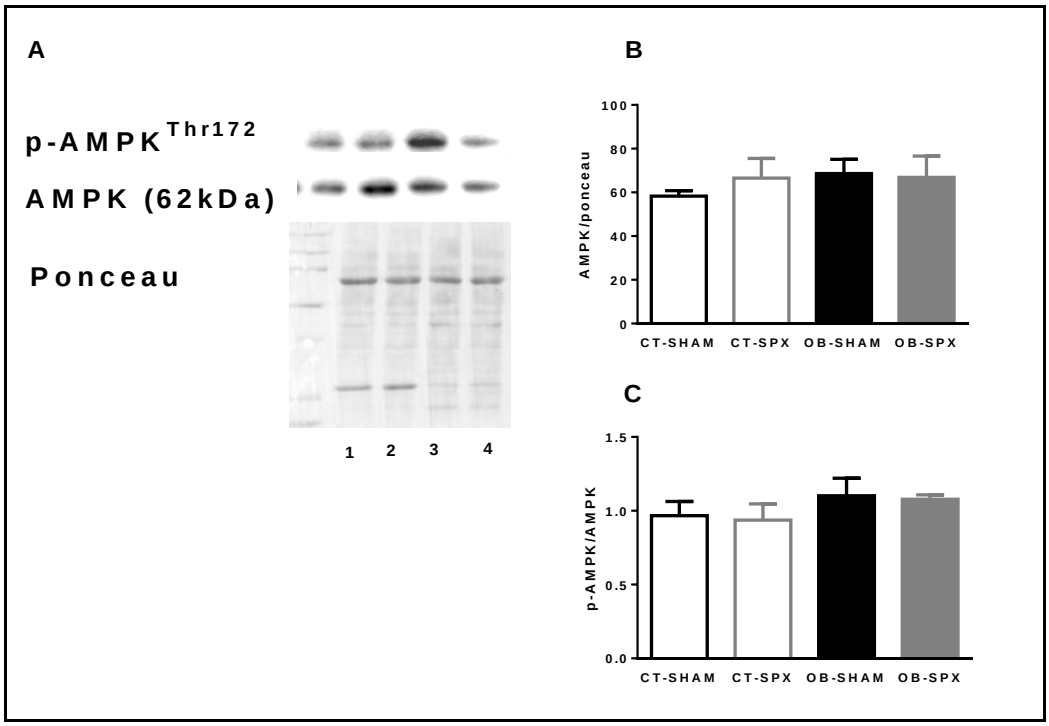

Figura 22 – Análise da expressão proteica de AMPK total (B) e fosforilada no resíduo treonina 172 (C, pAMPK ^{Thr172}) no tecido adiposo periepididimal. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso). (A) Imagens representativas dos *imunoblottings* e das respectivas membranas coradas com Ponceau: (1) CT-SHAM, (2) CT-SPX, (3) OB-SHAM e (4) OB-SPX.. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias. n= 7-8 animais/ grupo.

4.11. Expressão da adiponectina no depósito de gordura periepididimal

Os grupos controle-SHAM e controle-SPX apresentaram semelhante expressão de RNAm da adiponectina (Figura 23). Entretanto, a expressão do RNAm da adiponectina no depósito de gordura periepididimal foi reduzida nos grupos obeso-SHAM e obeso-SPX com relação aos grupos controles (Figura 23).

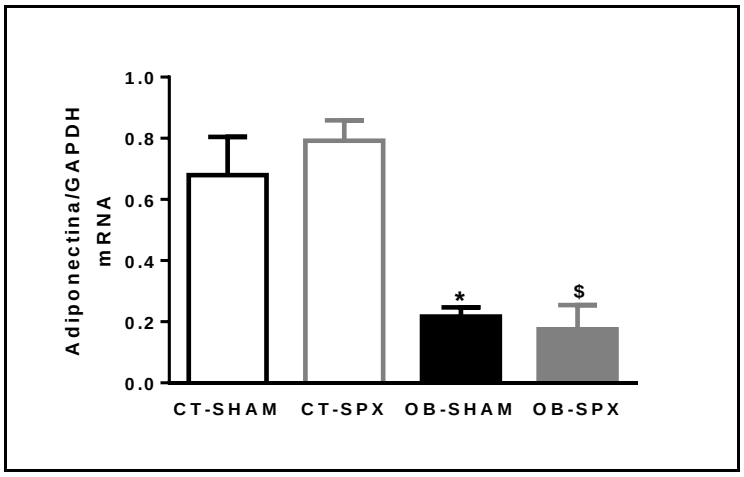

Figura 23 – Análise relativa da expressão do RNAm da adiponectina no tecido adiposo periepididima. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com ração padrão (CT-controle) ou ração hiperlipídica (OB-obeso), normalizada pelo controle endógeno GAPDH. As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias: $ *P* <0,05 versus CT-SPX, * *P* <0,05 versus grupo SHAM. n= 4 animais/ grupo.

4.12. Imunofenotipagem de células imunológicas do sangue periférico

O número de leucócitos circulantes foi semelhante nos grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM, mas foi aumentado no grupo obeso-SPX (Figura 24A). A população de linfócitos T ($CD4^+$) e linfócitos T ($CD8^+$) foram semelhantes nos grupos estudados (Figura 24 B e C). A população de linfócitos B ($B220^+$) foi semelhante nos grupos controle-SHAM, controle-SPX e obeso-SHAM, porém foi reduzida no grupo obeso-SPX (Figura 24D). A população de monócitos/macrófagos ($CD11b^+/F4/80^+$) não foi diferente entre os grupos obeso-SHAM e controle-SHAM, mas foi aumentada no grupo obeso-SPX (Figura 24E).

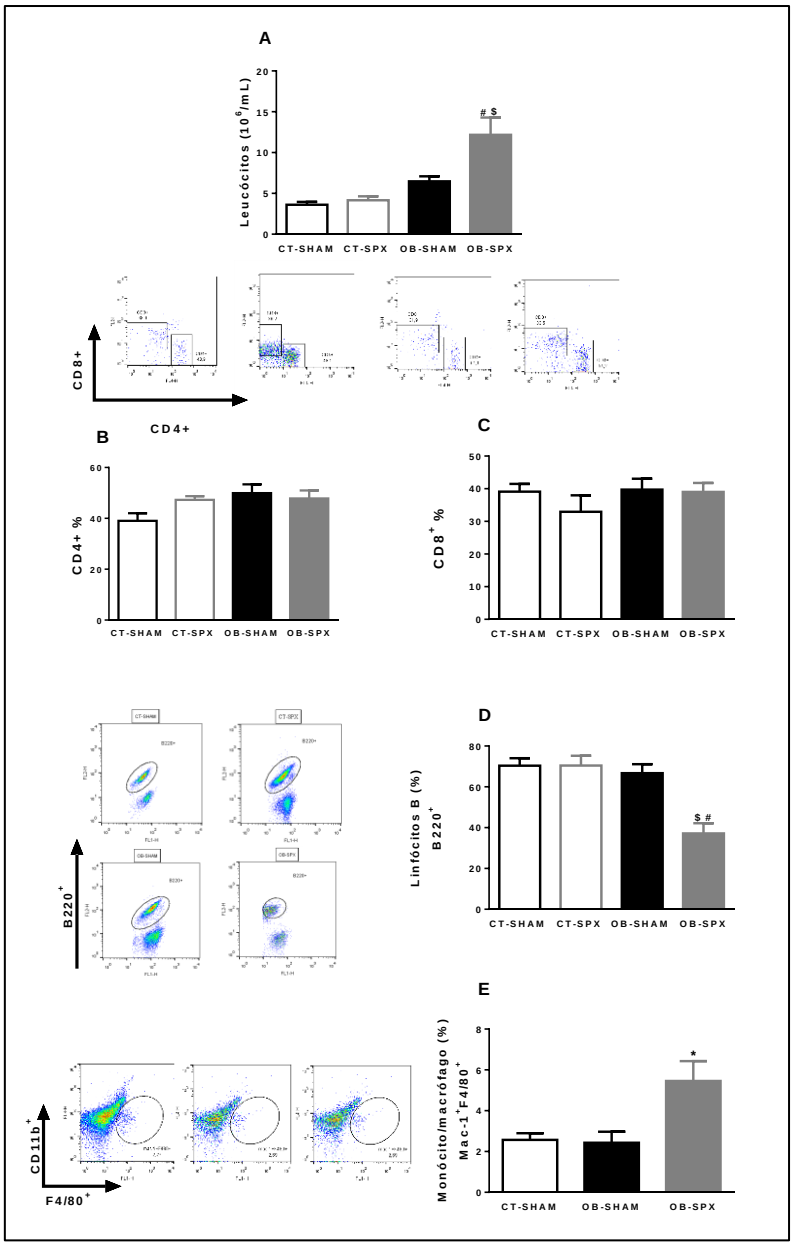

Figura 24 - Imunofenotipagem de células do sangue. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. (A) leucócitos totais. Porcentagem de células das populações: (B) $CD4^+$ (subtipo de linfócito T), (C) $CD8^+$ (subtipo de linfócito T), (D) $B220^+$ (linfócitos B) e (E) $CD11b^+/F4/80^+$ (monócitos/macrófagos). As barras representam média ± EPM. ANOVA-duas vias ou uma via: * $P < 0,05$ versus CT-SHAM, $^{\$}P < 0,05$ versus CT-SPX e $^{\#}P < 0,05$ versus OB-SHAM. n= 10-13 animais/grupo.

4.13. Imunofenotipagem de células imunológicas da medula óssea

O número de leucócitos totais na medula óssea não foi diferente entre os grupos controle-sham, OB-SHAM e OB-SPX (Figura 24A). A população de células mielocíticas ($CD11b^+$ $f4/80^+Gr\text{-}1^+$) foi semelhante entre o grupo obeso-SHAM e controle-SHAM, mas foi aumentada no grupo obeso-SPX (Figura 25B).

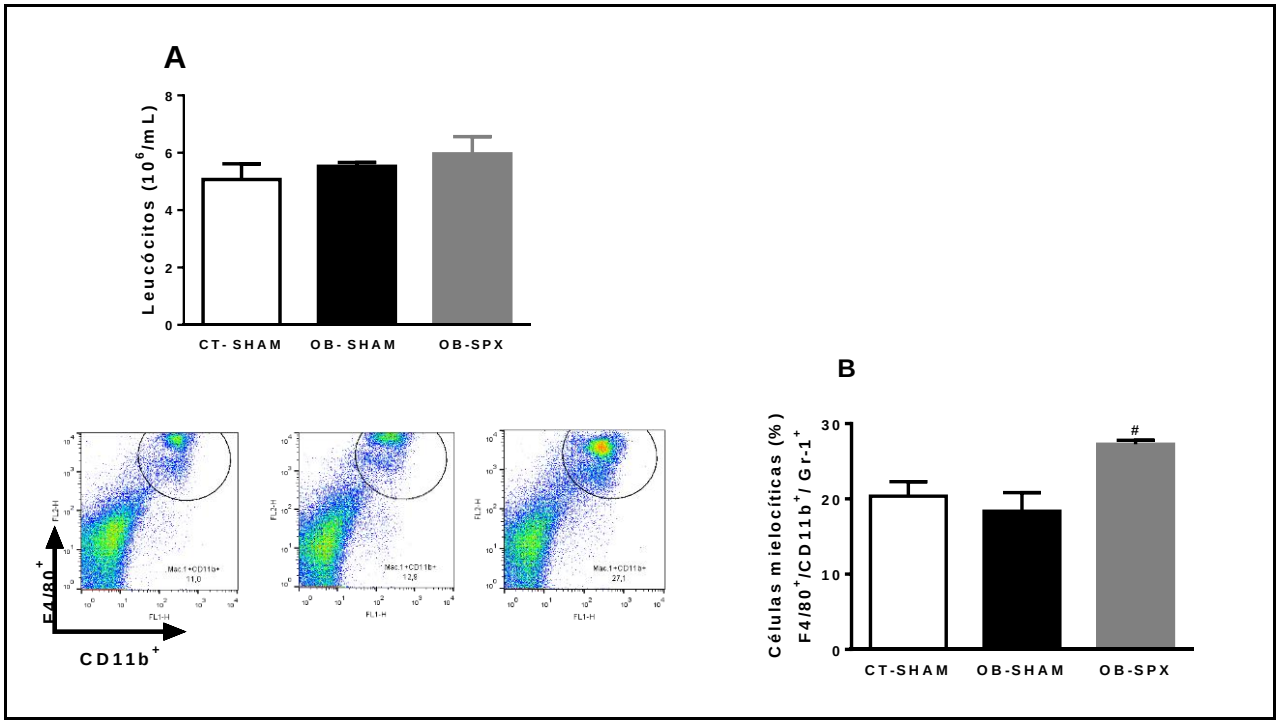

Figura 25- Imunofenotipagem de células isoladas da medula óssea. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. (A) leucócitos totais. Porcentagem de células das populações: (B) $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ $F4/80^+$ (células mielocíticas). As barras representam média ± EPM. ANOVA-uma via: $^{\#}$ $P < 0{,}05$ versus OB-SHAM. n= 10-13 animais/grupo.

4.14. Imunofenotipagem de células imunológicas do timo

O número de leucócitos totais do timo não foi diferente entre os grupos controle-sham, obeso-sham e obeso-SPX (Figura 25A). As populações de linfócitos T ($CD4^+$) (Figura 26B) e linfócitos T ($CD8^+$) (Figura 26C) no timo não foram diferentes entre os grupos avaliados.

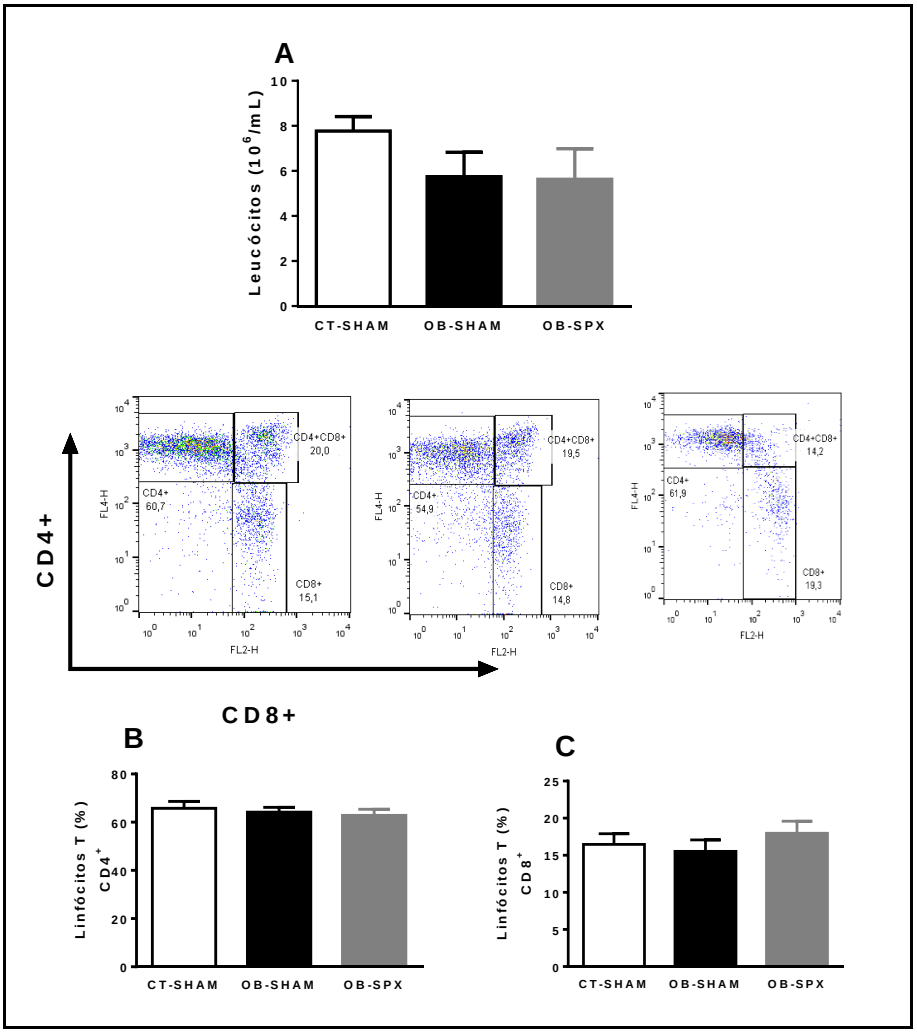

Figura 26 - Imunofenotipagem de células isoladas do timo. Camundongos falso-operados (SHAM) e esplenctomizados (SPX), que foram alimentados com dieta padrão (controle, CT) ou hiperlípidica (obeso, OB) por 16 semanas. Número de leucócitos totais (A), porcentagem de células das populações: (B) $CD4^+$ (subtipo de linfócito T) e (C) $CD8^+$ (subtipo de linfócito T). As barras representam média ± EPM. n= 10-13 animais/grupo.

5. DISCUSSÃO

A obesidade é um risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, resistência à insulina, doenças cardiovasculares entre outras doenças. Portanto, muitos modelos de obesidade, induzidos por dieta ou genéticos, são utilizados para estudar o mecanismo pelo qual essa doença leva ao desenvolvimento das comorbidades associadas (CAMPFIELD et al., 1995; LIN et al., 2000; de SOUZA et al., 2005; GALLOU-KABANI et al., 2007; OKADA et al., 2010; KOBAYASI et al., 2010; FITZGIBBONS et al., 2011). Em nosso estudo optamos pelo modelo induzido por dieta rica em gordura, pois é um dos principais modelos aplicados para entender a correlação entre as dietas ocidentais e o consumo de alto teor lipídico com o desenvolvimento da obesidade e as alterações associadas, como a inflamação crônica de baixo grau (WANG e LIAO, 2012).

O consumo de dieta hiperlipídica foi menor que o consumo de dieta padrão, indicando que a dieta utilizada no presente estudo não promove hiperfagia. Sabe-se que o consumo desse tipo de dieta aumenta a captação enérgica (LIN et al., 2000); de fato, a eficiência enérgica da dieta utilizada no presente estudo foi maior quando comparada à da ração padrão, sendo comprovada pelo aumento da massa relativa dos depósitos de gorduras viscerais, periepididimal e retroperitoneal. Dessa forma, como foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (INADA, 2016; de SOARES et al., 2017), a dieta hiperlipídica por 16 semanas induziu a obesidade em camundongos C57BL/6. O fato de a esplenectomia não ter alterado os parâmetros que caracterizam a obesidade sugere que o baço não altera a captação e o gasto energético, além de não participar no aumento da adiposidade.

Em nosso estudo, evidenciamos que a esplenectomia reduziu a glicemia e aumentou a insulinemia em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas, o que não foi observado nos camundongos controles, indicando que o baço atua no controle glicêmico da obesidade. Diferentemente do observado no presente estudo, em ratos com obesidade hipotalâmica induzida por injeções de glutamato monossódico, a esplenectomia aumentou a glicemia, por reduzir a função endócrina do pâncreas, (LEITE et

al., 2015) e a sensibilidade à insulina (LAN et al., 2014). Por outro lado, Gotoh e colaboradores não observaram diferenças na concentração sérica de glicose e insulina entre os camundongos SHAM e esplenectomizados alimentados com ração hiperlipídica por 8 semanas (GOTOH et al., 2012(a)). Esses resultados mostram que a participação do baço na homeostasia glicêmica depende da espécie, do modelo e do tempo de obesidade.

Além de atuar como local de hematopoese extra-medular, o baço é um órgão linfoide com um importante papel na resposta imunológica inata e adaptativa, onde há maturação de células imunológicas, como linfócitos T e B, e produção de anticorpos (SAKATA et al., 2018). A polpa branca desse órgão é organizada em bainha perivascular de linfócitos T, circundada por folículo de linfócito B e uma zona marginal, que faz interface com a polpa vermelha, constituída por linfócitos B e macrófagos (TARANTINO et al., 2011). Neste trabalho, foi observado que os camundongos obesos apresentaram redução do tamanho do baço e aumento do número de polpas brancas. Apesar do número elevado de polpas brancas, os leucócitos totais estavam reduzidos no órgão dos camundongos obesos, o que pode estar relacionado à atrofia do baço.

A população de células mielocíticas imaturas no baço, onde se diferenciam em granulócitos ou monócitos, aumenta de maneira transitória na vigência de uma infecção (RASMUSSEN et al., 2012). Verificamos que, associado ao número reduzido de leucócitos totais, essa população foi reduzida no órgão de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas. De forma distinta ao que foi observado no presente estudo, a população de células mielocíticas imaturas no baço de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 20 semanas não foi diferente à de camundongos controles (PINDJAKOVA et al., 2017). Em conjunto, esses resultados indicam que a demanda de células mielocíticas varia ao longo de uma dieta hiperlipídica.

Os linfócitos B maturados no baço, além de serem essenciais para a produção de anticorpos, sintetizam a citocina anti-inflamatória IL-10, responsável pela manutenção de um ambiente anti-inflamatório (Morita et al., 2001); nesse sentido, a deficiência de IL-10 derivada desse órgão poderia explicar a inflamação observada na obesidade, pois o consumo de ração

hiperlipídica por oito semanas promoveu estresse oxidativo e reduziu o número de linfócitos B no órgão, prejudicando a síntese da IL-10 (MARTIN et al., 2000; GOTOH et al., 2012(b); GOTOH et al., 2012(c)). No presente estudo, não observamos diferenças no número de linfócitos B, porém a dieta hiperlipídica reduziu o conteúdo de IL-10 e aumentou o de TNF-α no baço.

A obesidade está associada à hipertrofia dos adipócitos, decorrente do acúmulo de lipídeos, e secreção anormal de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, promovendo um quadro de inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo branco (PRIEUR et al., 2011; WU et al., 2014; WU et al., 2016). Corroborando diversos estudos, observamos o aumento da massa e a hipertrofia dos adipócitos do depósito periepididimal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Contudo, os depósitos não respondem da mesma maneira à dieta hiperlipídica, pois, apesar da massa relativa do PVAT do leito mesentérico ter sido aumentada em camundongos obesos, não houve hipertrofia dos adipócitos nesse tecido. Por outro lado, o baço modula a resposta hipertrófica dos adipócitos em ambos os depósitos, visto que a esplenectomia aumentou o tamanho do adipócito no PVAT e exacerbou a hipertrofia no depósito periepididimal.

A expansão do tecido adiposo, caracterizada pela hipertrofia dos adipócitos, ativa uma cadeia de respostas com a liberação de mediadores quimiotáxicos (como MCP-1) e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6), levando ao recrutamento e ativação de diferentes tipos de células imunológicas, como macrófagos e linfócitos T e B, para o tecido que culmina em inflamação crônica de baixo grau e diminuição da sensibilidade à insulina (TROTTIER et al., 2009; FUJISAKA et al., 2009).

Gotoh e colaboradores apontaram que a IL-10 sintetizada por células B maturadas no baço promove um efeito protetor contra inflamação no tecido adiposo periepididimal induzida por obesidade (GOTOH et al., 2012). O depósito visceral apresenta infiltrado de linfócitos B diferenciados provenientes do baço. Wu e colaboradores demonstraram que, no início da dieta hiperlipídica, há mobilização de células B produtoras de IL-10 do baço para o depósito periepididimal, porém, o órgão perde a capacidade de maturação e mobilização das células B com uso prolongado da dieta hiperlipídica,

promovendo redução das células B no próprio órgão e no depósito visceral (WU et al., 2014). Mesmo com as diferenças morfológicas observadas entre o PVAT e o depósito periepididimal, linfócitos B foram reduzidos em ambos os tecidos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas. Nossos resultados não nos permitem confirmar a origem das células B infiltradas, mas houve redução dessas células no PVAT de animais esplenectomizados controles e obesos, sem efeito somatório da dieta. Por outro lado, o baço parece não contribuir para a infiltração das células B no depósito periepididimal, uma vez que a ausência do órgão não modificou estas células em camundongos controles. O efeito da dieta hiperlipídica em reduzir as células B no PVAT e depósito periepididimal não parece estar relacionado a um comprometimento em sua produção, pois a dieta não modificou a população dessas células no baço.

Linfócitos T CD8+ e CD4+ atuam de maneira cooperativa e regulam a resposta inflamatória. Camundongos submetidos à dieta rica em gordura por 3 semanas apresentaram aumento da subpopulação de linfócitos T CD8+ no tecido adiposo periepididimal (Adler et al., 2014). A deleção das células T CD8+ nos camundongos obesos promoveu aumento na infiltração de macrófagos no depósito visceral (NISHIMUA et al., 2009). Em nosso estudo, a dieta hiperlipídica por 16 semanas não modificou o número de linfócitos T CD4+ e CD8+ no PVAT do leito mesentérico e no depósito visceral, tampouco modificou o número dessas células nos locais de produção e maturação (baço e timo); no entanto, a esplenectomia reduziu os linfócitos T CD8+ no PVAT do leito mesentérico de camundongos obesos.

O tecido adiposo visceral apresenta infiltrado de macrófagos residentes, responsáveis pela homeostase tecidual (LUMENG et al., 2008); entretanto, quando acontece um estímulo inflamatório, como o observado na obesidade, os macrófagos residentes do tecido adiposo visceral sofrem polarização para macrófagos com fenótipo pró-inflamatório do tipo M1, favorecendo aumento dos marcadores pró-inflamatórios e promovendo a inflamação tecidual (LUMENG et al., 2008; BELCHIOR et al., 2015). Nesse sentindo, avaliamos a infiltração de macrófagos no PVAT do leito mesentérico e observamos que a dieta hiperlipídica reduziu os macrófagos com fenótipo anti-inflamatório M2,

mas não houve diferença nos macrófagos pró-inflamatórios. Por outro lado, a esplenectomia promoveu aumento dos macrófagos e a polarização dos macrófagos pró-inflamatório M1. Em contraste, no tecido adiposo visceral observamos aumento de macrófagos e da polarização dos macrófagos M1 nos camundongos SHAM e SPX. Semelhantemente, Wu e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos C57BL/6J esplenectomizados, alimentados com dieta hiperlípidica por 10 semanas, apresentaram aumento de macrófagos infiltrados no tecido adiposo visceral quando comparados com camundongos obesos SHAM. Nossos resultados indicam que, na ausência do baço, a medula óssea aumenta a produção de monócitos, que são mobilizados em maior quantidade para os tecidos alvos, pois foi observado aumento de monócitos na medula óssea e no sangue de camundongos obesos esplenectomizados.

Com o objetivo de confirmar se o baço modula a inflamação do PVAT, avaliamos o conteúdo de citocinas no PVAT do leito mesentérico de camundongos obesos SHAM e SPX. Identificamos que no PVAT de camundongos obesos-SHAM, há uma redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e a esplenectomia, por sua vez, aumenta o conteúdo das citocinas pró-inflamatórias no PVAT dos camundongos obesos-SPX. Embora o depósito periepididimal de camundongos obesos tenha apresentado aumento de macrófagos M1 e redução de M2, o perfil de citocinas foi semelhante ao do PVAT. Semelhantemente, ratos esplenectomizados alimentados com ração hiperlipídica por 4 semanas apresentaram aumento de macrófagos infiltrados e marcadores inflamatórios (IL-β e TNF-α) no tecido adiposo abdominal em comparação ao grupo SHAM (INOUE et al., 2012). Em conjunto, os dados indicam que o baço modula a resposta inflamatória no PVAT do leito mesentérico e do depósito visceral de camundongos obesos.

Ainda com o objetivo de confirmar se o baço modula a inflamação no PVAT, avaliamos a capacidade das células do órgão migrarem para o PVAT do leito mesentérico. O presente estudo demonstrou redução da migração de leucócitos totais do órgão em questão para o PVAT de camundongos obesos. Dessa maneira, nossos resultados indicam que a capacidade do PVAT de promover quimiotaxia de leucócitos provenientes do baço está comprometida

em camundongos obesos, o que corrobora com a redução das células imunológicas e do conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no PVAT. Considerando que o PVAT do leito mesentérico possui características diferentes do tecido adiposo periepididimal, avaliamos a capacidade das células do baço migrarem para o tecido adiposo periepididimal e observamos que os resultados entre os dois depósitos são semelhantes.

A AMPK parece exercer uma atividade anti-inflamatória tanto em adipócitos quanto em macrófagos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a produção de IL-10 e a polarização de macrófagos M2 (LIHN et al., 2008, MORITA et al., 2018, YANG et al., 2010, SAG et al., 2008, GALIC et al., 2011), portanto avaliamos se o conteúdo de AMPK se relacionaria com o perfil inflamatório do baço e do PVAT e verificamos que o conteúdo e a ativação da proteína AMPK nesse órgão, onde há aumento de marcadores pró-inflamatórios, foram semelhantes entre os camundongos controles e obesos. Utilizando camundongos AMPKα1-/- alimentados com dieta hiperlipídica, observamos redução na população de linfócitos totais (CD3+), redução dos marcadores inflamatórios (INF- e t-BET) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 no baço desses camundongos, mostrando que, no baço, a presença de AMPK é fundamental para a inflamação induzida por dieta hiperlipídica.

Contudo, no PVAT, a relação da AMPK com o a inflamação parece ser diferente: o conteúdo e ativação da AMPK no PVAT, onde não há indícios de inflamação, não foram modificados pela dieta hiperlipídica, mas, no PVAT de camundongos esplenectomizados – que apresentou inflamação –, a ativação da AMPK foi reduzida. Almabrouk e colaboradores indicaram que uma maior infiltração de macrófagos no PVAT da aorta torácica de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica foi associada à redução da ativação da AMPK e que camundongos com deleção da AMPKα1 alimentados com dieta controle apresentaram resposta semelhante (ALMABROUK et al., 2018). Os resultados sugerem que a AMPK contribui para o perfil anti-inflamatório observado no PVAT do leito mesentérico dos camundongos obesos.

Animais com deleção na AMPKα1 apresentaram redução da secreção de adiponectina no PVAT da aorta torácica quando comparados com o grupo

selvagem (ALMABROUK et al., 2018). Além disso, citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, podem regular a expressão da adiponectina (LIHN et al.,2004; TSUCHIDA et al., 2005; SELL et al., 2006). Sabendo que a esplenectomia aumenta os marcadores inflamatórios e reduz a ativação da AMPK, nós avaliamos a expressão do RNAm da adiponectina no PVAT do leito mesentérico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e verificamos que a esplenectomia aumentou a expressão do RNAm da adiponectina. Em comparação ao PVAT, o tecido adiposo periepididimal apresenta redução da expressão do RNAm da adiponectina em camundongos SHAM e SPX alimentados com ração hiperlipídica. Embora o conteúdo proteico de adiponectina não tenha sido avaliado, nossos dados sugerem que há regulação da transcrição do gene da adiponectia pela redução da atividade da AMPK no PVAT mesentérico de camundongos obesos esplenectomizados.

Em conjunto, os dados acima descritos confirmam que a dieta hiperlipídica por 16 semanas promove obesidade com aumento da adiposidade, mas diferente do esperado, a dieta não promoveu hipertrofia dos adipócitos do PVAT do leito mesentérico e não alterou os marcadores inflamatórios, bem como a infiltração de células imunológicas. As evidências que o PVAT e o tecido adiposo periepididimal possuem características diferentes foi confirmada nesse estudo, uma vez que a dieta hiperlipídica por 16 semanas promoveu hipertrofia dos adipócitos e aumento da infiltração de células imunológicas nesse tecido, porém não foi observado alteração nos marcadores inflamatórios. A hipótese de que o baço participaria da resposta inflamatória do PVAT do leito mesentérico não foi confirmada, mas a ausência do órgão promoveu hipertrofia dos adipócitos e inflamação no PVAT do leito mesentérico. Da mesma forma, no tecido adiposo periepididimal a falta do baço exacerba a hipertrofia dos adipócitos e o aumento dos marcadores inflamatórios; ademais, a AMPK no PVAT pode exercer ação anti-inflamatória e, no baço, possui ação pró-inflamatória, demonstrando assim que a depender de sua localização seu efeito é distinto.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revela que:

- Apesar da obesidade já ter sido estabelecida, 16 semanas de dieta hiperlipídica ainda não promove inflamação no PVAT do leito mesentérico;

- O PVAT é um depósito com características diferentes às do tecido adiposo periepididimal, pois os dois depósitos respondem diferentemente à dieta hiperlipídica, tanto em relação à inflamação quanto à morfologia;

- O baço, apesar de apresentar indícios de inflamação, é de suma importância para o controle dos danos causados pela dieta hiperlipídica, uma vez que a sua ausência promove inflamação no PVAT do leito mesentérico e exacerba a inflamação no tecido adiposo periepididimal.

- A relação da AMPK com a inflamação é diferente no PVAT e no baço, tendo um caráter anti-inflamatório no PVAT mesentérico e pró-inflamatório no órgão em questão.

7. REFERENCIAS

ADLER, B.J.; GREEN, D.E.; PAGNOTTI, G.M.; CHAN, M. E.; RUBIN, C.T. High Fat Diet Rapidly Suppresses B Lymphopoiesis by Disrupting the Supportive Capacity of the Bone Marrow Niche. **PLOS One**, March 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090639>. Acesso em:02/05/2018

ALMABROUK, T.A.M; WHITE, A.D; UGUSMAN, A.B; SKIBA, D.S; KATWAN, O.J; ALGANGA, H.; GUZIK, T.J; TOUYZ, R.M; Salt, I.P; KENNEDY, S. High Fat Diet Attenuates the Anticontractile Activity of Aortic PVAT via a Mechanism Involving AMPK and Reduced Adiponectin Secretion. **Frontiers in Physiology**, Feb. 2018. Disponível em: < https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00051>. Acesso em:28/05/2018

AOQUI, C.; CHMIELEWSKI, S.; SCHERER, E.; et al. Microvascular dysfunction in the course of metabolic syndrome induced by high-fat diet. **Cardiovascular Diabetology**, Feb. 2014. Disponível em: < https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-31>. Acesso em: 28/05/2018

BELCHIOR, T.; PASCHOAL, V.A.; MAGDALON, J.; CHIMIN, P.; FARIAS, T.M.; CHAVES-FILHO, A.B.; GORJÃO, R.; ST-PIERRE, P.; MIYAMOTO, S.; KANG, J.X.; DESHAIES, Y.; MARETTE, A.; FESTUCCIA, W. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPARγ-dependent and PPARγ-independent actions **Molecular Nutrition & Food Research**, May 2015. Disponível em: < https://doi.org/10.1002/mnfr.201400914>. Acesso em: 28/05/2018

BLOOR, I.D.; SYMONDS, M.E. Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation. **Hormones and Behavior**, June 2014. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.007>. Acesso em: 28/05/2018

BOLUS, W.R.; HASTY, A.H. Contributions of Innate Type 2 Inflammation to Adipose Function.**J. Lipid Research**, June 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.R085993>. Acesso em: 28/05/2018

BROWN, N.K.; ZHOU, Z.; ZHANG, J.; et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Aug. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303029>. Acesso em: 28/05/2018

CALABRO, P.; YEH, E.T. Obesity, inflammation, and vascular disease: The role of the adipose tissue as an endocrine organ. In: Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases. **Subcellular Biochemistry**, vol. 42, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/1-4020-5688-5_3. Acesso em: 28/05/2018

Campfield, L.; Smith, F.; Guisez, Y.; Devos, R.; Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, July 1995. Disponível em: < https://doi.org/10.1126/science.7624778>. Acesso em: 28/05/2018

CARNEVALE, D.; PERROTTA, M.; PALLANTE, F.; et al. A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. **Nature Communications**, Sep. 2016. Disponível em: < https://doi.org/10.1038/ncomms13035>. Acesso em: 28/05/2018

CESTA, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic Pathology,** Aug. 2006. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/01926230600867743>. Acesso em: 28/05/2018

CHANG, L.; VILLACORTA, L.; LI, R.; HAMBLIN, M.; XU, W.; DOU, C.; et al. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. **Circulation Research**, Aug. 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104489>. Acesso em: 28/05/2018

CHATTERJEE, T.K; STOLL, L.L; DENNING, G.M; et al. Pro-inflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high fat feeding. **Circulation Research**, Feb. 2009. Disponível em: < https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182998>. Acesso em: 28/05/2018

CHEN, Y.; PAN, R.; PFEIFER, A. Fat tissues, the brite and the dark sides. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, Nov. 2016. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s00424-016-1884-8>. Acesso em: 28/05/2018

DE SOUZA, C.T.; ARAUJO, E.P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R.L.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, Oct. 2005 .Disponível em: < https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>. Acesso em: 28/05/2018

ERINGA, E.G; et al. Regulation of vascular function and insulin sensitivity by adipose tissue: focus on perivascular adipose tissue. **Microcirculation**, June 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10739680701303584>. Acesso em: 28/05/2018

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A., et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, May 2011. Disponível em: < https://doi.org/10.3390/ijms12053117>. Acesso em: 28/05/2018

FITZGIBBONS, T.P; KOGAN, S.; AOUADI, M.; HENDRICKS, G.M; STRAUBHAAR. J.; CZECH, M.P. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. **American**

Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, Oct. 2011. Disponível em: < https://doi.org/10.1152/ajpheart.00376.2011>. Acesso em: 28/05/2018

FLIER, J.S.; COOK, K.S.; USHER, P.; SPIEGELMAN, B.M. Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. **Science,** July 1987. Disponível em: < https://doi.org/10.1126/science.3299706>. Acesso em:2/05/2018

FONSECA-ALANIS, M.H; et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Jan. 2006. Disponível em: <https:/doi.org/10.1590/S0004-27302006000200008>. Acesso em: 28/05/2018

FUJISAKA, S.; USUI, I.; BUKHARI, A.; et al. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. **American Diabetes Association**, Nov. 2009. Disponível em: < https://doi.org/10.2337/db08-1475>. Acesso em: 28/05/2018

GALIC, S.; FULLERTON, M.D; SCHERTZER, J.D; et al. Hematopoietic AMPK β1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, Nov. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI58577>. Acesso em: 28/05/2018

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ A.; GROSS M.S; et al. C57BL/6J and A/J Mice Fed a High- fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity**, Aug. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/oby.2007.238>. Acesso em: 28/05/2018

GAO Y.J; et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. **Cardiovascular Research**, July 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.03.013>. Acesso em: 28/05/2018

GIL-ORTEGA, M.; CONDEZO-HOYOS, L.; GARCÍA-PRIETO, C. F.; ARRIBAS, S. M.; GONZÁLEZ, M. C.; ARANGUEZ, I.; et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates longterm high-fat diet-derived endothelial dysfunction. **PLOS One**, April 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095312>. Acesso em: 28/05/2018

GOLLASH, M.; DUBROVSKA, G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. **Trends in Pharmacological Sciences**, Dec. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.005>. Acesso em: 08/05/2018

GOTOH, K.; et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. **Diabetes.** Aug. 2012. Disponível em: < https://doi.org/10.2337/db11-1688>. Acesso em: 08/05/2018

_____. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **Journal of Neurochemistry**, Mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07617.x>. Acesso em: 08/05/2018

_____. Spleen-derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. **PLOS One**, Dec. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053154>. Acesso em: 08/05/2018

GREENSTEIN, A.S.; KHAVANDI, K.; WITHERS, S.B.; SONOYAMA, K.; CLANCY, O.; JEZIORSKA, M.; et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective. **Circulation Research**, Mar. 2009. Disponível em: <>. Acesso em: 18/04/2018

GUSTAFSON, B. Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, April 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.5551/jat.3939>. Acesso em: 18/04/2018

GUZIK, T.J., MARVAR, P.J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., KORBUT, R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. **Journal of physiology and pharmacology**, Dec. 2007. Disponível em: <http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_07/pdf/591_12_07_article.pdf>. Acesso em: 18/04/2018

GUZIK, B.; SAGAN, A.; LUDEW, D.; MROWIECKI, W.; CHWAŁA, M.; BUJAK-GIZYCKA, B.; et al. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms–association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. **International Journal of Cardiology**, Oct. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.278>. Acesso em: 18/04/2018

HARDIE, D.G. Adenosine monophosphate-activated protein kinase: a central regulator of metabolism with roles in diabetes, cancer, and viral infection. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Nov. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010819>. Acesso em: 5/04/2018

HASHIMOTO, C.M. Tratamento crônico com losartana corrige a disfunção do tecido adiposo perivascular em camundongos obesos. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-19012017-145956/pt-br.php>. Acesso em: 5/04/2018

HAWLEY, S.A.; DAVISON M.; WOODS A.; DAVIES S.P.; BERI R.K.; CARLING D.; et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, Nov. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27879>. Acesso em: 5/04/2018

HENRICHOT, E.; et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dec. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000188508.40052.35>. Acesso em: 5/04/2018

HUANG, F.; LEZAMA, M.A.R.; ONTIVEROS, J.A.P; BRAVO, G.; VILLAFAÑA, S.; DEL-RIO-NAVARRO, B.E.; HONG, E. Effect of losartan on vascular function in fructose-fed rats: the role of perivascular adipose tissue. **Clinical and Experimental Hypertension**, Jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10641960902993129>. Acesso em:

IKEOKA, D.; MADER, J.K.; PIEBER, T. Adiposo tissue, inflammation and carviovascular disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Jan. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302010000100026>. Acesso em: 5/04/2018

INADA, A.C. Avaliação dos Componentes do Sistema Renina-Angiotensina no Tecido Adiposo Perivascular de Camundongos Obesos Induzidos por Dieta Hiperlipídica. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-12082016-173130/publico/AlineCarlaInada_Mestrado_P.pdf>. Acesso em: 16/05/2018

INOUE, M.; GOTOH, K.; SEIKE, M.; MASAKI, T.; HONDA, K.; KAKUMA, T.; YOSHIMATSU, H. Role of the spleen in the development of steatohepatitis in high-fat-diet-induced obese rats. **Experimental Biology and Medicine**, Apr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011230>. Acesso em: 16/05/2018

JØRGENSEN, S. B.; VIOLLET, B.; ANDREELLI, F.; FRØSIG, C.; BIRK, J. B.; SCHJERLING, P.; et al. Knockout of the a2 but Not a1 5′-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-b-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle.

Journal of Biological Chemistry, Jan. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M306205200>. Acesso em: 16/05/2018

KETONEN, J.; SHI, J.; MARTONEN, E.; MERVAALA, E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. **Circulation Research**, July 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-09-0661>. Acesso em: 16/05/2018

KOBAYASI R.; et al. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. **Journal of Hypertension**, Oct. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833ca68c>. Acesso em: 16/05/2018

LEAL, V.O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Chinica Chimica Acta**, Apr. 2013. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.003>. Acesso em: 16/05/2018

LEON, C.M.; BARBOSA, C.M.; JUSTO, G.Z.; BORELLI, P.; RESENDE, Jr, J.D.; DE OLIVEIRA, J.S.; et al. Requirement for PLCgamma2 in IL-3 and GM-CSF-stimulated MEK/ERK phos-phorylation in murine and human hematopoietic stem/progenitor cells. **Journal of Cellular Physiology**, July 2011. Disponível em: < https://doi.org/10.1002/jcp.22507>. Acesso em: 22/06/2018

LIHN, A.S.; PEDERSEN, S.B.; LUND, S.; RICHELSEN, B. The anti-diabetic AMPK activator AICAR reduces IL-6 and IL-8 in human adipose tissue and skeletal muscle cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Sep. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.004>. Acesso em: 22/06/2018

LIN, S.; THOMAS, T.C.; STORLIEN, L.H.; HUANG, X.F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **International Journal of Obesity**, May 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849588>. Acesso em: 22/06/2018

LUMENG, C.N.; DEL PROPOSTO, J.B.; WESTCOTT, D.J.; SALTIEL, A.R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, Dec. 2008. Disponível em: < https://doi.org/10.2337/db08-0872>. Acesso em: 22/06/2018

MA, L.; et al. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hypertension Research**, May 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/hr.2010.11>. Acesso em: 22/06/2018

MAENHAUT, N.; VAN DE VOORDE, J. Regulation of vascular tone by adipocytes. **BMC Medicine**, March 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-25>. Acesso em: 22/06/2018

MARCHESI, C.; EBRAHIMIAN, T.; ANGULO, O.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E.L. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. **Hypertension Research**, Dec. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138305>. Acesso em: 22/06/2018

MIAO, C. Y.; LI, Z.Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. **British Journal of Pharmacology**, Feb. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01404.x>. Acesso em: 22/06/2018

MORITA N.; HOSAKA T.; KITAHARA A.; et al. Novel Mechanisms Modulating Palmitate-Induced Inflammatory Factors in Hypertrophied 3T3-L1 Adipocytes by AMPK. **Journal of Diabetes Research**, Jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/9256482>. Acesso em: 22/06/2018

NAGATA, D., HIRATA, Y. The role of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. **Hypertension Research**, Jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/hr.2009.187>. Aceeso em: 12/06/2018

NAMMI, S.; KOKA, S.; CHINNALA, K.M.; BOINI, K.M. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. **Nutrition Journal**, Apr. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-3>. Acesso em: 12/06/2018

NATH, N.; KHAN, M.; RATTAN, R.; et al. Loss of AMPK exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis disease severity. **Biochemical and biophysical research communications**, Aug. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.106>. Acesso em: 12/06/2018

NEGRÃO, A.B.; LICINIO, J. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, June 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302000000300004>. Acesso em: 12/06/2018

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M., ETO, K.; YAMASHITA, H.; et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, Aug. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.1964>. Acesso em: 12/06/2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Obesity and Overweight. **WHO - World Health Organization**, Feb. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 12/06/2018

_____. Body mass index (BMI) classification. WHO - **World Health Organization**, June 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html/2004>. Acesso em: 12/06/2018

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, Feb. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri2921>. Acesso em: 12/06/2018

PFEIFER, A.; HOFFMANN, L. S. Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124346>. Acesso em: 12/06/2018

PINDJAKOVA, J.; SARTINI, C.; LO RE, O.; et al. Gut Dysbiosis and Adaptive Immune Response in Diet-induced Obesity vs. Systemic Inflammation. **Frontiers in Microbiology**, June 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01157>. Acesso em: 12/06/2018

POLICE, S.B.; THATCHER, S.E.; CHARNIGO, R.; DAUGHTERY, A.; CASSIS, L.A. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II – induced abdominal aortic aneurysm. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Oct. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.192658>. Acesso em: 12/06/2018

PRIEUR, X.; MOK, C.Y.; VELAGAPUDI, V.R.; NÚÑEZ, V.; FUENTES, L.; MONTANER, D.; ISHIKAWA, K.; CAMACHO, A.; BARBARROJA, N.; O'RAHILLY, S.; SETHI, J.K.; DOPAZO, J.; OREŠIČ, M.; RICOTE, M.; VIDAL-PUIG, A. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. **Diabetes**. Mar. 2011. Disponível em: < ttps://doi.org/10.2337/db10-0705>. Acesso em: 02/06/2018

RAJSHEKER, S.; MANKA, D.; BLOMKALNS, A.L.; CHATERJEE, T.K.; STOLL, L.L.; WEINTRAUB, N.L. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. **Current Opinion in Pharmacology**, Apr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.005>. Acesso em: 22/06/2018

RASMUSSEN, J.W.; TAM, J.W.; OKAN, N.A.; et al. Phenotypic, Morphological, and Functional Heterogeneity of Splenic Immature Myeloid Cells in the Host Response to Tularemia. **Infection and Immunity**, July 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00365-12>. Acesso em: 12/06/2018

RASOULI, N.; et al. Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. Diabetes, Diabetes, Obesity and Metabolism, Jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00590.x>. Acesso em: 12/06/2018

REBOLLEDO, A.; REBOLLEDO, O.R.; MARRA, C.A.; GARCIA, M.E.; ROLDAN-PALOMO, A.R.; RIMORINI L.; et al. (2010). Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. **Cardiovascular Diabetology**, Oct. 2010. Disponível em: <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-9-65>. Acesso em: 12/06/2018

SAG, D.; CARLING, D.; STOUT, R.D.; SUTTLES, J. Adenosine 5′-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. **Journal of Immunology**, Dec. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8633>. Acesso em:12/06/2018

SAKATA, N.; YOSHIMATSU, G.; KODAMA, S. The Spleen as an Optimal Site for Islet Transplantation and a Source of Mesenchymal Stem Cells. International **Journal of Molecular Sciences**, May 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/5/1391>. Acesso em: 12/06/2018

SCHROETER, M.R.; ESCHHOLZ, N.; HERZBERG, S.; JERCHEL, I.; LEIFHEIT-NESTLER, M.; CZEPLUCH, F.S.; et al. Leptin-dependent and leptinindependent paracrine effects of perivascular adipose tissue on neointima formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, May 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301393>. Acesso em: 12/06/2018

SKIBA, D.S.; NOSALSKI, R.; MIKOLAJCZYK, T.P.; SIEDLINSKI, M.; RIOS, F.J.; MONTEZANO, A.C.; et al. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, Nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13685>. Acesso em: 12/06/2018

NOGUEIRA-PEDRO, A.; BARBOSA, C.M.; SEGRETO, H.R.; LUNGATO, L.; D'ALMEIDA, V.; MORAES, A.A.; et al. α-Tocopherol induces hematopoietic stem/progenitor cell expansion and ERK1/2-mediated differentiation. **Journal of Leukocyte Biology**, Dec 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.0611282>. Acesso em: 12/06/2018

Soltis, E.E.; Cassis, L.A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. Clinical and Experimental Hypertension. **Part A: Theory and Practice**, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065467>. Acesso em: 12/06/2018

SPEAKMAN, J.; et al. Overview of Animal Models of obesity. **Current Protocols in Pharmacology**, Sep. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0561s58>. Acesso em: 12/06/2018

SWIRSKI, F.K.; et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. **Science**, July 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1175202>. Acesso em: 12/06/2018

SZASZ, T.; WEBB, R.C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clinical Science**, Jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CS20110151>. Acesso em: 12/06/2018

TARANTINO, G.; SAVASTANO, S.; CAPONE, D.; COLAO, A. Spleen: A new role for an old player? **World Journal of Gastroenterology**, Sep. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i33.3776>. Acesso em: 28/05/2018

TRAYHURN, P. The biology of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, Feb. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/PNS2004406>. Acesso em: 28/05/2018

TROTTIER, M.D.; et al. Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, May 2012. Disponível em: < https://doi.org/10.1073/pnas.1205129109 >. Acesso em: 28/05/2018

UEDA, Y.; KONDO, M.; KELSOE, G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**, June 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20041419>. Acesso em: 28/05/2018

VÁZQUEZ-VELA, F.M.E.; TORRES, N.; TOVAR, A.R. White adipose tissue as an endocrine organ and its role in obesity. **Archives of Medical Research**, Nov. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.09.005>. Acesso em: 28/05/2018

VOORDE, J.V.; BOYDENS, C.; PAUWELS, B.; DECALUWÉ, K. Perivascular adipose tissue, inflammation and vascular dysfunction in obesity. **Current Vascular Pharmacology**, May 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570161112666140423220628>. Acesso em: 28/05/2018

WALDÉN, T.B.; HANSEN, .IR.; TIMMONS, J.A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, brite, and white adipose tissues. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, Jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011>. Acesso em: 28/05/2018

WANG, B.; SUN, J.; LI, X.; ZHOU, Q.; BAI, J.; SHI, Y.; LE, G. Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress, and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity. **Nutrition Research**, Nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.07.016>. Acesso em: 28/05/2018

WANG, J.; MA, A.; ZHAO, M.; ZHU, H. AMPK activation reduces the number of atheromata macrophages in ApoE deficient mice. **Atherosclerosis**, Mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.036>. Acesso em: 28/05/2018

WANG, Y.; et al. A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence. **Cancer, Causes & Control**, Sep. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9141-x>. Acesso: 28/05/2018

WILDING, J.P. Leptin and the control of obesity. **Current Opinion in Pharmacology**, Dec. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00111-4>. Acesso em: 28/05/2018

WU, D.; DAWSON, N.A.; LEVINGS, M.K. Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation and Transplantation. **American Journal of Transplantation**, Mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ajt.13578>. Acesso em: 28/05/2018

WU, L.; PAREKH, V.V.; GABRIEL, C.L.; BRACY, D.P.; MARKS-SHULMAN, P.A.; TAMBOLI, R.A.; KIM, S.; MENDEZ-FERNANDEZ, Y.V.; BESRA, G.S.; LOMENICK, J.P.; WILLIAMS, B.; WASSERMAN, D.H.; VAN KAER. L.

Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, May 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1200498109>. Acesso em: 28/05/2018

WU, L.; PAREKH, V.V.; HSIAO, J.; KITAMURA, D.; VAN KAER, L. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Oct. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1324052111>. Acesso em: 28/05/2018

YANG, Z.; KAHN, B.B.; SHI, H.; XUE, B.Z. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. **Journal of Biological Chemistry**, June 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123620>. Acesso em: 28/05/2018

ZHANG Y.Y.; et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature,** Dec 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/372425a0>. Acesso em: 28/05/2018

ZRAIKA, S.; DUNLOP, M.; PROIETTO, J.; ANDRIKOPOULOS, S. Effects of free fatty acids on insulin secretion in obesity. **Obesity Reviews**, May 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1467-789X.2002.00062.x>. Acesso em: 28/05/2018