

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E DETECÇÃO DE TNF-  $\alpha$  EM  
TECIDO ADIPOSEO VISCERAL DE RATOS *WISTAR* COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

BIANCA DAMÁSIO PEREIRA DANTAS SALVIANO

NATAL/RN

2017

BIANCA DAMÁSIO PEREIRA DANTAS SALVIANO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E DETECÇÃO DE TNF-  $\alpha$  EM  
TECIDO ADIPOSEO VISCERAL DE RATOS WISTAR COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

*Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito final para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.*

*Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Ana Heloneida de Araújo Morais*

*Co-Orientadora: Mestranda Nutricionista Anna Beatriz Santana Luz*

NATAL-RN

2017

BIANCA DAMÁSIO PEREIRA DANTAS SALVIANO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E DETECÇÃO DE TNF-  $\alpha$  EM  
TECIDO ADIPOSEO VISCERAL DE RATOS *WISTAR* COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Nutrição da  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito final para obtenção do grau de  
Nutricionista.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Ana Heloneida de Araújo Moraes

---

Nutricionista Anna Beatriz Santana Luz

---

Prof. Dra. Bruna Leal Lima Maciel

Natal, 04 de dezembro 2017.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela vida e pela oportunidade de aprender profundamente sobre uma área de extrema importância para a manutenção da saúde: a Nutrição. Aos mestres do curso de Nutrição da Universidade do Rio Grande do Norte, capazes de nos transmitir o conhecimento com tanta dedicação.

À professora Dra. Ana Heloneida, sempre prestativa, atenciosa e eficiente nas correções desta monografia. Obrigada ainda, pelos cuidados diários, pela generosidade e pelo carinho. Agradeço a Co-orientadora deste trabalho, a mestranda Anna Beatriz, pela proatividade e pelo apoio, estando ao meu lado nos momentos que mais precisei. Obrigada ainda pelas contribuições científicas e por aceitar ao convite de fazer parte desta banca, à professora Dra. Bruna Leal.

Gostaria de agradecer à minha família, minhas irmãs, Aline, Érika e Sophia pela parceria de sempre, aos meus amados pais, Verônica e Belarmino que me guiaram com tanto empenho, pelos caminhos do bem e sempre me deram uma educação digna para que chegasse até aqui.

Obrigada aos amigos e colegas que estiveram ao meu lado nos momentos de aprendizado desde o primeiro de curso, enfrentando provas, leituras e longas horas de estudo.

Obrigada ao meu amado esposo, Fellipe Salviano, que graças ao seu exemplo diário em busca pela excelência – além do amor incondicional à medicina - me inspirou e me apoiou a traçar novos caminhos ao ingressar em uma nova graduação. Obrigada ao meu filho Joaquim, que carrego no ventre, que graças ao amor indescritível que sinto, já me faz querer ser uma pessoa melhor, mais humana e uma excelente profissional.

SALVIANO, Bianca Damásio Pereira Dantas Salviano. **Análise morfológica e detecção de tnf-  $\alpha$  em tecido adiposo visceral de ratos *wistar* com obesidade induzida por dieta.** 2017. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

## RESUMO

Fatores como a adoção de um novo padrão dietético, maior oferta de alimentos e principalmente o aumento do consumo das dietas "ocidentais" combinado ao sedentarismo e mudança do estilo de vida, vêm contribuindo para o rápido aumento da prevalência global da obesidade. Diante disso, a padronização de uma dieta para indução da obesidade e seus efeitos aliados se faz necessária para buscar compreender suas vias de atuação. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de uma dieta com alto teor de carboidrato simples sobre fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e alterações morfológicas no tecido adiposo visceral em modelo animal. Utilizou-se ratos machos da linhagem *Wistar*, (n=10), divididos em dois grupos, chamados de controle e experimental. Ao primeiro, foi ofertada a dieta padrão Labina®, e ao segundo, a dieta experimental (HGLI), ambas *ad libitum*, por 17 semanas. Foi coletado após as 17 semanas o tecido adiposo visceral perirenal, retroperitoneal e epididimal para que fosse realizada sua avaliação morfológica, assim como, para detectar TNF- $\alpha$ . Os ratos alimentados com a dieta experimental apresentaram quanto à análise morfológica, hipertrofia, maior coalescência, extravasamento de plasma; e intensa marcação de TNF- $\alpha$  nos adipócitos após a análise imunohistoquímica. Dessa forma, a dieta HGLI foi capaz de provocar alterações no tecido adiposo visceral, mostrando-se eficiente para estudos da fisiopatologia que envolvem complicações associadas à obesidade, sendo um modelo de dieta próximo da gênese da obesidade em humanos.

**Palavras-chave: Inflamação; índice glicêmico; carga glicêmica; adipócitos.**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
3.1 DIETA EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS .....	10
<b>3.1.1 Carboidratos e seus efeitos na resposta glicêmica</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.2 Macronutrientes em dietas</b> .....	<b>12</b>
3.2 OBESIDADE.....	13
<b>3.2.1 Modelo animal de obesidade</b> .....	<b>15</b>
3.3 GORDURA CORPORAL .....	16
<b>3.3.1 Atividade inflamatória do tecido adiposo</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.2 Distribuição da gordura corporal</b> .....	<b>18</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
4.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL .....	20
4.2 DIETAS .....	20
4.3 COLETA DE TECIDO ADIPOSEO E ANÁLISES .....	21
<b>4.3.1 Anestesia e eutanásia</b> .....	<b>21</b>
<b>4.3.2 Análise morfológica do tecido adiposo visceral</b> .....	<b>21</b>
<b>4.3.3 Imunohistoquímica de TNF-<math>\alpha</math> em tecido adiposo visceral</b> .....	<b>21</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL DE RATOS APÓS INGESTÃO DE DIETA HGLI E PADRÃO. ....	23
5.2. DETECÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA DE TNF- $\alpha$ DE ANIMAIS APÓS INGESTÃO DE DIETA HGLI E PADRÃO .....	23
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

Fatores como a adoção de um novo padrão dietético, maior oferta de alimentos e principalmente o aumento do consumo das dietas "ocidentais" (alimentos refinados, açúcares, gorduras saturadas e similares) combinado ao sedentarismo e mudança do estilo de vida, vem contribuindo para o rápido aumento da prevalência da obesidade mundial (WHO, 2013). A obesidade é definida como o acúmulo em excesso de massa gorda e conseqüentemente está associada a diversos problemas de saúde como: resistência insulínica (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (CAMPBELL; SENIOR; BELL-ANDERSON, 2017).

Estudos relacionados às causas e conseqüências da obesidade em humanos apresentam limitações éticas, por esse motivo, modelos experimentais têm sido utilizados para investigar essa temática (CASTRO *et al.*, 2015), permitindo conhecer melhor as vias pelas quais a obesidade induz as disfunções fisiológicas. Existem diferentes modelos envolvendo animais, dentre eles, os que desenvolvem a obesidade a partir de mutações genéticas e os que são submetidos a indução via consumo de alimentos altamente palatáveis e com alto valor energético. Todavia, considerando que o modelo deve ser o mais próximo possível da gênese da obesidade em humanos, a indução da obesidade por meio do consumo alimentar parecer ser a mais adequada (ROSSINI *et al.*, 2012).

Nesse contexto, destaca-se que a linhagem *Wistar* é indicada para ser utilizada em modelos de obesidade induzida por dieta (DIO) visando melhor compreender os mecanismos e as alterações associadas (SILVA *et al.*, 2000), principalmente por ser uma espécie heterogênea de alta representatividade (NAKANISHI *et al.*, 2015). Entretanto, vale ressaltar, que estudos avaliando parâmetros inflamatórios como fator de necrose tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) são em sua grande maioria realizados em camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MASI *et al.*, 2017), sendo escassa a avaliação com a linhagem *Wistar*.

Além disso, a padronização de uma dieta para indução da obesidade e seus efeitos aliados se faz necessária para buscar compreender vias de atuação, assim como, buscar soluções para sanar tal problemática. A seleção da dieta é de extrema importância, pela capacidade dela desencadear diferentes respostas metabólicas. No estudo de Bortolin *et al.* (2017) foi observado que ratos *Wistar* que consumiram diferentes dietas, exibiram fenótipos divergentes.



Diante do exposto e em razão do envolvimento do tecido adiposo (TA) nas disfunções relacionadas à obesidade, aliado à importância que adquiriu nos últimos tempos, esse passou a ser considerado um órgão central de controle metabólico (ALANIZ *et al.*, 2007). O TA atua sobre uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo ingestão alimentar, metabolismo energético, termogênese, função neuroendócrina, resposta imunológica e função cardiovascular (KERSAHAW; FLIER, 2004). Portanto, avaliar os impactos de uma dieta nesse tecido é de grande relevância.

É importante evidenciar que, este estudo faz parte de um grande trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa Nutrição e Substâncias Bioativas para saúde (NutriSBioativoS), o qual avaliou o efeito de uma dieta com alto teor de carboidratos simples, (CARVALHO *et al.*, 2017) e que foi capaz de ocasionar aumento da glicemia em jejum (SANTOS J. P. S., 2016), triglicérides (SANTOS J. H., 2016) e VLDL no plasma (SILVA, 2016). Entretanto, ainda não avaliou-se o impacto dessa dieta quanto à marcação de TNF- $\alpha$  e análise morfológica do tecido adiposo visceral. Acrescenta-se que também sobre o efeito dessa dieta estão em andamento estudos relacionados à concentração plasmática e expressão gênica de TNF- $\alpha$ , além das avaliações estereológicas e índice de adiposidade do tecido visceral todos em ratos *Wistar*.

Sendo assim, o estudo em questão pretende avaliar os efeitos de uma dieta com alto teor de carboidrato simples sobre TNF- $\alpha$  e alterações histológicas no tecido adiposo visceral em ratos da linhagem *Wistar*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de TNF-  $\alpha$  e estrutura de adipócitos do tecido adiposo visceral em ratos *Wistar* com obesidade induzida por dieta experimental.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise morfológica do tecido adiposo visceral de ratos *Wistar*.
- Investigar imunomarcção de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo visceral desses animais.
- Comparar os resultados entre os animais alimentados com uma dieta padrão e a dieta experimental.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DIETAS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS

Modificações expressivas nos hábitos alimentares, durante esse século, têm sido marcadas pelo aumento do conteúdo de lipídios na dieta, que é geralmente tido como um contribuinte significativo no aumento da incidência da obesidade (FLATT; TREMBLAY, 1998). Entretanto, além dos lipídios, o maior conteúdo de carboidratos na dieta, principalmente na forma simples, representa também um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade (BAYOL *et al.*, 2010).

A preocupação com o aumento da obesidade no mundo moderno, assim como, os mecanismos envolvidos nessa problemática não é algo recente. Campfield (1983) em seu estudo já abordava a obesidade e suas implicações adversas à saúde da população, levando pesquisadores buscarem esclarecer os mecanismos envolvidos no controle de peso corporal, utilizando-se, principalmente, de modelos experimentais animais. Ademais, estudos eficazes sobre as consequências da obesidade em humanos têm limitações éticas, por essa razão, modelos de dietas experimentais têm sido utilizadas para estudar a obesidade e doenças associadas (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Por conseguinte, um modelo dietético interessante, por desencadear uma obesidade semelhante à humana é a dieta de cafeteria. Essa dieta tem como característica a alta palatabilidade, sendo composta por alimentos industrializados, com alto valor calórico, apresentando um elevado teor de carboidratos, contendo em sua composição, principalmente, carboidratos simples, provenientes do uso de cereais refinados, grandes quantidades de gordura, principalmente gorduras saturadas ou trans e baixo teor de proteínas, fibras alimentares e micronutrientes (ALMEIDA *et al.*, 2008; BAYOL *et al.*, 2010).

Em vista disso, o consumo regular de uma dieta rica em gordura e carboidratos refinados, tal como a dieta típica da cafeteria contribui para a hiperfagia e obesidade, bem como outros problemas de saúde, consequências relacionadas à obesidade, como RI, hiperglicemia, dislipidemia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e hipertensão arterial sistêmica (MACEDO *et al.*, 2012).

Sendo assim, o grupo de pesquisa NutriSBioativoS desenvolveu um modelo de dieta experimental com alto teor de carboidratos simples, sendo essa composta de uma mistura de ração comercial e alimentos fontes de carboidratos, apresentando alto índice glicêmico (77,6) e alta carga glicêmica (38,8), denominada dieta de alto índice glicêmico e alta carga glicêmica

(HGLI). No estudo de Carvalho *et al.* (2017) ratos *Wistar* machos (n=10) foram divididos em grupo controle (n=5) e grupo experimental (n=5), os ratos do grupo controle foram alimentados com a ração padrão Labina® enquanto que o grupo experimental recebeu a dieta experimental HGLI durante 17 semanas. A dieta HGLI ofertada ao grupo experimental foi capaz de provocar aumento da glicemia em jejum, triglicerídeos e VLDL no plasma, além de gerar uma maior expressão gênica de PPAR $\gamma$  no tecido adiposo desses animais. Esse estudo reúne quatro Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) do curso de Nutrição da UFRN.

Dessa forma, devido à similaridade alimentar das dietas experimentais existentes oferecidas a animais com as adotadas atualmente pela população, destaca-se a importância da utilização desses modelos dietéticos como uma ferramenta útil para averiguar as mais diversas alterações metabólicas que podem ser causadas por essas dietas em seres humanos (CASTRO *et al.*, 2015).

### **3.1.1 Carboidratos e seus efeitos na resposta glicêmica**

A dieta de cafeteria de caráter hiperglicídico é caracterizada por oferecer um percentual de carboidrato superior às dietas ditas balanceadas, apresentando frequentemente mais que 65% do Valor Energético Total (VET) (CABALLERO *et al.*, 2013).

Carboidratos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, sendo as biomoléculas mais abundantes na natureza e o principal elemento da dieta em muitas partes do mundo. Esses elementos são divididos em três classes principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, conforme a quantidade de unidades poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas. Como exemplo, os monossacarídeos que constituem o tipo mais simples de carboidrato, possuem apenas uma unidade (glicose, frutose); os oligossacarídeos são cadeias curtas de até 10 monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, tendo como principal grupo os dissacarídeos (sacarose, maltose); já os polissacarídeos, os açúcares mais complexos, são polímeros de açúcar que contém mais de 20 unidades de monossacarídeos (glicogênio, amido) (NELSON; COX, 2014).

Logo após uma refeição, alimentos ricos em carboidratos apresentam efeitos diferenciados em relação à liberação da glicose e a promoção de respostas hormonais (BJÖRCK *et al.*, 1994). Os carboidratos da dieta apresentam diferentes composições químicas (por exemplo, açúcares - simples e polissacarídeos - complexos) e de acordo com suas estruturas físicas podem (ou não) ser digeridos e absorvidos no intestino delgado humano de diversas

formas e, conseqüentemente, dão origem a diferentes respostas à glicose (resposta glicêmica) (LEEDS, 2002). Além disso, outros fatores influenciam na resposta glicêmica, tais como: quantidade de carboidrato presente no alimento, natureza do amido (teores de amilose e amilopectina e de amido resistente), natureza dos monossacarídeos, grau de cozimento e de processamento do alimento, interação amido-nutriente, teor de lipídeos, proteínas e fibra alimentar, além dos efeitos fisiológicos e bioquímicos da mastigação, do esvaziamento gástrico e da absorção (JENKINS *et al.*, 1981).

Portanto, devido ao fato de o organismo não digerir e nem absorver todos os carboidratos com a mesma velocidade, o índice glicêmico (IG) foi desenvolvido para avaliar o efeito dos carboidratos sobre a glicose sanguínea. O IG foi conceituado como o aumento da área sob a curva da resposta glicêmica produzida por um determinado alimento, em relação à mesma quantidade de carboidrato disponível de um produto padrão (pão branco ou glicose). Dessa forma, é possível classificar os alimentos de acordo com seu potencial em elevar a glicemia, em relação a um alimento controle (JENKINS *et al.*, 1981). Já a carga glicêmica (CG), mede o impacto glicêmico da dieta, sendo calculado pelo produto do IG do alimento pela quantidade de carboidrato, contida na porção consumida do alimento (SALMERON *et al.*, 1997).

### 3.1.2 Macronutrientes em dietas

Os macronutrientes são compostos químicos ingeridos em alta quantidade, esses atuam como fontes de energia para o corpo. De acordo com as recomendações a ingestão calórica total deve ser dividida pelo percentual de ingestão de macronutrientes, variando conforme a organização e diretriz a ser seguida. Conforme a *Dietary Reference Intakes* (DRI), recomenda-se no geral as seguintes ingestões: 10 a 35 % de proteína; 20 a 35 % de lipídeo; 45 a 65 % de carboidrato (IOM, 2002). Já para a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde, (FAO/OMS) a faixa estabelecida para o consumo de proteína em relação à energia é de 10 a 35%; lipídios de 15 a 30% e carboidratos de 55 a 75%, (WHO, 2003), destacando-se os carboidratos como o macronutriente de maior faixa de recomendação, sendo assim, de grande importância para nossa alimentação.

Segundo as Recomendações da DRI do *National Research Council Subcommittee* de 1989, em uma dieta equilibrada os carboidratos devem representar a maior parte da ingestão energética. Mesmo sendo pequenas as reservas de glicogênio do organismo

(MAUGHAN; BURKE, 2004), elas são importantes durante o período de jejum e também durante a situação de exercício prolongado, na qual a glicose e os ácidos graxos são oxidados para fornecer energia para a contração muscular (LIEBMAN; WILKINSON, 2002).

Entretanto, existe uma preocupação quanto ao consumo em excesso dos carboidratos, já que as taxas de doenças cardiovasculares, DM2 e obesidade têm aumentado em pessoas que consomem dietas ricas em energia na forma de carboidratos simples, quando comparado aos grãos integrais. Isso deve-se ao fato de influenciarem no IG. O IG é influenciado por diversos fatores, tais como: estrutura do amido, conteúdo de fibras, processamento dos alimentos e estrutura física de outros macronutrientes da refeição. O alto IG estimula a lipogênese, acarretando o aumento do tamanho dos adipócitos, enquanto dietas com baixo IG inibem esta resposta. Logo, carboidratos com alto IG estão associados a o aumento do risco de doenças cardiovasculares, DM2 e obesidade (MORRIS; ZEMEL, 1999).

Além disso, em estudos realizados com animais têm sido observado que a taxa de oxidação de carboidratos e lipídios na dieta pode interferir na composição corporal. Estudos envolvendo dietas isoenergéticas com conteúdo distinto de lipídios evidenciaram que, quanto maior o seu consumo, maior o ganho de peso (ROBERTS, 1995).

### 3.2 OBESIDADE

Obesidade é definida como o excesso de gordura corporal, resultado direto do balanço energético positivo, em que o consumo de energia é maior que o gasto da mesma. Esse desbalanço tem causa multifatorial, com uma forte associação entre bagagem genética e exposição a um ambiente obesogênico (vida sedentária, atividades físicas inadequadas, oferta mais fácil de alimentos e alimentos refinados com alto índice glicêmico), dentre outros fatores (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013). Com a evolução rápida das dietas refinadas e maior oferta dos alimentos, associado a uma lenta evolução do organismo humano, houve um aumento da incidência da obesidade nas últimas décadas, tornando-se uma enorme pandemia, com prejuízos à saúde e economia das nações. É importante lembrar que a obesidade não caminha sozinha, pois ela acarreta diversas doenças crônicas, algumas delas incapacitantes, outras letais como o câncer (BRAY *et al.*, 2016).

O consenso bariátrico brasileiro de 2008 refere a obesidade como uma alteração corporal resultante desse desbalanço supracitado. Entretanto, na prática clínica, essa alteração corporal não é medida de rotina e o diagnóstico da obesidade é mais

dependente do índice de massa corpórea (IMC), medida da razão do peso sobre a altura ao quadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Apesar de não ser o melhor método de diagnóstico, já que não diferencia entre massa magra e gordura corporal, por sua praticidade e rápida difusão no meio científico, tornou-se padrão de diagnóstico e rastreio de obesidade. Há uma forte correlação entre o aumento do IMC e morbi-mortalidade.

Ainda sobre esse índice, ele é usado para classificar o peso em subtipos: IMC  $< 18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$ : baixo peso; IMC entre  $18,5$  e  $24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ : peso normal; entre  $25$  e  $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ : sobrepeso;  $30 - 34,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ : obesidade classe I; entre  $35$  e  $39,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ : obesidade classe II; por fim, IMC acima de  $40 \text{ kg}/\text{m}^2$ , obesidade classe III ou obesidade mórbida. Tal diferenciação em subtipos é importante por guiar os tratamentos conforme cada classe (JENSEN *et al.*, 2014). Outra ferramenta importante no diagnóstico da obesidade é a perímetro abdominal, principalmente usada para IMC menor que  $35 \text{ kg}/\text{m}^2$ . Há fortes evidências demonstrando que o aumento do perímetro abdominal está associado ao aumento risco cardiovascular. Como o IMC não é capaz de distinguir qual o tipo de compartimento é mais afetado com a deposição de gordura, a ferramenta do perímetro abdominal é um importante adjuvante nesse diagnóstico e na estimativa de risco cardiovascular (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013).

O tratamento da obesidade é multifatorial e tem o IMC como um norteador de condutas. A principal intervenção e considerada como pedra angular na terapêutica é a mudança de estilo de vida, que engloba treinamento comportamental, exercício físico e dieta. Há também o tratamento farmacológico, com drogas apresentando mecanismos de ação diversos, com o intuito de aumentar o gasto ou diminuir o consumo energético. E na falha do tratamento clínico e/ou farmacológico, há o tratamento cirúrgico, chamado de cirurgia bariátrica. Tem indicação para IMC maior que  $35 \text{ kg}/\text{m}^2$  associado a comorbidades, ou para IMC superior a  $40 \text{ kg}/\text{m}^2$  mesmo sem comorbidades. Atualmente com as técnicas cirúrgicas minimamente invasivas (laparoscopia e robótica) tem baixos índices de complicação e seus resultados são superiores ao tratamento clínico, fato comprovado em trabalhos de grande relevância, tais como *Swedish Obese Subjects (SOS)* ou *STAMPEDE trial* (BRAY *et al.*, 2016).

### 3.2.1 Modelo animal de obesidade

O estudo dos mecanismos pelos quais a obesidade induz as disfunções fisiológicas pode ser facilitado com a utilização de modelo animal em ambiente de pesquisa. Existem diferentes modelos animais, geralmente roedores, que desenvolvem a obesidade a partir de mutações genéticas, como os ratos: ratazana endogâmica KK, ratos ob/ob, rato *Zucker*, entre outros. Entretanto, considerando que o modelo deve ser o mais próximo possível da gênese da obesidade em humanos, a indução dessa condição via consumo de alimentos altamente palatáveis e com alto valor energético parece ser o mais apropriado (ROSINI *et al.*, 2012).

A linhagem não-endogâmica *Wistar* (*Rattus norvegicus*), uma das mais utilizadas ao redor do mundo, é um atraente modelo para pesquisa por seu pequeno porte, seu ciclo biológico curto, baixo custo de criação e grau de similaridade genética com seres humanos. Aproximadamente, 80% de seu DNA é idêntico ao do homem. Isso permite que se extrapolem resultados científicos obtidos em ratos na estimativa de potenciais efeitos de tratamento em seres humanos (GIBBS *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm evidenciado a eficácia da ingestão de dietas hipercalóricas ou dietas hiperlipídicas na gênese da obesidade e de suas comorbidades. Os animais da linhagem *Wistar* são utilizados em estudos com DIO, e os resultados mostram que o peso corporal encontra-se aumentado. Ratos *Wistar* tratados com dieta hipercalórica e hiperlipídica durante três meses aumentaram aproximadamente 1,4 vez a massa corporal quando comparados com animais-controle (SILVA *et al.*, 2000).

No estudo de Bortolim *et al.* (2017), foram utilizados ratos *Wistar* machos e foram avaliadas diferentes dietas quanto à indução da obesidade durante um período de 18 semanas. Foi elaborada uma dieta baseada na dieta ocidental humana (WD) e comparou-a com a dieta da cafeteria (CAF) e dieta rica em gordura (HFD), a fim de avaliar qual a dieta mais refletia a obesidade humana. Os ratos alimentados com as quatro dietas diferentes exibiram fenótipos completamente diferentes, destacando a importância da seleção de dieta (BORTOLIN *et al.*, 2017). Além dos ratos da linhagem *Wistar* são utilizados também em DIO ratos *Sprague-Dawley*, *Long Evans* e *Osborne Mendel* (NILSSON *et al.*, 2012).

No que se refere aos estudos em modelo animal para avaliar TNF- $\alpha$ , a literatura é escassa quanto à utilização de ratos *Wistar* para tal análise. A maioria dos estudos são realizados em camundongos, sendo esses de linhagem consanguíneas, ou seja, são mais



homogêneos e portanto, não são tão representativos da população em geral como a linhagem *Wistar* (não consanguíneos) (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MASI *et al.*, 2017).

Ademais, outros fatores devem considerados no uso animal em experimentos, segundo Rosini *et al.* (2012), animais com idade e peso semelhantes no início do protocolo experimental apresentaram resultados diferentes quanto ao ganho de peso corporal. Em algumas investigações, verificou-se aumento no peso corporal (LÓPEZ *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2007) enquanto que em outras não (BURNEIKO *et al.*, 2006; ZAMBON *et al.*, 2009).

Portanto, mostra-se mais uma vez que além do tipo de dieta, outras questões podem influenciar na gênese da obesidade. No entanto, mesmo diante de algumas limitações, a utilização de DIO em animais tem se mostrado eficiente para o estudo da fisiopatologia das complicações associadas à obesidade, visto que é o modelo mais próximo da gênese da obesidade em humanos (ROSINI *et al.*, 2012).

### 3.3 GORDURA CORPORAL

A função principal do tecido adiposo é armazenar a gordura em condições de excesso de calorias, podendo essa ser liberada durante o jejum e privação de alimentos prolongada. Além disso, pode desempenhar o papel de termorregulação e proteção de órgãos mecânicos (TRAYHURN, 2013).

Nos últimos 20 anos, os pontos de vista sobre o tecido adiposo mudaram significativamente no momento em que esse tecido adiposo foi identificado como responsável pela síntese de leptina, sendo essa secretada para circulação. Dessa forma, o tecido adiposo passou a ser reconhecido como um órgão endócrino metabolicamente ativo e uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas com ações locais e /ou sistêmicas, as quais afetam uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo ingestão alimentar, metabolismo energético, termogênese, função neuroendócrina, angiogênese, reprodução, resposta imunológica e função cardiovascular (KERSAHAW; FLIER, 2004)

O tecido adiposo secreta um número enorme de fatores que estão envolvidos na modulação da RI (QATANANI; LAZAR, 2007) tais como, leptina e adiponectina, secretados pelos adipócitos, e muitas citocinas e quimiocinas, produzidas pelas células da fração estromavascular e pelos macrófagos residentes (TILG; MOSCHEN, 2006).

A elevação da massa adiposa que se dá na obesidade é determinada pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia). As modificações no

tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas, que são a lipogênese e lipólise (JENSEN, 1997). A adipogênese é caracterizada basicamente pela conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros, evento que tem sido descrito com bastante regularidade em vários modelos experimentais que utilizam roedores e que, quando exacerbado, leva a hiperplasia adiposa, relacionando-se diretamente com o surgimento da obesidade (GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998)

### 3.3.1 Atividade inflamatória do tecido adiposo

Como discutido anteriormente, o tecido adiposo é um órgão dinâmico, esse é responsável por secretar vários fatores denominados adipocinas. Tais adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas, direta ou indiretamente, a processos que contribuem para aterosclerose, hipertensão arterial, RI, DM2 e dislipidemias, ou seja, representam o elo entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (HOTAMISLIGIL, 2006; ARNER, 1995). Dentre elas, destacam-se o TNF- $\alpha$ , a interleucina-6 (IL-6), o inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1), a proteína-C reativa (PCR), a resistina, a proteína estimulante de acilação (ASP) e os fatores envolvidos no sistema renina angiotensina. Na obesidade, os depósitos de gordura corporal estão hipertrofiados, apresentando elevada expressão das adipocinas, proporcional ao maior volume das células adiposas (SAVAGE *et al.*, 2001; REXRODE *et al.*, 2003).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que age diretamente no adipócito, promovendo indução de apoptose, inibição da lipogênese, via inibição da expressão da lipase lipoprotéica (LLP), do *Glucose transporter type 4* (GLUT-4) e da acetil CoA sintetase, bem como aumento da lipólise, cumprindo, portanto, importante papel regulador no acúmulo de gordura no tecido adiposo (ARNER, 1995; MONTAGUE *et al.*, 2007). A expressão de RNAm e a secreção de TNF- $\alpha$  são elevadas em animais e humanos com obesidade, correlacionando positivamente com aumento do volume das células adiposas em todos os depósitos de gordura corporal (WINKLER *et al.*, 2003; KAHN; FLIER, 2000).

Em ratos com obesidade, a neutralização de TNF- $\alpha$  causou melhora significativa na captação de glicose em resposta à ação da insulina, indicando sua relação com a RI na obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006). O TNF- $\alpha$  também está envolvido no processo inflamatório da aterogênese. Ele participa da migração de monócitos e sua conversão em macrófagos na parede endotelial, por meio da transcrição do fator k- $\beta$ , que modula uma série

de mudanças inflamatórias no tecido vascular, como expressão da molécula de adesão na superfície das células endoteliais e musculares lisas (LYON; LAW; HSUEH, 2003).

Sem dúvidas, as questões relacionadas às infinitas funções do TNF- $\alpha$  ainda se apresentam como uma lacuna no meio científico e estão distantes de serem totalmente respondidas e por isso, modelos experimentais que garantam essa alteração de modo seguro serão sempre de extrema importância. Diante disso, torna-se essencial investigar o efeito das vias de atuação das dietas sobre os parâmetros inflamatórios, sendo o modelo dietético utilizado pelo nosso grupo de pesquisa uma opção para avaliar TNF-  $\alpha$ .

### 3.3.2 Distribuição da gordura corporal

Há dois tipos distintos de tecido adiposo, o branco (TAB) e o marrom (TAM), em ambos as principais células são os adipócitos. O TAB corresponde a grande maioria da gordura existente nos humanos adultos é responsável principalmente pela homeostase energética (lipogênese e lipólise) e pela ação endócrina, a energia é armazenada como triacilgliceróis (TAG) formados a partir de ácidos graxos (AG) esterificados com uma molécula de glicerol (NAVARRO *et al.*, 2016).

Ademais, é morfológicamente unilocular, ou seja, possui uma única gota lipídica que ocupa 80% a 90% de seu volume, apresentando uma camada fina no citoplasma e um núcleo achatado, localizado na periferia da célula. O tecido adiposo branco se distribui em diversos depósitos no organismo humano, que são classificados anatomicamente como subcutâneo e visceral (NADERGAARD; LINDBERG, 1982). O subcutâneo é representado principalmente pelos depósitos sob a pele nas regiões abdominal, glútea e femoral, enquanto que o visceral, é depositado próximo ou mesmo no interior das vísceras da cavidade abdominal, sendo bem exemplificado pelas gorduras mesentérica, omental e retroperitoneal (WRONSKA; KMIEC, 2012).

Já os adipócitos marrons, estão envolvidos na queima de energia para a termogênese e na regulação da temperatura corporal, possuem morfologia multilocular (têm várias gotas lipídicas no citoplasma), citoplasma mais abundante, núcleo esférico e de localização excêntrica em humanos. O TAM está presente na região torácica e clavicular, o principal sinal para ativação de adipócitos marrons é a redução da temperatura corporal ou a dieta também pode ativar de maneira semelhante, influenciando sua atividade no

comportamento alimentar e no equilíbrio de energia (NADERGAARD; LINDBERG, 1982; CINTI, 2005).

Em roedores, o tecido adiposo é distribuído de forma semelhante aos humanos. De acordo com Waldén *et al.* (2012), os depósitos de TAB em roedores incluem o subcutâneo anterior que contempla o TAB interescapular e axilar (localizado na região escapular), TAB inguinal (anexado dorsalmente ao longo da pelve para a coxa do membro posterior), TAB perigonadal (que envolve o útero, os ovários nas fêmeas, o epidídimo ou testículos em machos), TAB retroperitoneal (localizado dentro da cavidade abdominal ao longo da parede dorsal do abdômen atrás do rim), TAB perirenal (ligado aos rins), e TAB mesentérico (alinhando a superfície dos intestinos). Já o TAM está localizado nas regiões interescapular, sub-escapular e cervical, sendo do lado anterior superior do tronco e do pescoço.

O aumento da massa de tecido adiposo é a principal característica fenotípica da obesidade. O montante e a distribuição do tecido adiposo estão associados a muitas consequências adversas da obesidade, como doença cardiovascular e DM2 (EVANS *et al.*, 1984; BROCHU; POEHLMAN; ADES, 2000). No entanto, a distribuição da gordura corporal parece ser ainda mais importante do que a quantidade total de gordura (WEISS, 2007). Conseqüentemente, também a adiposidade visceral tem sido fortemente ligada à RI, DM2, hipertensão e dislipidemia, levando a risco aumentado para desenvolver doença cardiovascular, enquanto tais associações parecem ser muito menos consistentes quando relacionadas a massa gordurosa subcutânea (DESPRES, 2001; EVANS *et al.*, 1984).

Em um estudo realizado em ratos *Wistar* por Palou *et al.* (2009), observou-se uma expressão mais elevada de genes relacionados com lipogênese e lipólise e menor expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos em depósitos internos (particularmente no retroperitoneal, que também apresenta o maior tamanho de adipócitos). Tal achado pode explicar as taxas de renovação de triacilglicerídeos mais elevadas e dessa forma, o comportamento diferencial do depósito de gorduras em situações fisiológicas e envolvimento em distúrbios metabólicos vinculados à obesidade.

Sabe-se que o tecido adiposo visceral é um importante marcador na gênese da obesidade e outras comordidades associadas. Portanto, se faz necessário, uma melhor compreensão e avaliação mais minuciosa dos efeitos provocados pela dieta desenvolvida pelo grupo de pesquisa NutriSBioativoS, a fim de avaliar o parâmetro inflamatório TNF- $\alpha$  e a organização morfológica do tecido adiposo visceral de ratos *Wistar* machos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos machos, adultos, da linhagem *Wistar* (n=10), pesando 308 g (DP = 35,9), esses foram divididos em dois grupos (n=5 cada), o controle e o grupo experimental. Os animais do grupo controle foram alimentados com a dieta padrão e o experimental com uma dieta que possui alto índice glicêmico e alta carga glicêmica (dieta HGLI). Os animais foram submetidos ao experimento por 17 semanas, seguindo as recomendações de Carvalho *et al.* (2017) e posteriormente foram analisados os tecidos adiposos viscerais desses animais quanto ao aspecto morfológico e à presença de TNF- $\alpha$ .

Durante o experimento, os animais ficaram alojados em gaiolas ventiladas na condição padrão de luminosidade (12 h/12 h claro/escuro), temperatura (23-25 °C) e umidade (50  $\pm$  5%), com água e alimento *ad libitum*. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Potiguar (Unp), em Natal – RN.

Todos os experimentos foram desenvolvidos de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UnP) sob protocolo nº 012/2015.

### 4.2 DIETAS

As dietas ofertadas foram: a ração Labina® (ofertada ao grupo controle), adquirida comercialmente pela Purina Brasil e a dieta experimental (HGLI), essa produzida no Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Federal do Rio Grande do norte (UFRN) e oferecida ao grupo experimental. Para produção de 100 g da dieta HGLI, utilizou-se 45,2 g da ração Labina®, a qual foi triturada por meio de um processador de alimentos, sendo essa acrescida com 9,6 g de açúcar refinado e 45,2 mL de leite condensado. Posteriormente, a ração foi moldada com formato cilíndrico, sendo submetida ao forno pré-aquecido a 180 °C, por aproximadamente 40 minutos, segundo metodologia descrita por Carvalho *et al.* (2017).

A dieta experimental e a padrão foram ofertadas aos animais dos grupos experimental e controle, respectivamente, por 17 semanas, as quais foram abastecidas duas vezes na semana. A oferta de ambas as dietas e de água deu-se de maneira *ad libitum*.

## 4.3 COLETA DE TECIDO ADIPOSEO E ANÁLISES

### 4.3.1 Anestesia e eutanásia

A eutanásia dos ratos foi realizada após 17 semanas de estudo, os animais do grupo controle e do grupo experimental foram anestesiados com 250 mg de cloridrato de tiletamina e 250 mg de cloridrato de zolazepam e eutanasiados. O tecido adiposo visceral (perirenal, retroperitoneal e epididimal) foi removido para ser analisado.

### 4.3.2 Análise morfológica do tecido adiposo visceral

Para a realização da análise morfológica do tecido adiposo visceral, compartimento (retroperitoneal, epididimal e perirenal) foi fixado à temperatura ambiente em solução de formalina tamponada 4% por 24 h. Foi feita a desidratação do tecido em uma série alcoólica crescente (80%, 90%, absoluto) em seguida, foi realizada a clarificação, com posterior impregnação em parafina. Foram efetivadas secções do tecido com 4  $\mu\text{m}$ , as quais foram coradas com hematoxilina e eosina. Efetivou-se a leitura diagnóstica da organização histológica dos tecidos nos grupos estudados, e por fim, as imagens de cada animal foram capturadas por meio da câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Edgewood, Nova York, EUA) acoplada a um microscópio Eclipse Ni (Nikon, Edgewood, Nova York, EUA) (MARTINS *et al.*, 2017).

### 4.3.3 Imunohistoquímica de TNF- $\alpha$ em tecido adiposo visceral

Após a coleta do tecido adiposo visceral (perirenal, retroperitoneal, epididimal), esse foi submergido em formalina tamponada 4% por 24 h, à temperatura ambiente, para fixação. E então, foram executados cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo de parafina para montagem em lâminas gelatinizadas. Para a imunocoloração, foi utilizado o kit Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) (Abcam, Cambridge, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante

Inicialmente, as lâminas foram desparafinizadas com xilol, realizando-se 3 banhos de 10 minutos, e em seguida hidratadas com banhos de 5 minutos em série decrescente de álcool (100, 95, 80, 70, 50 e água destilada). Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se o peróxido de hidrogênio mediante o kit citado, por 10 minutos, em mesa agitadora a 55 rpm. Após o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram lavadas em

cubas, em mesa agitadora, por 5 minutos com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 (PBS), repetindo-se o processo 3 vezes.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0 em uma placa aquecedora, ao atingir 80 °C, as lâminas foram submergidas por 20 minutos e foi esperado mais 20 minutos para que esfriassem. Por fim, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, por 5 minutos, na cuba, em mesa agitadora, 3 vezes. Após lavagem, foi aplicado o bloqueio de proteína, deixando agir por 10 minutos, visando bloquear a coloração de fundo não específica, e posteriormente repetindo-se o processo de lavagem por 3 vezes com o tampão PBS.

Depois, o material foi deixado em repouso *overnight* à temperatura ambiente com a diluição do anticorpo primário policlonal de coelho: anti-TNF- $\alpha$  (diluição 1:100) (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Após incubação *overnight*, foi lavado em PBS por 5 minutos, trocando o tampão por 5 vezes, em mesa agitadora. E incubou-se o material com anticorpo secundário biotilado durante 60 minutos, repetindo os 5 banhos com o PBS, como anteriormente.

Em seguida, foi aplicada a estreptavidina peroxidase, permanecendo por 20 minutos em mesa agitadora a 55 rpm, e foi realizada a lavagem das lâminas com o tampão PBS, durante 5 minutos, por 5 vezes. Dando continuidade ao processo, incubou-se, protegido da luz, o substrato diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos, com posterior lavagem em PBS por 5 minutos, com cinco banhos consecutivos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas e montadas.

Para realizar a análise, imagens do tecido adiposo após a imunohistoquímica foram capturadas utilizando uma câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Edgewood, Nova York, EUA) acoplada a um microscópio Eclipse Ni (Nikon, Edgewood, Nova York, EUA).

## 5. RESULTADOS

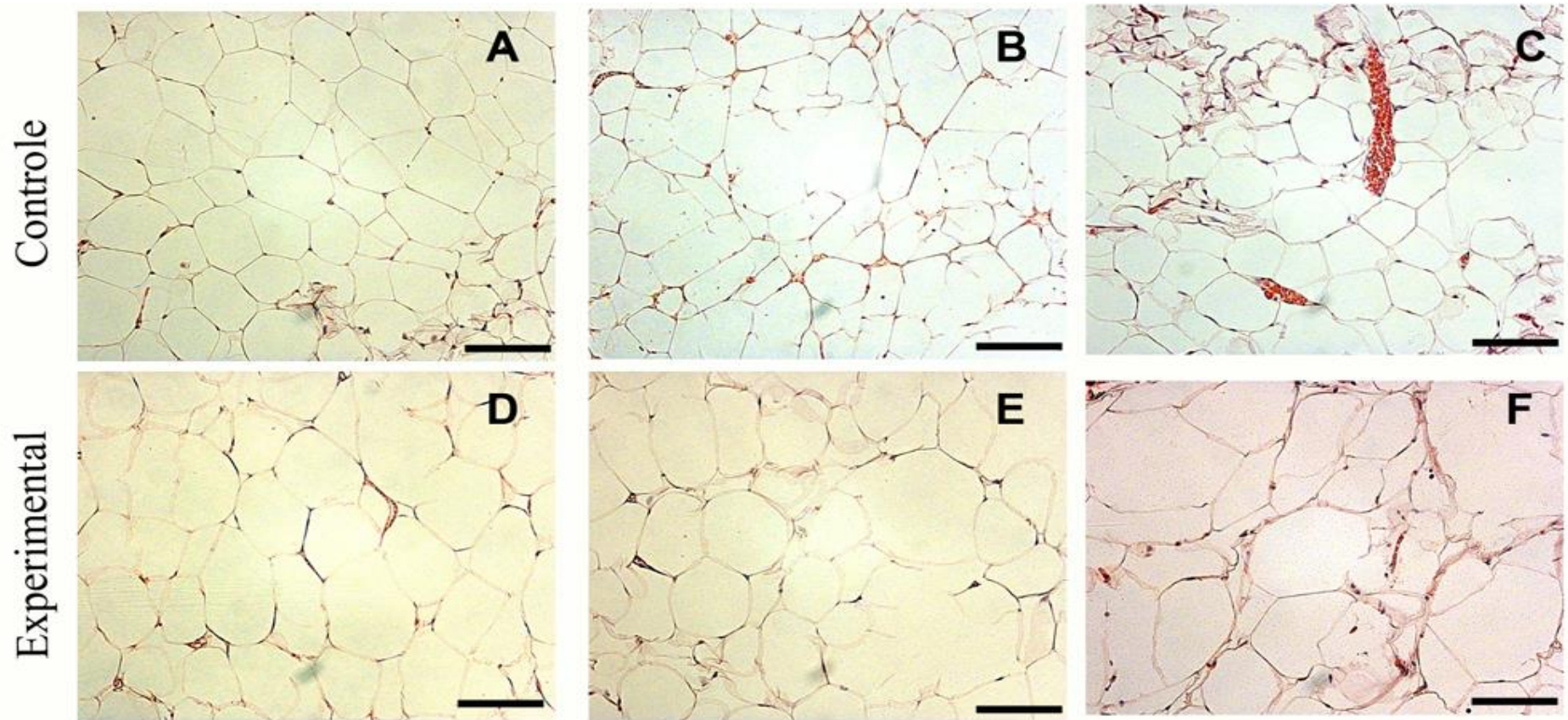
### 5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL DE RATOS APÓS INGESTÃO DE DIETA HGLI E PADRÃO

Foi evidenciado no tecido adiposo do grupo experimental (dieta HGLI) uma maior fusão das membranas dos adipócitos (coalescência), conseqüentemente maior extravasamento de plasma e aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia), quando comparados aos animais do grupo controle (dieta padrão) (Figura 1). Além disso, diagnosticou-se no tecido adiposo perirenal do grupo controle células multiloculares (tecido adiposo marrom) (Figura 2), o que não foi observado no grupo experimental.

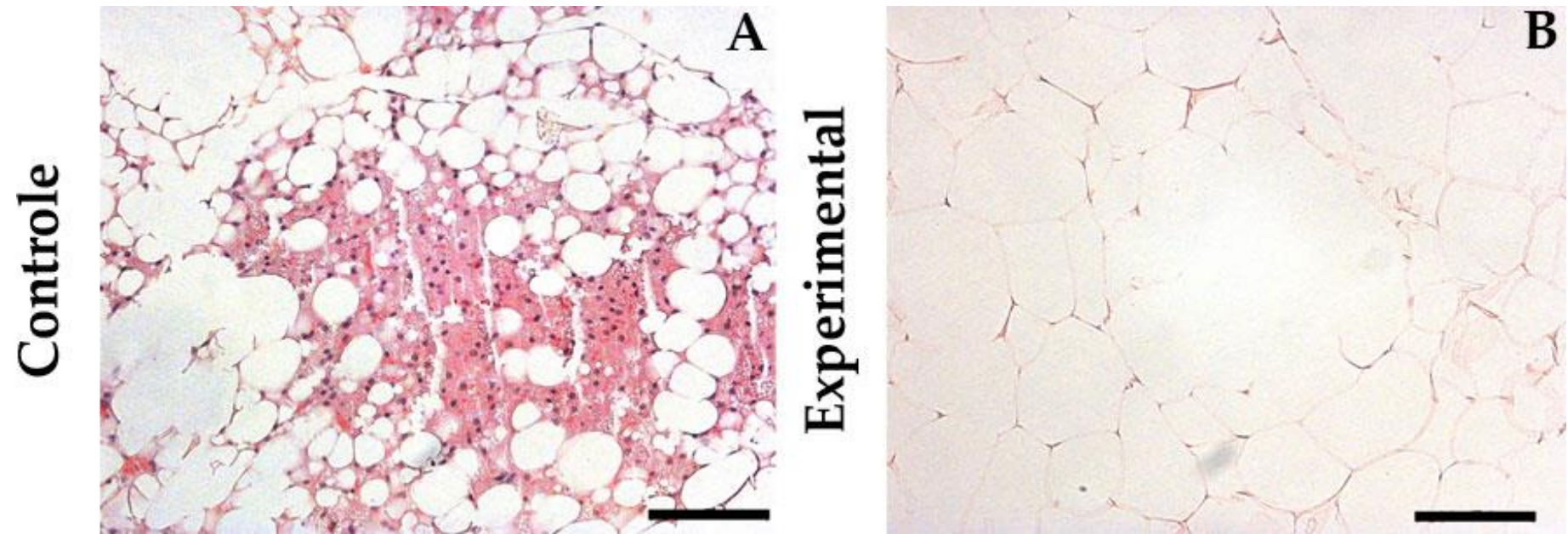
### 5.2. DETECÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA DE TNF- $\alpha$ EM ANIMAIS APÓS INGESTÃO DE DIETA HGLI E PADRÃO

Observou-se imunomarcção muito leve de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo dos animais do grupo controle, de forma inversa, os animais do grupo experimental (dieta HGLI) revelaram intensa marcação dessa citocina em todos os compartimentos de tecido adiposo avaliados (Figura 3). Esse resultado evidencia que a dieta HGLI foi capaz de provocar inflamação com presença de TNF- $\alpha$  em tecido adiposo nos ratos da linhagem *Wistar*.

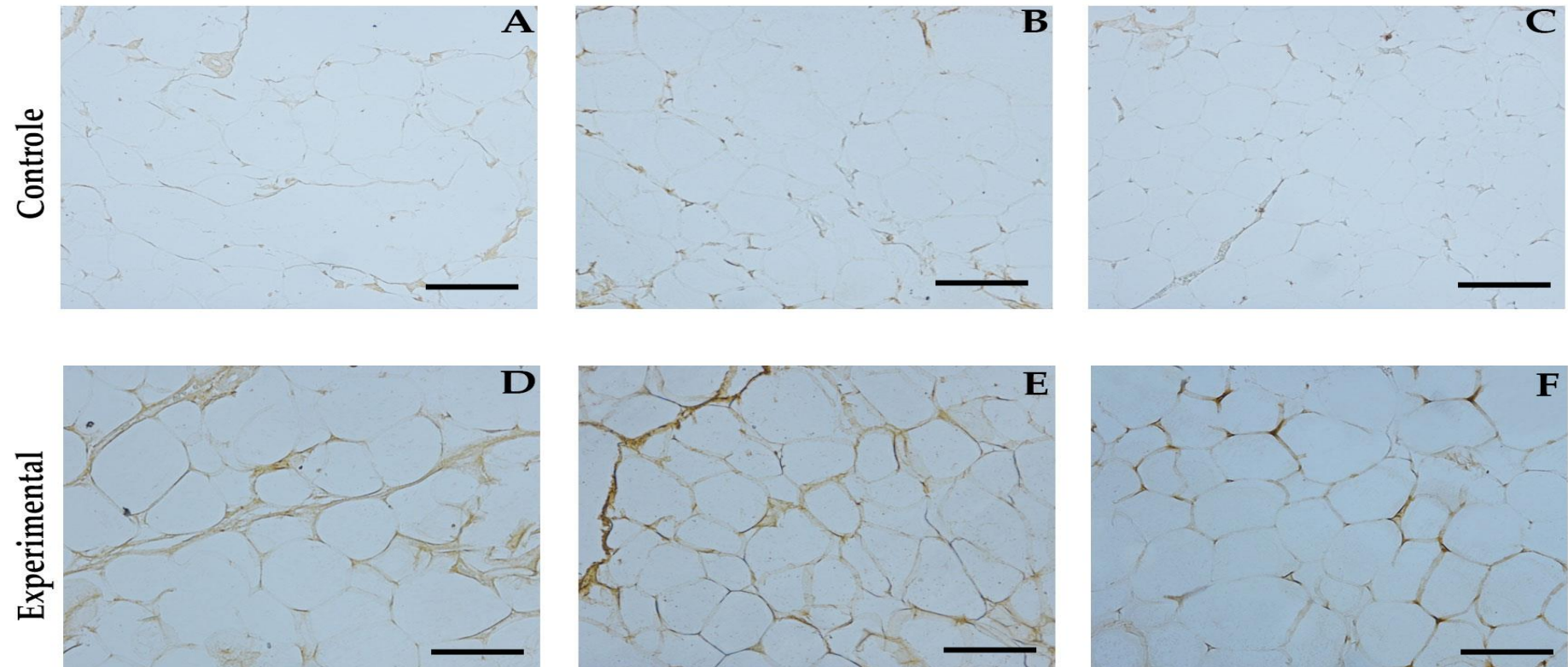




**Figura 1.** Fotomicrografia do tecido adiposo de ratos *Wistar* submetidos a diferentes tratamentos durante 17 semanas. Controle: dieta padrão (Labina®); Experimental: dieta HGLI. Todos os grupos são representados com n = 5 animais. (A) Adipócitos perirenais no grupo Controle; (B) Adipócitos retroperitoneais no grupo Controle; (C) Adipócitos epididimais no grupo Controle; (D) Adipócitos perirenais no grupo Experimental; (E) Adipócitos retroperitoneais no grupo Experimental; (F) Adipócitos epididimais no grupo Experimental. Dieta HGLI: Mistura composta por Labina®, leite condensado e açúcar (1: 1: 0.2).



**Figura 2.** Fotomicrografia do tecido adiposo visceral perirenal de ratos *Wistar* submetidos a diferentes tratamentos durante 17 semanas. Controle: dieta padrão (Labina®); Experimental: dieta HGLI. (A) adipócitos perirenais do grupo controle; (B) adipócitos perirenais do grupo experimental. Dieta HGLI: Mistura composta por Labina®, leite condensado e açúcar (1: 1: 0.2).



**Figura 3.** Imunohistoquímica de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de ratos *Wistar* submetidos a diferentes tratamentos durante 17 semanas. Controle: dieta padrão (Labina®); Experimental: dieta HGLI. Todos os grupos são representados com  $n = 5$  animais. (A) Adipócitos perirenais no grupo Controle; (B) Adipócitos retroperitoneais no grupo Controle; (C) Adipócitos epididimais no grupo Controle; (D) Adipócitos perirenais no grupo Experimental; (E) Adipócitos retroperitoneais no grupo Experimental; (F) Adipócitos epididimais no grupo Experimental. Dieta HGLI: Mistura composta por Labina®, leite condensado e açúcar (1: 1: 0.2).

## 6. DISCUSSÃO

O tecido adiposo é um órgão endócrino metabolicamente ativo (SCHEIDELER *et al.*, 2016), uma das suas principais funções é armazenar lipídios na forma de triglicerídeos em seu citoplasma, em condições de nutrientes em excesso (BIRSOY; FESTUCCIA; LAPLANTE, 2013). Já se tem bem definido na literatura que na obesidade ocorre o excesso do tecido adiposo corporal, com modificações na estrutura organizacional dos adipócitos (JENSEN, 1997).

Com base nos resultados obtidos neste estudo da análise morfológica do tecido adiposo visceral (perirenal, retroperitoneal e epididimal) em ratos *Wistar*, foi evidenciado que o grupo experimental (ofertado com dieta HGLI) apresentou hipertrofia dos adipócitos, maior coalescência e extravasamento de plasma, quando comparado ao grupo controle. Destaca-se que em estudos prévios, com a mesma dieta, os animais apresentaram diagnóstico de obesidade (OLIVEIRA, 2016), o que possivelmente pode estar associado aos resultados aqui encontrados. No estudo de Oliveira *et al.* (2013), camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados apresentaram alta adiposidade, com hipertrofia dos adipócitos em tecido adiposo visceral, corroborando os achados deste estudo.

Adicionalmente, na análise morfológica foram detectadas no tecido adiposo visceral perirenal do grupo controle células multiloculares, ou seja, tecido adiposo marrom, que está envolvido na queima de energia para a termogênese, geralmente induzida pelo frio (NADERGAARD; LINDBERG, 1982). Como os animais são da mesma espécie, idade e foram submetidos as mesmas condições ambientais (temperatura, umidade, luminosidade), divergindo apenas a oferta das dietas (padrão e HGLI), acredita-se que a dieta experimental não foi capaz de ativar a termogênese de maneira semelhante a dieta padrão, influenciando no comportamento alimentar e no equilíbrio de energia (CINTI, 2005).

Estudos recentes mostraram que a expansão do tecido adiposo leva a inflamação crônica de baixo grau (obesidade) que contribui para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, incluindo dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (SAMPEY *et al.*, 2011). Secreção de adipocinas como o TNF- $\alpha$  é elevada em animais e humanos com obesidade, correlacionando positivamente com aumento do volume das células adiposas em todos os depósitos de gordura corporal (WINKLER *et al.*, 2003; KAHN; FLIER, 2000).

Na avaliação da imunohistoquímica do presente estudo, os animais que foram alimentados com a dieta HGLI apresentaram maior marcação de TNF-  $\alpha$  em todos os

compartimentos do tecido adiposo visceral em relação ao grupo controle. Desse modo, esse resultado evidencia que a dieta experimental que possui como principal ingrediente o leite condensado, quantificada com 64% de carboidratos em sua composição (SANTOS J. P. S., 2016) foi capaz de provocar inflamação com presença da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ . Nos estudos de Masi *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2013) foram ofertadas dietas também ricas em leite condensado, com 68% de carboidrato e 65,8%, respectivamente, as quais foram capazes de provocar inflamação em tecido adiposo visceral epididimal em camundongos, estando esse resultado em consonância com o estudo em questão.

Ademais, vale ressaltar que o presente estudo tem como diferencial a utilização de ratos da linhagem *Wistar* em DIO para avaliar os resultados citados. Sabe-se que essa linhagem apresenta maior representatividade e heterogeneidade em relação aos camundongos que são consanguíneos, homogêneos (STROBEL *et al.*, 2015). Além do que, na literatura são escassos dados avaliando expressão gênica, imunohistoquímica ou concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  utilizando a linhagem *Wistar*, sendo mais comum em camundongo (CAMPBELL; SENIOR; BELL-ANDERSON, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MASI *et al.*, 2017, FERREIRA *et al.*, 2011), trazendo assim este estudo, resultados inovadores.

Sendo assim, a dieta experimental caracterizada como sólida e com alto teor de carboidratos simples, foi capaz de ocasionar neste estudo modificações na morfologia do tecido adiposo visceral, assim como, aumento da marcação de TNF- em ratos *Wistar*. E além disso, em outros estudos, animais alimentados com essa mesma dieta, a qual destaca-se em relação as demais por apresentar quantificado o IG (77,6) e CG (38,8) (CARVALHO *et al.*, 2017), apresentaram aumento da glicemia em jejum (SANTOS J. P. S., 2016), triglicerídeos (SANTOS J. H., 2016) e VLDL no plasma (SILVA, 2016). Sabe-se que a dislipidemia está atrelada a hipertrofia dos adipócitos, a qual também tem associação com a inflamação (HOFFSTEDT *et al.*, 2010) dessa forma, os achados deste estudo estão possivelmente relacionados com as alterações citadas.

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a dieta HGLI desenvolvida pelo grupo NutriSBioativoS foi capaz de provocar alterações morfológicas e intensa marcação de TNF-  $\alpha$  em tecido adiposo visceral de ratos *Wistar*.

## REFERÊNCIAS

- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals Medicine**, v. 27, n. 7, p. 435-438, Aug, 1995.
- ALMEIDA, F. N.; ALMEIDA, K. N.; MASI, L. N.; NACHBAR, R. T.; NATALI, M. R. M; MORAES, S. M. F. A resposta do peso e da composição corporal à inclusão da dieta de cafeteria e treinamento físico aeróbio em diferentes fases do desenvolvimento. **Ciência, Cuidado e Saúde.**, Maringá , v. 7, n. 1, p. 39-44, 2008.
- BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; FOWKES, R. C.; STICKLAND, N. C. A Maternal "Junk Food" Diet in Pregnancy and Lactation Promotes Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rat Offspring. **Endocrinology.** , v. 151, n. 4, p. 1451-1461, Apr., 2010
- BIRSOY K<sup>1</sup>., FESTUCCIA, W. T., LAPLANTE, M. A comparative perspective on lipid storage in animals. **Journal of cell Science**, v. 126, n. 7, p. 1541-1552.
- BJÖRCK, L. et al. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 699-705, Mar, 1994.
- BORTOLIN, R. C. et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **International Journal of Obesity**, Sep, 2017.
- BRAY G. A, et al. Management of obesity. **Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947-1956, May, 2016.
- BROCHU, M.; POEHLMAN E. T.; ADES, P. A. Obesity, body fat distribution, and coronary artery disease. **Journal Cardiopulmonary Rehabilitation**, v. 20, n.2, p. 95-108, Mar, 2000.
- BURNEIKO R. C. et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, Jul, 2006.
- CABALLERO, B.; ALLEN, L.; PRENTICE, A. Encyclopedia of Human Nutrition. 3.ed. Baltimore – USA: **Academic Press**, 2013, 1775 p.
- CAMPBELL, G. J.; SENIOR, A. M.; BELL-ANDERSON, K. S. Metabolic Effects of High Glycaemic Index Diets: A Systematic Review and Meta-Analysis of Feeding Studies in Mice and Rats. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 1-20, Jun, 2017.
- CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J. Alteration of islet neurotransmitter sensitivity following ventromedial hypothalamic lesio. **The American Journal Physiology**, v. 244, n. 5, p. 635-640, Sep, 1983.

CARVALHO, F. M. C. et al. A High Glycemic Index and Glycemic Load Pellet-diet Induces Metabolic Disorders and Increases PPAR $\gamma$  Expression in Wistar Rats. **Journal of Developmental origins of Health and Disease**, 2017. (Submetido).

CASTRO, H. et al. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. **International Journal Obesity.**, v. 39, n. 3, p. 430-437, Mar., 2015.

CINTI, S. The Adipose organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, n. 1, p. 9-15, Jul, 2005.

DA SILVA, A. S. R. et al. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 42, n. 12, p. 2180-2188, dec, 2010.

DESPRES, J. P. Health consequences of visceral obesity. **Annals of Medicine**, v. 33, n. 8, p. 534-541, Nov, 2001.

EVANS, D. J. et al. Relationship of body fat topography to insulin sensitivity and metabolic profiles in premenopausal women. **Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 69-75, Jan, 1984.

FLATT, J. P.; TREMBLAY, A. Energy expenditure and substrate oxidation. *In*: BRAY, G.A., BOUCHARD, C.; JAMES, W.P.T. **Handbook of obesity**. New York : Marcel Dekker, 1998. p.513-537.

FONSECA- ALANIZ, M. H. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, Nov, 2007.

GABRIELY I. et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2951-2958, Oct, 2002.

GIBBS, R. A. et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 493-521, Apr, 2004.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 783-809, Jul, 1998.

GUERRA, R. L. et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids Health Disease**, v. 6, n. 16, Jul, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, Dec, 2006.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Food Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients)**. Institute of Medicine (IOM). Washington D.C: National Academy, 2002.

JENKINS D. J. et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. **The American journal of clinical nutrition**, v. 34, n. 3, p. 362-366, Mar, 1981.



JENSEN M. D. et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. **Circulation**, v. 129, n. 25, p. 102-138, Jun, 2014.

JENSEN, M.D. Health consequences of fat distribution. **Hormone Research**, v. 48, n. 5, p. 88-92, 1997.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473-481, Aug, 2000.

KERSAHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, Jun, 2004.

LEEDS A. R. Glycemic index and heart disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 286-289, Jul, 2002.

LIEBMAN M.; WILKINSON J. G. Metabolismo de carboidratos e condicionamento físico. *In*: WOLINSKY I.; HICKSON J. F. Jr. **Nutrição no exercício e no esporte**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002.

LÓPEZ, I. P. et al. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet - induced (cafeteria) obese rats. **Obesity Research**, v. 11, n. 2, p. 188-194, Feb, 2003.

LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2195-2200, Jun, 2003.

MACEDO, I. C. et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 189-196, Nov, 2012.

MARTINS, L. B. et al. Paradoxical role of Tumor Necrosis Factor on metabolic dysfunction and adipose tissue expansion in mice. **Nutritions**, 2017.

MASI, L. N. et al. Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, Jun, 2017.

MAUGHAN, R. J.; BURKE L. M. *Nutrição Esportiva*. 1. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 1-190, 2004.

MONTAGUE C. T. et al. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 897, Mar, 2007.

MORRIS, K. L.; ZEMEL, M. B. Glycemic index, cardiovascular disease and obesity. **Nutrition Reviews**, v. 57, n. 9, p. 273-276, Sep, 1999.

NAKANISHI, S.; SERIKAWA, T.; KURAMOTO, T. Slc: Wistar outbred rats show close genetic similarity with F344 inbred rats. *Exp Anim*, v. 64, n. 1, p. 25-29, Sep, 2015.

NASCIMENTO, A. F. et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, vol. 52, n. 6, p. 968- 974, Aug., 2008.

NAVARRO, E. et al. Prenatal nutrition and the risk of adult obesity: Long-term effects of nutrition on epigenetic mechanisms regulating gene expression..**The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 39, p. 1-14, Jan, 2017.

NEDERGAARD, J.; LINDBERG, O. The brown fat cell. **International Review of Cytology**, v. 74, p. 187-286, 1982.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. In: \_\_\_\_\_. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 243-263.

NILSSON, C. et al. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 173-181, Feb, 2012.

National Research Council (NRC). Recommended Dietary Allowances, 10.ed. Washington D.C.: **National Academy Press**, 1989.

OLIVEIRA, G. S. **Efeito de um modelo de dieta de cafeteria no crescimento e estado nutricional em ratos wistar**. 2017.41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

OLIVEIRA, M. C et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 396-406, Sep, 2013.

PALOU, M. Gene Expression Patterns in Visceral and Subcutaneous Adipose Depots in Rats are Linked to Their Morphologic Features. **Cellular Physiology Biochemistry**, v. 24, n 5-6, p. 547-556, Nov, 2009.

QATANANI, M.; LAZAR, M. A. Mechanisms of obesity- associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes & Development**, v. 21, n. 12, p. 1443-1455, Jun, 2007.

REXRODE K. M. et al. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Annals Epidemiology**, v. 13, n. 10, p. 674-682, Nov, 2003.

ROBERTS, S. B. Abnormalities of energy expenditure and the development of obesity. **Obesity Research**, v. 3, n. 2, p.155S-163S, Sep, 1995.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SALMERÓN, J. et al. Dietary fiber, glycemic load, and risk of niddm in men. **Diabetes care**, v. 20, n. 4, p. 545-550, Apr, 1997.

SANTOS, J. H. **Dieta hiperglicídica e seu impacto nos parâmetros bioquímicos preditivos da síndrome metabólica em modelo experimental**. 2016. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SANTOS, J. P. S. O. **Dieta De Cafeteria: Produção, Composição Nutricional E Influência Na Glicemia De Jejum Em Modelo Animal**. 2016. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SAVAGE, D. B. et al. Resistin/fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-  $\gamma$  action in humans. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2199-2202, Oct, 2001.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity** (Silver Spring), v. 19, n. 6, p. 1109-1117, jun., 2011.

SCHEIDELER, M. MicroRNAs in adipocyte formation and obesity. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 30, n. 5, p. 653-664, Oct, 2016.

SILVA, F. K. B. **Avaliação de uma dieta de cafeteria na alteração de fatores de risco cardiovascular em modelo experimental**. 2016. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

STROBEL, M. C. et al. Genetic Monitoring of Laboratory Mice and Rats. *In: \_\_\_\_\_* Book Laboratory Animal Medicine. 3ed. Cambridge, USA: **Elsevier**, 2015. p. 1403-144.

TCHERNOF A.; DESPRÉS. J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiological Reviews**, v. 93, n.1, p. 359–404, Jan, 2013.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n.10, p. 772- 783, Oct, 2006.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiological Reviews**, v. 93, n.1, p. 1-21, Jan, 2013.

WALDEN, I. R. et al. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. **The American Journal of Physiology**, v. 302, n. 1, n. 19-31, Jan, 2012.

WEISS, R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? **European Journal Endocrinology**, v. 157, p. 39-45, Aug, 2007.

WINKLER G. et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. **European Journal Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 129-135, Aug, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: World Health Organ Tech Rep Ser, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/>>

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

ZAMBON L. et al. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 5, p. 1-9, Oct, 2009.