



AMANDA ROBERTA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR RENAL,
PRESSÃO ARTERIAL, PERFIL METABÓLICO E
INFLAMATÓRIO EM UM GRUPO DE OBESOS.

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

AMANDA ROBERTA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR RENAL,
PRESSÃO ARTERIAL, PERFIL METABÓLICO E
INFLAMATÓRIO EM UM GRUPO DE OBESOS.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Sarah Monte Alegre

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA AMANDA
ROBERTA DE ALMEIDA, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

AL64a	<p>Almeida, Amanda Roberta de, 1976- Avaliação da função tubular renal, pressão arterial, perfil metabólico e inflamatório em um grupo de obesos / Amanda Roberta de Almeida. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador : Jose Antonio Rocha Gontijo. Coorientador : Sarah Monte Alegre. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Obesidade. 2. Rim - Fisiopatologia. 3. Hipertensão. 4. Inflamação. 5. Metabolismo. 6. Testes de função renal. I. Gontijo, Jose Antonio Rocha, 1956-. II. Alegre, Sarah Monte, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Assessment of renal function, blood pressure, metabolic and inflammatory profile in a group of obese

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Kidney, Physiopathology
Hypertension
Inflammation
Metabolism
Kidney function tests

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Jose Antonio Rocha Gontijo [Orientador]
Elza Olga Ana Muscelli Berardi
Eduardo Rochete Ropelle
Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Fernanda Bruschi Marinho Priviero

Data de defesa: 29-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

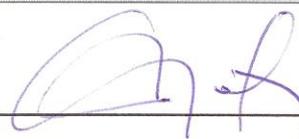
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

AMANDA ROBERTA DE ALMEIDA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO

MEMBROS:

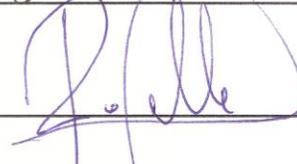
1. PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO



2. PROF(A). DR(A). ELZA OLGA ANA MUSCELLI BERARDI



3. PROF(A). DR(A). EDUARDO ROCHETE ROPELLE



4. PROF(A).DR(A). PATRÍCIA CRISTINA LISBOA DA SILVA



5. PROF(A).DR(A). FERNANDA BRUSCHI MARINHO PRIVIERO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 29 de novembro de 2013

Dedicatória

Aos meus avós Frau e Elsie, por terem acreditado em mim.

Obrigada pelo incentivo e apoio.

Aos meus pais, por me ensinarem os princípios e valores da vida.

Sem todos vocês não seria possível.

Agradecimentos

A Deus, por me dar a vida e proporcionar a realização dos meus sonhos.

Aos meus avós Frau e Elsie, que com grande satisfação me proporcionaram cursar Ciências Biológicas, sempre me incentivando.

Aos meus pais Roberto e Teresa, por compartilharem todos os momentos da minha vida, com palavras de incentivo, carinho e muito amor, me ensinaram o melhor caminho.

Ao meu irmão Alexandre, que com seu bom humor tentava me mostrar que nem tudo era o fim.

Ao meu amado marido Fabiano, por toda paciência, que muito me apoiou e incentivou.

Ao meu amorzinho Guto, que deixei de levar para passear por me dedicar a este trabalho.

Ao Professor Dr. José Antonio Rocha Gontijo, pela confiança, oportunidade e sábia orientação para a realização deste trabalho.

À Dra Sarah Monte Alegre, por aceitar-me em seu laboratório, pelos grandes ensinamentos, orientações para trabalhar com seres humanos e pela amizade construída.

Agradecimentos

Ao Dr. Maurício Etchebehere, pelo profissionalismo, grande disponibilidade e ajuda.

À minha parceira e grande amiga de projeto Michele, que sempre me apoiou, ajudou e incentivou, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Aglécio, pela amizade e grande dedicação a este trabalho.

Aos voluntários, que colaboraram para a realização deste estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Metabolismo Hidro Salino que sempre bem humorados me proporcionavam momentos de alegria: Flávia, Silmara, Ize, Noemi, Daniele, Patrícia Aline, Bárbara, Carmen, Daniel, Canale, Eduardo, Luiz e Augusto.

Às minhas amigas da Unidade Metabólica que me receberam de braços abertos: Thalyta, Daniela, Gisele, Milena e Raquel.

Aos amigos do laboratório onde trabalho, que por várias vezes deixaram de pedir minha ajuda enquanto desenvolvia este projeto: Dr. Paulo Velho, Tânia, Marilene, Gislaine, Vinicius, Bruno, Karina, Lígia, Marina, Samantha, Thatiane e Valéria.

À minha amiga Tânia, pela assistência diária e cumplicidade.

Agradecimentos

À minha amiga de graduação Carolina Silveira, sempre compartilhando os momentos da minha vida com palavras de apoio.

A Capes, pelo apoio financeiro e por conceder a bolsa por dois anos.

A Faculdade de Ciências Médicas, por me receber e apoiar a pesquisa.

"Entrega o teu caminho ao Senhor; confia Nele, e Ele tudo fará."
Salmo 37:5



RESUMO

A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública, sendo classificada como uma epidemia global, podendo ser definida como uma doença que pode causar ou exacerbar problemas de saúde. Nos últimos anos, o crescimento do número de indivíduos com sobrepeso e obesidade revela um quadro epidemiológico preocupante. Este aumento de peso causa hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, podendo constituir situações relacionadas à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações. Dentre as complicações, o aumento na produção de citocinas corrobora para o desenvolvimento de um quadro inflamatório, que está associado à resistência à insulina e hipertensão arterial, caracterizado como Síndrome Metabólica. Este processo inflamatório está também relacionado à função renal, sugerindo que o rim desempenha um papel no *clearance* das citocinas envolvidas no processo inflamatório. Observa-se também a hiperinsulinemia presente em grande parcela de indivíduos obesos, contribuindo para alterações na função renal. A patologia renal em paciente obeso é conhecida como glomerulopatia relacionada à obesidade. No obeso a taxa de filtração elevada leva a uma vasodilatação da arteríola aferente com conseqüente elevação da fração de filtração, como resultado de uma hiperfiltração glomerular seguido de dano renal. Este trabalho procurou entender as implicações da obesidade, sem qualquer outra co-morbidade associada, sobre a função tubular renal, a pressão arterial, os perfis metabólico e inflamatório em um grupo de voluntários obesos comparados a um grupo de controles eutróficos. Os voluntários foram submetidos ao *clearance* de lítio e creatinina, juntamente com o teste de tolerância oral à glicose. Foi avaliada a função tubular renal, os perfis metabólico, lipídico e inflamatório. Os voluntários obesos apresentaram fenótipos diferentes para a resistência à insulina e pressão arterial, contudo, o perfil inflamatório e a função tubular renal foram similares. O perfil insulinêmico mostrou diferença importante entre os grupos de obesos quando comparados ao controle. O presente estudo demonstrou que a obesidade no grupo estudado, pode ocorrer com poucas alterações fisiopatológicas. Nós aventamos a hipótese que estas alterações, particularmente as metabólicas, são acentuadas ou associadas à elevação do *status* inflamatório dos voluntários obesos, mas por outro lado, são atenuadas possivelmente pela elevada concentração sérica de adiponectina no grupo normo-insulinêmico, quando comparado aos voluntários hiperinsulinêmicos. Assim, é possível,

que os indivíduos do grupo obeso normo-insulinêmicos possam tardiamente evoluir para hiperinsulinemia reciprocamente à redução dos níveis de adiponectina.



ABSTRACT

Obesity is considered an important public health problem, being classified as a global epidemic, which can be defined as a disease that can cause or exacerbate health problems. In recent years, the growth in the number of individuals with overweight and obesity reveals an epidemiological framework concern. This increase in weight cause hypertrophy and/or Adipocyte hyperplasia and may constitute situations related to the genesis of the pathophysiological process of obesity and its complications. Among its complications, the increase in the production of cytokines supports for the development of an inflammatory process, which is associated with insulin resistance and hypertension, characterized as metabolic syndrome. This inflammatory process is also related to kidney function, suggesting that the kidney plays a role in the clearance of cytokines involved in the inflammatory process. It is also observed hyperinsulinemic present in large proportion of obese individuals, contributing to changes in renal function. Renal changes in obese patient is known as glomerulopathy related to obesity. In the obese high filtration rate leads to vasodilatation of the afferent arteriole with consequent elevation of the filtration fraction, as a result of glomerular Hyperfiltration followed by renal damage. Thus, this work sought to understand the implications of obesity, with no other associated co-morbidity, on renal tubular function, blood pressure, and inflammatory and metabolic profiles in a group of obese volunteers compared to a group of eutrophic controls. Obese volunteers showed different phenotypes for insulin resistance, blood pressure, inflammatory profile and renal tubular function were similar. Insulinemia profile showed significant difference for the obese groups compared to controls. The present study showed that obesity, at least in a specific group, can occur without major patho-physiological changes. We may state the hypothesis that these amendments, particularly the metabolic, are accentuated or associated with elevation of inflammatory status of obese volunteers, but on the other hand, are attenuated possibly by the high concentration of serum adiponectin in normo-insulinemic group when compared to the hyperinsulinemic volunteers. Thus, it is possible however, that individuals of the obese group normo-insulinemic can later evolve to hyperinsulinemic reciprocally to reduction of adiponectin levels.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC - Acetil CoA Carboxilase

AGL - Ácidos Graxos Livres

Akt - Proteína Quinase B

AMPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

ASC - Área Sob a Curva

AT1R - Receptor 1 de Angiotensina

AT2R - Receptor 2 de Angiotensina

BIA - Bioimpedância Elétrica

CCr - *Clearance* de Creatinina

CEK - Carga Excretada de Potássio

CENa - Carga Excretada de Sódio

CFK - Carga Filtrada de Potássio

CFNa - Carga Filtrada de Sódio

Cli - *Clearance* de Lítio

CNa - *Clearance* de Sódio

CT - Controle

DRC - Doença Renal Crônica

ECA - Enzima Conversora da Angiotensina

eNos - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ERK – Quinase Reguladora de Sinal Extracelular

FEK - Fração de Excreção de Potássio

FENa - Fração de Excreção de Sódio

FEPNa - Fração de Excreção Proximal de Sódio

FEPPNa - Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio

GESF - Glomeruloesclerose Segmental Focal

GRO - Glomerulopatia Relacionada à Obesidade

HDL - Proteínas de Alta Densidade

HOMA - Modelo de Avaliação da Homeostase

HOMA IR - Modelo de Avaliação da Homeostase de Resistência à Insulina

HOMA % β - Modelo de Avaliação da Homeostase de Funcionalidade das Células β Pancreáticas

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-10 - Interleucina 10

IL-18 - Interleucina 18

IL-6 - Interleucina 6

IMC - Índice de Massa Corporal

incr - incremento

IR - Receptor de Insulina

IRS-1 - Substrato 1 do Receptor de Insulina

kDa - Quilo Dalton

Kitt - Índice de Sensibilidade à Insulina

LDL - Proteínas de Baixa Densidade

Li₂CO₃ - Carbonato de Lítio

MAP - Proteína Ativada por Mitógeno

mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro

NF-kB - Fator Nuclear Kappa-B

NO - Óxido Nítrico

OB HI - Obeso Hiperinsulinêmico

OB NI - Obeso Normo-insulinêmico

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

P - Plasma

PA dist - Pressão Arterial Diastólica

PA sist - Pressão Arterial Sistólica

PAI-1 - Inibidor da Ativação de Plasminogênio-1 PCR - Proteína C Reativa

PI3K - Fosfatidilinositol 3 - quinase

PKC – Proteína Quinase C

POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR α - Receptor Ativador e Proliferador de Peroxissomo
QUICKI - Índice Quantitativo para Avaliar Sensibilidade à Insulina
SM - Síndrome Metabólica
SNS - Sistema Nervoso Simpático
SOCS-3 - Supressor de Sinalização de Citocina 3
SRA - Sistema Renina Angiotensina
TFG - Taxa de Filtração Glomerular
TGF- β - Fator Transformador de Crescimento β
TGF- β 1 - Fator Transformador de Crescimento β 1
TLRs - Receptores do Tipo Toll
TLR4 - Receptor do Tipo Toll 4
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α
TTOG - Teste de Tolerância Oral à Glicose
TTI - Teste de Tolerância à Insulina
U - Urina
V - Volume
VLDL - Proteínas de Muito Baixa Densidade

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: Características antropométricas do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	72
Tabela 2: Resultados do teste de tolerância oral à glicose do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	75
Tabela 3: Características metabólicas do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	78
Tabela 4: Perfil lipídico, ácido úrico e ácidos graxos livres no período basal do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	81
Tabela 5: Resultados de citocinas e marcadores inflamatórios no período basal do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	84
Tabela 6: Pressão arterial sistólica e diastólica do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	87
Tabela 7: Avaliação da função tubular renal do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.....	89

LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1: Resistência à insulina	71
Figura 2A: Gordura corporal total em quilogramas	72
Figura 2B: Massa magra total em quilogramas	73
Figura 3A: Curva insulinêmica	73
Figura 3B: Curva glicêmica	74
Figura 3C: Área sob a curva total de insulina	76
Figura 3D: Área sob a curva de insulina nos tempos de coleta	76
Figura 3E: Área sob a curva total de glicose	77
Figura 3F: Área sob a curva de glicose nos tempos de coleta	77
Figura 4A: Resistência à insulina	78
Figura 4B: Sensibilidade à insulina	79
Figura 4C: Funcionalidade das células β	79
Figura 4D: Teste de tolerância à insulina	80
Figura 5A: Colesterol total e frações	81
Figura 5B: Ácido úrico	82
Figura 5C: Triglicérides	82
Figura 5D: Ácidos graxos livres	83
Figura 6A: Fator de necrose tumoral α	84
Figura 6B: Interleucina 6	85
Figura 6C: Proteína C reativa	85
Figura 6D: Adiponectina	86
Figura 6E: Leptina	86
Figura 7: Pressão arterial sistólica e diastólica	87
Figura 8A: Volume urinário	90
Figura 8B: Taxa de filtração glomerular	91
Figura 8C: <i>Clearance</i> de lítio	91
Figura 8D: Fração de excreção proximal de sódio	92
Figura 8E: Fração de excreção pós-proximal de sódio	92
Figura 8F: Carga filtrada de sódio	93

Figura 8G: Carga excretada de sódio	93
Figura 8H: Fração de excreção de sódio	94
Figura 8I: Fração de excreção de potássio	94
Figura 9A: Correlação entre o HOMA-IR e a insulina de jejum	95
Figura 9B: Correlação entre o HOMA-IR e a pressão arterial sistólica	95
Figura 9C: Correlação entre o HOMA-IR e a gordura corporal	96
Figura 9D: Correlação entre o HOMA-IR e IL-6	96
Figura 9E: Correlação entre HOMA e TNF- α	97
Figura 9F: Correlação entre HOMA e adiponectina	97
Figura 9G: Correlação entre pressão arterial sistólica e a gordura corporal	98

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	33
1.1. Histórico	35
1.2. Epidemiologia.	36
1.3. Os Riscos da Obesidade.	37
1.4. Obesidade e Resistência à Insulina.	38
1.5. O Tecido Adiposo.	39
1.6. As Citocinas.	42
1.6.1. TNF α	43
1.6.2. IL6	44
1.6.3. PCR.....	45
1.6.4. Adiponectina	45
1.6.5. Leptina	46
1.7. Obesidade e Função Renal.....	47
1.8. Obesidade e Pressão Arterial.	50
1.9. Obesos Saudáveis.....	51
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo Geral.....	55
2.2. Objetivos Específicos.	55
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	57
3.1. Tipo, População e Local de Estudo.....	59
3.2. Tamanho da Amostra.	59
3.3. Métodos de Convocação.....	59
3.4. Critérios de Inclusão e Exclusão.	59
3.5. Aspectos Éticos.	59
3.6. Parâmetros Clínicos e Laboratoriais Avaliados.	60
3.7. Protocolo Experimental.	60
3.8. Medidas Antropométricas.....	60
3.9. Fórmula para Cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC).	60
3.10. Avaliação da Composição Corporal.....	61

3.11. Avaliação da Pressão Arterial.	61
3.12. Avaliação da Função Glomerular e Tubular Renal pelos <i>Clearances</i> de Lítio e Creatinina Concomitantemente com a Curva Glicêmica	62
3.13. Determinação das Concentrações de Sódio, Potássio, Lítio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias.....	63
3.14. Fórmulas para Cálculo do <i>Clearance</i> e de Frações de Excreção.....	63
3.15. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG).....	65
3.16. Fórmula para Cálculo das Curvas (ASC) de Glicose e Insulina no Teste de Tolerância Oral à Glicose.....	66
3.17. Teste de Tolerância à Insulina (TTI).....	66
3.18. Acondicionamento das Amostras.....	66
3.19. Métodos Analíticos.....	67
3.20. Análise Estatística dos Resultados.....	68
4. RESULTADOS.....	69
4.1. Características Gerais.....	71
4.2. Resultados de Teste Oral de Tolerância à Glicose.....	73
4.3. Perfil Lipídico e Ácido Úrico.....	80
4.4. Citocinas e Marcadores Inflamatórios.....	83
4.5. Avaliação da Pressão Arterial.....	87
4.6. Avaliação da Função Tubular Renal.....	88
4.7. Correlação entre variáveis.....	95
5. DISCUSSÃO.....	99
6. CONCLUSÃO.....	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
8. ANEXOS.....	133



1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico.

O excesso de peso é conhecido desde a antiguidade, onde pinturas e estátuas em pedras já apresentavam mulheres obesas, documentado há 25.000 anos pela estatueta de Vênus de Willendorf (1). Múmias egípcias, pinturas, porcelanas chinesas, esculturas gregas e romanas e em vasos dos Maias e Incas nas Américas, ilustravam pessoas com excesso de peso (2).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade caracteriza-se por um acúmulo excessivo de tecido adiposo que se deve basicamente, ao desequilíbrio entre o consumo de calorias e o dispêndio energético. Mudanças sociais e a transição nutricional mundial impulsionam a epidemia da obesidade (3).

Modificações nos hábitos de vida, principalmente no que diz respeito ao consumo de alimentos com elevada densidade energética, com altos teores de açúcar e gorduras saturadas e a redução das atividades físicas, exercem importante influência nesse aumento da obesidade (3). Embora a genética desempenhe papel importante na susceptibilidade do indivíduo para ganhar peso, o balanço energético é determinado resumidamente pela ingestão de calorias e pela atividade física. Durante a evolução, genes originalmente tidos como benéficos ao armazenamento de energia nos momentos de escassez, têm se tornado vilões, podendo explicar a epidemia da obesidade e diabetes mellitus tipo 2, associado ao consumo de alimentos calóricos e ao sedentarismo (4). Segundo o postulado pela teoria do “*thrifty genotype*”, ou genótipo poupador, determinadas populações poderiam apresentar uma maior prevalência de genes que codificariam proteínas direcionadas a um menor gasto energético, provavelmente selecionados durante períodos de escassez de alimentos (5).

O excesso de energia, consequência deste desequilíbrio entre consumo e gasto calórico, é armazenado nos adipócitos, que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia, aumentando assim o volume do tecido adiposo (6). Segundo a OMS, a obesidade é classificada pelo cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), calculada pela massa corporal em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado, e tem o seu ponto de corte, para a normalidade, entre 19,9 a 24,9 kg/m², sendo considerado sobrepeso o IMC entre 25 a 29,9 kg/m², e obesidade IMC ≥ 30 kg/m². A obesidade é classificada em grau I, quando o IMC está entre 30 e 34,99 kg/m², em grau II, entre 35 e 39,99 kg/m² e grau III, IMC ≥ 40 kg/m² (7).

A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública, sendo classificada como uma epidemia global (8). Para Kopelman, a obesidade deve ser definida como uma doença e, que esta pode causar ou exacerbar outros problemas de saúde (9).

A origem das anormalidades metabólicas pode ocorrer durante o desenvolvimento intrauterino, uma programação fetal em um ambiente nutricional adverso. Porém fatores genéticos e/ou epigenéticos, precisam ser melhor investigados (10).

A identificação dos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais ligados à obesidade não são tão simples, entretanto, é bem documentada a maior prevalência de obesidade em filhos biológicos de pais obesos, em comparação aos filhos de pais eutróficos. Embora, as bases genéticas transmissíveis da obesidade sejam inquestionáveis, isoladamente são insuficientes para explicar o alarmante aumento da incidência da alteração em todo mundo em curto espaço de tempo; tal aumento é melhor explicado pelas mudanças comportamentais ocorridas nas últimas décadas (11).

As tendências genéticas à obesidade vêm apresentando maior expressão diante das transformações no padrão alimentar, associado aos baixos níveis de atividade física observados na sociedade atual, em consequência do processo de modernização (12; 13).

1.2. Epidemiologia.

Nos últimos anos, o crescimento do número de indivíduos com sobrepeso e obesidade revela um quadro epidemiológico preocupante. Dados da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) de 2003 revelam que a obesidade alcançou proporções epidêmicas globais, com mais de um bilhão de adultos com excesso de peso (3).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2005 eram 1.6 bilhões de pessoas, maiores de 15 anos com sobrepeso sendo, no mínimo, 400 milhões de obesos. No entanto estima-se para 2015, aproximadamente, 2.3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões com obesidade. A obesidade duplicou desde 1980, em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos, com mais de 20 anos, estavam acima do peso. Destes mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres eram obesos. Dados de 2013 da OMS apontam a Região das Américas com a maior percentagem de mulheres obesas 29,7% e, a Região Europeia com a maior incidência de obesidade em homens de 20,4% (14). Da população mundial, 65% vive em países onde o sobrepeso e a obesidade mata mais pessoas do que o baixo peso. Mais de 40 milhões de crianças menores de cinco anos estavam acima do peso em

2010. Nas análises realizadas no Relatório sobre Saúde no Mundo em 2012, 2,8 milhões de pessoas morrem por ano decorrente de doenças causadas pelo sobre peso e obesidade; globalmente, 48% de doenças cardiovasculares, 21% de certos tipos de câncer, 12% de doenças respiratórias crônicas e diabetes mellitus corresponde a 3,5% dos óbitos (15). Uma vez associada com países de alta renda, a obesidade é agora também prevalente em países de baixa e média renda.

No Brasil, uma Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF), realizada pelo IBGE em parceria com o Ministério da Saúde, constatou que 50% da população brasileira acima de 20 anos estão acima do peso. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelou ainda que 30% das crianças brasileiras entre 5 e 9 anos estão acima do peso. A distribuição geográfica dessas pessoas localiza-as nas regiões Sudeste e Sul, justamente as regiões geográficas com maior poder aquisitivo e de renda e com elevadas taxas de urbanização (16).

1.3. Os Riscos da Obesidade.

A obesidade é considerada uma desordem metabólica de etiologia multifatorial, envolvendo uma gama de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, psicológicos e sociais (17).

Embora a obesidade deva ser considerada uma doença, ela representa também um dos principais fatores de risco para outras doenças crônicas, tais como hipertensão arterial e aos altos níveis de colesterol no sangue. Em 2002 o Relatório sobre Saúde no Mundo descreveu que, aproximadamente 58% dos casos de diabete e 21% das cardiopatias isquêmicas, bem como de 8 a 42% de certos tipos de câncer, eram atribuíveis a índices de massa corporal superiores a 21 kg/m². O ganho excessivo de peso é responsável por 2 a 6% do custo total de atenção à saúde em vários países em desenvolvimento, algumas estimativas apontam para até 7%. Os verdadeiros custos são, indubitavelmente, muito mais altos, uma vez que nem toda doença associada à obesidade está incluída nos cálculos (13).

Uma cascata de desordens metabólicas está associada à obesidade, desencadeando resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, aterosclerose, , hipertensão arterial, doença cardiovascular e complicações respiratórias. Estas co-morbidades quando associadas são conhecidas como Síndrome Metabólica (SM). Ainda que a doença renal não tenha sido citada como um dos componentes da SM, o excesso de peso é uma das principais causas de

hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2, que juntos respondem por aproximadamente 70% da fase final da doença renal crônica (DRC). Estudos também sugerem que, mesmo em pacientes obesos não hipertensos e não diabéticos, há algum grau de disfunção renal, que pode levar a lesões nos rins, como alterações metabólicas e hemodinâmicas que pioram com a obesidade prolongada (9, 18).

1.4. Obesidade e Resistência à Insulina.

A associação entre obesidade e resistência à insulina foi relatada pela primeira vez em 1964, quando Randle *et al.*, demonstram que na resistência à insulina, há o aumento da concorrência entre os ácidos graxos livres (AGL) e glicose para o metabolismo oxidativo nas células sensíveis a insulina (*apud* 19). De acordo com este estudo, os ácidos graxos livres atuam como um importante fator endócrino para regular a função metabólica nos tecidos-alvos.

A insulina é um hormônio anabólico de grande importância na manutenção da homeostase da glicose, crescimento e diferenciação celular. A secreção deste hormônio é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células β pancreáticas, principalmente a glicose. No tecido adiposo a insulina atua no aumento da lipogênese, na captação de glicose e diminuição da lipólise (20).

A resistência à insulina pode ser modulada por influência ambiental, principalmente o sedentarismo e à obesidade (21), entretanto também possui um componente genético (22). Esta resistência é frequentemente agregada à hiperinsulinemia, que em obesos, parece causada por hipersecreção hormonal primária e compensatória à resistência tecidual à insulina (23). Quando a resistência está associada à obesidade, diversos estudos demonstram que a perda de peso leve (24) ou considerável (25), diminui a resistência à insulina, a secreção de insulina passa a ser mais bem regulada e os parâmetros metabólicos e hemodinâmicos tendem a retornar aos níveis normais (26).

A obesidade está diretamente relacionada com níveis elevados de insulina e, conseqüentemente, o desenvolvimento de resistência em tecidos periféricos (9). Os portadores de obesidade apresentam além da resistência às ações da insulina na musculatura esquelética, inadequada supressão da produção endógena de glicose (27) e, no que se refere às vias metabólicas das gorduras, menor supressão da lipólise pela insulina (28).

A resistência à insulina quando associada à obesidade, pode ser avaliada de duas maneiras. Randle e colaboradores em 1994 propuseram que os ácidos graxos livres competem com a glicose para a oxidação do substrato. No entanto, ao contrário do modelo de Randle, Shulman e colaboradores em 2000, propuseram que os ácidos graxos livres inibem diretamente o transporte de glicose e conduzem à fosforilação de serina/treonina do receptor de insulina, o que causa uma redução no transporte de glicose (*apud* 29).

O primeiro estudo epidemiológico associando resistência à insulina e lesão renal, foi realizado na década de 90, e destacou a albuminúria como primeiro sinal de nefropatia em diabéticos (30). Ainda, segundo Sarafidis (30), a insulina influencia a função renal e seu efeito antinatriurético pôde ser observado quando administrado agudamente.

Estudos mostram que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia ativam o Sistema Renina Angiotensina (SRA) e o Sistema Nervoso Simpático (SNS), aumentando a reabsorção de sódio e a retenção de líquido (31; 32; 33). Este estado também favorece a proliferação das células endoteliais e deposição de matriz na medula renal, aumentando a pressão renal, diminuindo o fluxo tubular e conseqüentemente aumentando a reabsorção de sódio e elevando a pressão sanguínea (34; 35; 36). Estudos mostram que a angiotensina II, uma proteína relacionada ao SRA, atua também na resistência à insulina, sendo evidenciado quando inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores do receptor AT1 (AT1R), além de levarem a redução da pressão arterial, aumentam a sensibilidade à insulina em pacientes hipertensos e resistentes à insulina (37; 38; 35).

Hiperinsulinemia, resistência à insulina e o aumento da angiotensina II, são potentes ativadores para a expressão de TGF- β 1, uma citocina que contribui para o dano glomerular (39). Este quadro de hiperinsulinemia pode promover proliferação celular e alteração renal por meio da expressão de TGF- β e baixa regulação da macula densa (29). Segundo Ku e colaboradores, a insulina pode ter efeitos angiogênicos nos glomérulos (40).

1.5. O Tecido Adiposo.

O tecido adiposo é um dos últimos tecidos do corpo humano a se desenvolver durante a vida intrauterina. Estudos morfológicos realizados em embriões humanos, porcinos e murinos, comprovaram que a adipogênese se inicia imediatamente antes do nascimento. A cronologia do aparecimento do tecido adiposo é estritamente dependente da espécie. Após desenvolvimento do tecido adiposo, os adipócitos aumentam em número (hiperplasia) até o

início da adolescência e, após este período, também passam a aumentar em tamanho (hipertrofia) durante toda a vida (41; 20). O tecido adiposo é constituído por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células imunes (leucócitos, macrófagos), matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular e nódulos linfáticos (20; 42).

Os adipócitos ocorrem isoladamente ou em grupos no tecido conjuntivo, sendo especialmente numerosos no tecido adiposo (43). À medida que estas células se aglomeram, elas aumentam de tamanho e se tornam globosas, aparecendo primeiramente, como pequenas gotículas que, posteriormente, juntam-se e formam uma única gota lipídica. Esta gota lipídica dá origem ao tecido adiposo e é composta por moléculas de lipídios que podem ser classificados conforme a sua estrutura química, ou seja, classificados como lipídios simples, compostos e derivados (44). Os lipídios simples são os triacilglicerídeos (triglicérides), considerados lipídios neutros que correspondem a cerca de 95% de todo tecido adiposo do corpo. Os lipídios compostos chamados de diacilgliceróis (diglicéridos) e, por fim, os lipídios derivados formados por substâncias derivadas dos lipídios compostos e simples, conhecidos popularmente como colesterol (45).

O tecido adiposo está localizado em inúmeras regiões do organismo, envolvendo ou mesmo se infiltrando em órgãos e estruturas internas, oferecendo proteção mecânica contra traumas externos e adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. Além disso, pela distribuição mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo, e por ser um excelente isolante térmico, tem um papel importante na manutenção da temperatura corporal, além da capacidade de armazenar energia com pouca água. A distribuição do tecido adiposo apresenta um dimorfismo relacionado ao gênero, sendo que as mulheres usualmente apresentam maior grau de adiposidade (20). Contudo, atualmente o tecido adiposo não é mais visto apenas como um órgão passivo, protetor e especializado no armazenamento de lipídeos, mas como um órgão endócrino ativo com múltiplas funções, entre elas a responsabilidade pela produção e secreção de inúmeras citocinas, tais como as adipocinas. Desta forma a secreção das citocinas influenciam na função de órgãos e sistemas, como coração, vasos sanguíneos, sistema nervoso simpático e rins (46).

O tecido adiposo exhibe tanto diferenças metabólicas quanto no padrão de expressões de adipocinas dependente da localização anatômica (47). O tecido adiposo visceral é

metabolicamente mais ativo, possui maior sensibilidade à ação da insulina, além de secretar maiores quantidades de adipocinas quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo (48).

A obesidade visceral está relacionada a respostas cardiovasculares, renais, metabólicas, protrombóticas e inflamatórias. Dentre estas respostas incluem-se resistência à insulina, disglícemia, dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipercortisolemia, hipertrigliceridemia, alterações vasculares, aumento da atividade do SNS e do SRA, hipercoagulabilidade, alteração no sistema cininas-caliceínas; que individualmente e interdependentemente, contribuem para doença renal progressiva, doença renal de estágio terminal, hipertensão e outras doenças cardiovasculares (46). Esta adiposidade visceral favorece a liberação de ácidos graxos livres diretamente na veia porta, aumentando a produção hepática de glicose e o acúmulo de lipídeos em outros tecidos fora o adiposo, sendo considerado este mecanismo um importante elo entre obesidade e o desenvolvimento de uma constelação de complicações ou co-morbidades, incluindo resistência à ação periférica da insulina. (49).

O tecido adiposo subcutâneo é menos sensível à ação da insulina, aventando uma hipótese de que a captação de triglicerídeos seja o componente que favorece ao adiposo subcutâneo esta sensibilidade à ação da insulina, exercida pelas tiazolidinedionas (50; 51). Em um estudo com cultura primária de pré-adipócitos expostos a tiazolidinedionas, apenas os pré-adipócitos de origem subcutânea se diferenciaram em adipócitos maduros quando comparados com os pré-adipócitos do adiposo visceral (52).

O tecido adiposo é fonte de uma série de citocinas, tais como a leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e também, de uma importante proteína do SRA a angiotensina II, que está envolvida no controle hidroeletrolítico e da pressão sanguínea, apresentando funções benéficas ou prejudiciais, influenciando a via inflamatória fator nuclear kappa B (NF-kB), que é um fator de transcrição, associado à atividade de doenças inflamatórias (46).

Estas citocinas são proteínas de baixo peso molecular e estão envolvidas em várias funções metabólicas e endócrinas e, são mediadores do estado inflamatório e de respostas imunes. O aumento da massa adiposa tem sido associado com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (53; 20; 54). Por outro lado, uma diminuição da interleucina-10 (IL-10) tem sido associada com o aumento de respostas inflamatórias em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica (55).

1.6. As Citocinas.

Citocinas são proteínas de sinalização celular que controlam as interações entre as células do sistema imunológico. Formam um grupo diversificado que regulam respostas inflamatórias locais e sistêmicas, dentre outros processos biológicos. Foram identificadas mais de cem citocinas estruturalmente distintas e geneticamente não relacionadas. São extremamente potentes, atuam em baixíssimas concentrações (10^{-9} – 10^{-5} M) através de sua ligação a receptores específicos nas células-alvo. A maioria delas parece atuar apenas localmente, de maneira parácrina ou autócrina. Além disso, uma citocina pode induzir a secreção de outras ou de mediadores, produzindo assim uma cascata de efeitos biológicos (56). São produzidas e liberadas por várias células como macrófagos, monócitos, linfócitos, células endoteliais e adipócitos (57; 58). A hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos está relacionada à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações estão correlacionadas com alterações na secreção das citocinas (42).

Os processos inflamatórios estão associados com o desenvolvimento da resistência à insulina, principalmente no músculo esquelético; com a diminuição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas e o desenvolvimento de alterações vasculares em indivíduos com doença metabólica. Dois mecanismos podem estar envolvidos na patogênese das alterações metabólicas associadas com a inflamação. Em primeiro lugar, a ingestão de glicose e macronutrientes provocam estresse oxidativo e alterações inflamatórias. A obesidade pode, assim, ser um estado pró-inflamatório com o estresse oxidativo. Em segundo lugar, o aumento das concentrações de TNF- α e IL-6, associado com a obesidade e diabetes do tipo 2, podem interferir na ação da insulina, por suprimir a transdução do sinal de insulina. Isto pode influenciar no efeito anti-inflamatório da insulina (59). Este aumento das citocinas está associado à resistência à insulina, por redução da fosforilação do receptor de insulina, sendo observado em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e em modelos animais desta mesma doença (58).

Numerosos estudos apontam as citocinas na patogênese da doença renal (60). A inflamação participa ativamente dos mecanismos de progressão da lesão renal em doenças de diversas causas (61). Contudo, pacientes com função renal diminuída também apresentam grau de inflamação com níveis elevados de IL-6. Há uma relação entre vários marcadores inflamatórios (PCR, IL-6 e TNF- α) e função renal, sugerindo que o rim desempenha um importante papel no *clearance* dessas citocinas (62).

1.6.1. TNF α

É uma citocina imuno-modulatória e pró-inflamatória com peso molecular de 17 kDa (62), agindo nas células adiposas, regulando o acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diferentes processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios. Esta citocina é produzida predominantemente por macrófagos ativados, monócitos e também pelo tecido adiposo, e sua proporção está correlacionada positivamente com aumento do volume de adipócitos (20). Sua produção é também estimulada pela angiotensina II (61).

O TNF- α provoca uma inibição da auto-fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor de insulina (IR) e a indução da fosforilação em serina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) nos adipócitos, inibindo a fosforilação em tirosina, levando a alterações na ação desse hormônio, com consequentes prejuízos ao metabolismo de carboidratos (59).

Os níveis de mRNA de TNF- α no tecido adiposo de camundongos obesos (*ob/ob*) são significativamente aumentados em comparação aos controles do tipo selvagem. Tem sido demonstrado que os níveis mRNA de TNF- α estão aumentados no tecido adiposo de humanos obesos em comparação com indivíduos eutróficos, e isso tem sido positivamente correlacionado com os níveis de insulina no plasma. Estudos adicionais têm relatado aumento de TNF- α no soro de seres humanos com resistência à insulina (63). Embora camundongos *knockout* para TNF- α apresentem uma proteção contra a resistência à insulina induzida por dieta, os efeitos da exclusão do receptor de TNF- α são mais complexos e precisam ser mais investigados (64).

Em um modelo experimental de glomerulopatia crescêntica, a deficiência genética de TNF- α , ou a inibição farmacológica demonstrou uma diminuição no desenvolvimento das lesões glomerulares (61). Em modelos experimentais de nefrite, essa citocina parece participar de alterações glomerulares. Ainda segundo Cho e colaboradores, um estudo em crianças com síndrome nefrótica por mínimas lesões mostrou um aumento na excreção urinária de TNF- α (65). Segundo Tang e colaboradores, no rim, a síntese de TNF- α pode ser estimulada pela angiotensina II e por proteínas de baixa densidade, iniciando assim alterações locais (66). O TNF- α promove processos inflamatórios e fibróticos nos rins (46). Esta citocina aumenta a expressão do inibidor da ativação de plasminogênio 1 (PAI-1) no tecido adiposo humano e, no obeso os níveis plasmáticos estão elevados, acarretando a redução de fibrinólise, levando a fibrose e alterações renais irreversíveis (66).

1.6.2. IL6

É uma citocina com efeitos pró e anti-inflamatórios. Apresenta massa atômica entre 22 e 27 kDa e é produzida por numerosos tipos de células do sistema imunológico, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos, células mesoteliais, fibroblastos e adipócitos, normalmente em resposta a estímulos fisiológicos, como o TNF- α , IL-1 β , endotoxinas bacterianas, exercício físico e estresse oxidativo. Células mesangiais e epitélio tubular renal também produzem IL-6 (67).

A IL-6 promove eventos inflamatórios através da ativação e proliferação de linfócitos, diferenciação das células B, recrutamento de leucócitos e indução de uma resposta de proteína de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) (62; 61). Outro efeito da citocina é sua ação no metabolismo de carboidratos e lipídios. No tecido adiposo esta citocina atua no aumento da lipólise (20). Para Carvalho e colaboradores a IL-6 tem um efeito muito mais sistêmico que TNF- α , por apresentar uma concentração alta na circulação (54).

A citocina IL-6 foi uma das primeiras a serem apontados como um mediador patogênico da resistência à insulina e doença cardiovascular. Há um aumento nos níveis de IL-6 na circulação de pacientes com diabetes tipo 2. As concentrações de IL-6 diminuem em paralelo com a perda de peso e apresentam também melhora da resistência à insulina em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. A produção de IL-6 no tecido adiposo abdominal é 3 vezes maior em comparação com o tecido adiposo subcutâneo, indicando que a IL-6 pode ser um dos fatores que torna o tecido adiposo abdominal fator de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina (68). Esta citocina pode também ter um papel importante na resistência à insulina hepática, por inibir a transdução do sinal de insulina nos hepatócito (63; 59).

Ratos induzidos à obesidade por dieta quando tratados com anti-IL-6, tem um aumento da sensibilidade à insulina, e isto parece ser devido a uma melhoria da resistência à insulina hepática. O tratamento crônico com a IL-6 inibe a autofosforilação do receptor de insulina (64).

Esta citocina está muito associada à taxa de mortalidade em pacientes com doença renal em estágio terminal segundo Pachaly e colaboradores (69). Estudos sugerem que a IL-6 é a chave para o desenvolvimento da doença renal. No modelo isquemia/reperfusão, o aumento desta, causa lesão renal, incluindo disfunção tubular e inflamação túbulo-intersticial, em decorrência do aumento da expressão de moléculas de adesão e subsequente estresse

oxidativo (66). Animais *knockout* para IL-6 apresentam uma melhora das alterações renais, comprovadas pela creatinina plasmática e histologia do órgão (70).

1.6.3. PCR

A PCR é uma proteína plasmática de fase aguda, produzida principalmente no fígado, em resposta a infecções ou estímulos inflamatórios, como IL-6 e TNF- α . Adipócitos e células vasculares endoteliais também sintetizam esta proteína (68).

Segundo Dummer e colaboradores, a PCR além da denominação de marcador de inflamação inespecífico, esta proteína *per se* parece apresentar propriedades pró-inflamatórias (71). As concentrações circulantes da PCR são consideradas como um marcador para o risco cardiovascular e também têm sido associadas à resistência à insulina. Os níveis da PCR são mais elevados em pacientes obesos, que são também resistentes à insulina e, com a perda de peso e da melhora na sensibilidade à insulina, tem-se também a diminuição nos níveis da PCR, avaliados em pacientes após cirurgia bariátrica (72). O decréscimo na sensibilidade à insulina pode levar ao aumento da expressão da PCR pela diminuição dos efeitos fisiológicos da insulina (efeitos anti-inflamatórios) na síntese hepática de proteínas de fase aguda (73). Outro estudo demonstrou correlação positiva entre a PCR e os componentes da síndrome metabólica: glicemia, circunferência da cintura, triacilglicerol, HDL-colesterol, pressão arterial sistólica e diastólica, IMC, insulina e HOMA-IR (68).

A PCR possui funções imuno-reguladoras como o recrutamento e ativação do sistema complemento, o aumento da reatividade leucocitária, e o estímulo da liberação de citocinas como a IL-1, IL-18, IL-6 e o TNF- α (72).

Nefrologistas também consideram os níveis da PCR como marcador de mortalidade no doente renal ou em pacientes com doença renal crônica em estágio terminal (74). Para Dummer e colaboradores, este marcador é encontrado em pacientes com doença renal crônica em diferentes fases da sua progressão (71).

1.6.4. Adiponectina

A adiponectina é um hormônio secretado quase que exclusivamente pelo tecido adiposo (adipócitos diferenciados) e é inversamente proporcional à quantidade deste tecido (20; 75). Possui um peso molecular de 30 kDa e sua concentração circulante é elevada (500 - 30.000 $\mu\text{g/L}$), representando 0,01% do total de proteínas plasmáticas (20). Sua ação é

aumentar a sensibilidade à insulina e diminuir a inflamação. Apesar da produção no tecido adiposo, na obesidade sua concentração plasmática é reduzida (76). Em animais a diminuição dos níveis de adiponectina está relacionada a um aumento na prevalência de diabetes tipo 2, inflamação e aterosclerose, no entanto, essas doenças são reversíveis com reposição de adiponectina (77).

Numerosos estudos sugerem que a adiponectina atua sobre o fígado, suprimindo a produção de glicose. Além disso, camundongos *knockout* para adiponectina (adipo -/-) têm uma diminuição da sensibilidade à insulina (20). A adiponectina atua também na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e na diminuição da produção de TNF- α e IL-6 (29).

A redução nos níveis de adiponectina e seus efeitos anti-inflamatórios podem ser importantes no desenvolvimento de danos renais na obesidade e na resistência à insulina, entretanto segundo Knight e Imig, estes mecanismos precisam ser mais investigados. Como na obesidade a adiponectina está diminuída, o indivíduo fica mais susceptível aos efeitos do excesso de peso sobre alterações metabólicas e cardiovasculares (29).

Recentes estudos sugerem que a adiponectina tem um importante papel no desenvolvimento de albuminúria relacionada à obesidade e alterações da função renal (66). Segundo Sharma e colaboradores, camundongos *knockout* para adiponectina (adipo -/-) apresentam aumento de creatinina plasmática, simplificação de podócitos com perda da permeabilidade seletiva destes, o que promove elevação na excreção urinária de peróxido de hidrogênio e albumina. Estes animais quando tratados com adiponectina apresentam normalização da albuminúria, da estrutura dos podócitos, aumento da atividade da AMPK glomerular e redução urinária e glomerular de marcadores de estresse oxidativo. Em cultura de podócitos, a administração de adiponectina aumentou a atividade da AMPK e ambos, adiponectina e AMPK, reduzem a permeabilidade dos podócitos à albumina (78).

1.6.5. Leptina

A leptina foi a primeira adipocina descrita (1994), sendo inicialmente identificada como um modulador do comportamento alimentar. É uma proteína com peso molecular de 16kDa, produto do gene *Ob* e é também considerada uma adipocina pró-inflamatória (42; 79). É um hormônio derivado do tecido adiposo principalmente subcutâneo e está relacionado com alguns fatores metabólicos, inflamatórios e hemostáticos, e sua concentração plasmática está diretamente proporcional à quantidade de tecido adiposo, sendo considerado um mensurador de depósitos lipídicos do organismo (lipostato). A obesidade induz resistência à leptina em

tecidos periféricos, incluído rim, fígado, miocárdio e vasos (66). Localmente a leptina atua na lipólise e oxidação lipídica. Sua influência no perfil inflamatório está na capacidade de aumentar a produção de citocinas nos macrófagos, agindo como um potente quimio-atraente, induzindo a produção de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α e IL-6 (80; 20; 19). Durante condições inflamatórias a produção de leptina está aumentada (19).

A leptina possui também um efeito regulador da pressão sanguínea, observando uma resposta pressórica atribuída à ativação central do sistema simpático e uma resposta depressora periférica atribuída à síntese de óxido nítrico, propondo que a leptina tem dupla atuação, produzindo simultaneamente uma ação pressórica neurogênica e uma resposta depressora vascular mediada por óxido nítrico (20).

Com a concentração plasmática de leptina aumentada na obesidade, a regulação da pressão sanguínea pode ocorrer também pelos mecanismos: ativação do eixo pituitário-adrenal, alterações no balanço hidroeletrólítico, deposição de colágeno mesangial nos glomérulos e remodelamento vascular, além disso, contribui para a resistência à insulina (46). A leptina coopera para o desenvolvimento da doença renal, pela ligação ao receptor específico nas células endoteliais glomerulares, estimulando a proliferação celular, deposição de matriz extracelular, proteinúria, a síntese de TGF- β e produção de colágeno tipo IV (46; 66). Avaliações realizadas em camundongos *knockout db/db*, que são deficientes no receptor de leptina, mostraram um aumento na taxa de filtração glomerular (81).

Embora a sinalização da leptina seja mais complexa em seres humanos, a perda da função renal origina concentrações séricas elevadas de leptina (58).

1.7. Obesidade e Função Renal.

No mundo ocidental a prevalência de Doença Renal Crônica (DRC) tem aumentado, em paralelo com o aumento do número de indivíduos obesos. Vários estudos tem demonstrado uma associação consistente entre o risco da DRC e o aumento do IMC (39).

Em 1974 Weisinger e colaboradores associaram pela primeira vez função renal e obesidade. Esta nefropatia associada à obesidade foi descrita em um paciente com obesidade mórbida, que apresentava proteinúria nefrótica. Em consequência, vários estudos clínicos e experimentais têm sido realizados associando obesidade, dislipidemia e doença renal, com a glomerulosclerose segmentar e focal (GESF) como padrão histológico (*apud* 82; 83). A GESF secundária à obesidade pode ser diferenciada da GESF idiopática pela presença de

glomerulomegalia, alterações menos intensas nos podócitos, apresentação clínica mais branda e menor incidência de proteinúria nefrótica (84; 85).

Alteração renal em paciente obeso é conhecida como glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO). Morfologicamente, esta GRO foi definida como uma glomerulomegalia com ou sem GESF. Os mecanismos que causam esta alteração não são completamente conhecidos, porém estudos têm demonstrado que a hiperfiltração glomerular tem um importante papel no desenvolvimento da glomerulopatia, sendo evidenciada pela glomerulomegalia e glomeruloesclerose segmentar focal em biópsias desses pacientes com GRO (86).

Um estudo realizado em vários países pôde diagnosticar diferentes causas para a doença renal crônica, com prevalência de diabetes e hipertensão, nos países avaliados (87).

Existe evidência que a obesidade aumenta o risco para doença renal crônica em 4 vezes e o diabetes é a causa principal para a insuficiência renal, com pacientes diabéticos, representando 44% dos novos casos de insuficiência renal (29).

Obesidade e hiperinsulinemia têm sido associadas a alterações na hemodinâmica glomerular (88). Segundo Nerpin e colaboradores, a redução da sensibilidade à insulina pode estar relacionada ao desenvolvimento de alterações renais por um aumento nos níveis de glicose e que a insulina *per se* estimula a expressão e ativação de IGF-1, TGF- β , endotelina-1 e componentes do SRA que, mostram promover processos fibróticos e mitogênicos nos rins, tais como proliferação de células mesangiais e expansão da matriz extracelular (89).

Segundo Kramer e Luke, dados epidemiológicos tem como hipótese que a obesidade *per se*, aumenta o risco de dano renal (90). Em um estudo realizado entre 1996 e 1998 na Suíça, a obesidade contribui para a crescente carga de insuficiência renal crônica em homens e mulheres (91).

Indivíduos obesos apresentam um aumento de 50% na taxa de filtração glomerular quando comparados com magros. Da mesma maneira se comporta o fluxo plasmático renal, que no obeso apresenta-se em torno de 30% maior que em indivíduos eutróficos (92). No obeso a taxa de filtração elevada leva a um aumento na fração de filtração, uma vasodilatação da arteríola eferente, podendo resultar em uma hiperfiltração renal, aumento da pressão dos capilares glomerulares e conseqüentemente dano renal (18). Este aumento na fração de filtração resulta em um aumento na reabsorção de sódio por um aumento da pressão pós-glomerular. O aumento na reabsorção de sódio e conseqüentemente a diminuição do *delivery* de sódio na mácula densa causa um *feedback* estimulando a hiperfiltração. Isto poderia

explicar a razão pela qual a obesidade está associada à vasodilatação renal, hiperfiltração glomerular e estimulação da liberação de renina, mesmo com retenção de sódio e expansão do volume de líquido extracelular (93; 18).

Apesar do aumento inicial na taxa de filtração glomerular atuar como um mecanismo compensatório para manter o equilíbrio de sódio, com a obesidade prolongada a vasodilatação renal e hiperfiltração glomerular, juntamente com o aumento da pressão arterial e alterações metabólicas, podem causar lesão renal e um declínio na taxa de filtração glomerular (18).

Microalbuminúria tem sido descrita como uma manifestação inicial de doença renal associada à obesidade e nefropatia diabética, porém está associada com resistência a insulina, independente de diabetes, embora a fisiopatologia desta associação ainda seja desconhecida (39).

A presença de albuminúria é considerada um fator de risco para doença renal e cardiovascular. Estudos epidemiológicos sugerem que a microalbuminúria está associada a um aumento da morbidade cardiovascular (77). Em pacientes com IMC > 30 kg/m² e que foram submetidos à nefrectomia unilateral, após 13,6 ± 8,6 anos de cirurgia, 92% desenvolveram proteinúria ou insuficiência renal, e apenas 12% dos pacientes com IMC < 30 kg/m² submetidos ao mesmo processo cirúrgico, desenvolveram as mesmas alterações (18).

O acúmulo de lipídios nos macrófagos pode alterar o fenótipo dessas células, favorecendo um ambiente pró-inflamatório responsável pelas modificações fisiopatológicas dos rins associadas à obesidade. Protocolos experimentais e estudos clínicos têm demonstrado que a inibição da ECA ou o bloqueio dos receptores AT1R diminuem a evolução da doença renal não só por controlarem a hipertensão arterial, mas também por exercerem efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-oxidativos. De maneira geral, as lesões permanentes se devem a apoptose tubular e fibrose renal. A apoptose das células tubulares renais e a fibrose são mediadas por citocinas tais como o TGF-β1 e o TNF-α (61; 83).

A associação entre obesidade, disfunção renal e glomerulosclerose sugere que a obesidade pode ser uma causa primária de doenças renais (94). Há aproximadamente 35 anos atrás, Weisinger e colaboradores, descreveram a glomerulosclerose segmentar focal com síndrome nefrótica em quatro pacientes extremamente obesos (*apud* 82). Na obesidade, a glomerulopatia e glomerulomegalia são os sinais anatomopatológicos mais comuns de doença renal. A disfunção renal é tão importante quanto a hipertensão arterial em pessoas obesas. Este aumento de pressão arterial está associado ao aumento na reabsorção de sódio, à

expansão do volume extracelular e a uma ação compensatória na taxa de filtração glomerular para manter o balanço de sódio em obesos (95).

Em um estudo experimental, para avaliar a relação entre obesidade e função renal, cães foram alimentados com uma dieta rica em gordura e os resultados obtidos foram vasodilatação renal, hiperfiltração glomerular, albuminúria, e mudanças histopatológicas, incluindo aumento do espaço na cápsula de Bowman, aumento da proliferação de células glomerulares e matriz mesangial, espessamento das membranas basais e um aumento na expressão do fator de transcrição glomerular β (95; 83).

A relação entre o excesso de peso e mortalidade cardiovascular está estabelecida, porém, poucos estudos no homem, avaliam a influência da obesidade sobre o risco de desenvolvimento de doença renal (96; 97).

1.8. Obesidade e Pressão Arterial.

Outra co-morbidade muito associada à obesidade é a hipertensão arterial (33). Quando relacionamos ambas, o tecido adiposo tem grande interferência por ser a segunda maior fonte de angiotensinogênio (98). Tanto o homem como o rato, expressam no tecido adiposo, as proteínas do SRA: angiotensinogênio, enzima conversora da angiotensina (ECA), renina, receptores 1 e 2 da angiotensina II (AT1R e AT2R) e angiotensina II (20), independente da quantidade circulante na corrente sanguínea (99; 100).

Glândulas adrenais, rins, fígado, coração, vasos sanguíneos, cérebro e órgãos reprodutores apresentam também síntese de componentes do SRA, implicando que estes tecidos têm a habilidade de sintetizar angiotensina II, independente da concentração sistêmica. Evidências mostram a formação de angiotensina II no tecido adiposo, porém os efeitos fisiológicos do SRA no tecido ainda não foram muito explorados (101). Alguns estudos focam no efeito da angiotensina II no adipócito de roedores e humanos, devido à presença de ambos receptores AT1R e AT2R (102). A angiotensina II produzida localmente parece participar do crescimento e desenvolvimento de adipócitos. Neste tecido, a angiotensina II estimula a produção de prostaciclina, que por sua vez, desencadeia a conversão de pré-adipócitos em adipócitos e aumenta a síntese e armazenamento de lipídios nos mesmos. A angiotensina II secretada pelo tecido adiposo pode contribuir para a associação entre obesidade e hipertensão (99). Estudos mostram que a circulação de angiotensinogênio, renina, aldosterona e a ECA, estão aumentadas em pessoas obesas e, a diminuição das mesmas,

acontece com a perda de peso (103). Assim, o SRA associado à obesidade pode desencadear uma série de desordens cardiovasculares, metabólicas e renais, incluindo hipertensão, diabetes, aterosclerose e doença renal crônica (18).

O *cross-talk* entre leptina e insulina pode ter implicações na fisiopatologia da disfunção vascular, particularmente na hipertensão arterial relacionada à obesidade. A insulina pode interagir com a leptina modulando a função vascular. O mecanismo pelo qual a leptina induz a produção de óxido nítrico em alguns leitos vasculares é, em parte, relacionado à ativação da via de fosforilação Akt-eNOS. Assim, a insulina aumenta a vasodilatação dependente da leptina por aumentar a liberação do Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) e por potencializar a Proteína Kinase B (AKt) e a fosforilação da eNOS. Carvalho e colaboradores citam ainda estudos em ratos mostrando a leptina aumentando a sensibilidade da insulina, podendo melhorar a resposta vascular à insulina em estados de resistência à insulina (54).

Diabetes e hipertensão são fortemente relacionados ao desenvolvimento e progressão da doença renal crônica. A hipertensão arterial sistêmica é a causa de aproximadamente 27% de todas as doenças renais. Estudos experimentais têm mostrado similaridades entre os processos sistêmicos de aterosclerose e glomerulosclerose, sugerindo mecanismos biológicos análogos. As ações que desencadeiam a glomerulosclerose ainda são incertas, porém fatores de risco fundamentais para o desenvolvimento de aterosclerose, tais como obesidade, sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool, podem favorecer a doença renal crônica (94). A relação entre ganho de peso e hipertensão fica evidente em dois estudos, onde um ganho de 1.7 kg/m² para homens e 1.25 kg/m² para mulheres no IMC, ou um aumento de 4.5cm para homens e 2.5cm para mulheres na circunferência abdominal, correspondem a um aumento de 1mmHg na pressão sanguínea sistólica. E, aproximadamente 75 e 65% dos casos de hipertensão em homens e mulheres, respectivamente, estão diretamente associados à obesidade (34; 95).

1.9. Obesos Saudáveis.

A obesidade está associada a alterações metabólicas, contudo fenótipos atípicos vêm sendo evidenciados. O excesso de adiposidade pode existir sem alterações metabólicas tais como dislipidemia, resistência à insulina, hipertensão arterial e perfil inflamatório. Este

elevado grau de heterogeneidade entre os obesos pode estar relacionado à dieta e ao estilo de vida (104).

Inúmeros estudos se dividem em diferentes critérios para definição dos obesos sem alterações metabólicas, sendo nomeados de “obesos metabolicamente saudáveis” (105; 106; 107; 108; 109). Devido a diferentes critérios para classificação deste grupo de obesos, a prevalência destes varia de estudo para estudo. Para Karelis e colaboradores 30% dos obesos são considerados metabolicamente saudáveis (110).

Este fenótipo de obesidade metabolicamente saudável pode iniciar na infância, porém estes indivíduos podem deixar de serem saudáveis ao longo da vida (111). Assim, tem sido demonstrado que a obesidade saudável diminui com a idade (104). Para Appleton e colaboradores, o estado de obesidade saudável é transitório em um terço dos indivíduos obesos metabolicamente saudáveis; este autor sugere ainda que seja necessário o acompanhamento periódico desses pacientes por longos anos, para assim entender melhor e determinar a transição entre o estágio transitório de obesidade saudável para o estágio não saudável (112).

O perfil inflamatório também tem sido avaliado entre os obesos metabolicamente saudáveis, podendo-se observar um estado inflamatório mais atenuado neste grupo. Níveis reduzidos de TNF- α , IL-6 e PCR foram observados neste grupo de obesos metabolicamente saudáveis (113; 114; 107). Quanto aos níveis séricos de adiponectina, o obeso metabolicamente saudável aparentemente apresenta maiores níveis (108). Estudo em roedores adipo +/- evidenciou que o tratamento com adiponectina promoveu uma flexibilidade metabólica nestes animais, quando comparados à animais selvagens, ambos tratados com dieta rica em gordura (75). Isso pode explicar por que o obeso metabolicamente saudável consegue manter a função metabólica adequada mesmo sob circunstâncias adversas, como uma dieta altamente calórica.

Contudo, resultados de estudos da função tubular renal em obesos metabolicamente saudáveis são controversos. Segundo Knight e colaboradores, a obesidade *per se* aumenta os riscos para a doença renal. No entanto, estudos adicionais necessitam ser implementados para evidenciar o resultado da associação de obesidade, resistência à insulina e a função renal (29).



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.

Tendo em conta as fundamentações acima, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a composição corporal, sensibilidade à insulina, a resposta inflamatória e pressórica e, a função renal em voluntários obesos ($IMC \geq 30\text{kg/m}^2$) comparados a um grupo de voluntários eutróficos - grupo controle ($IMC \leq 24,9\text{kg/m}^2$). Os estudos de sensibilidade à insulina e função renal ocorreram antes e após a sobrecarga oral de glicose, utilizando a curva glicêmica e o *Clearance* de Creatinina e Lítio respectivamente.

2.2. Objetivos Específicos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a composição corporal, à sensibilidade à insulina e a tolerância à insulina nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar o perfil lipídico, as concentrações séricas de ácido úrico, ácidos graxos livres, TNF- α , IL-6, PCR, adiponectina e leptina em condições de jejum nos grupos estudados;
- Avaliação da pressão arterial nos grupos estudados;
- Avaliar taxa de filtração glomerular, *clearance* de lítio, fração de excreção proximal de sódio, fração de excreção pós-proximal de sódio, fração de excreção de sódio e fração de excreção de potássio em jejum e após o estímulo da glicose, durante 120 minutos;
- Avaliar proteinúria no período basal;



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Tipo, População e Local de Estudo.

O estudo, do tipo epidemiológico foi realizado em adultos com idade entre 18 e 58 anos, da cidade de Campinas e Franco da Rocha (São Paulo) no período de novembro de 2009 a novembro de 2011.

3.2. Tamanho da Amostra.

Avaliou-se 27 voluntários obeso ($IMC \geq 30$), e 13 voluntários eutrófico ($IMC \leq 24,9$), não pareados quanto a sexo e idade.

3.3. Métodos de Convocação.

O recrutamento dos voluntários obesos e eutróficos foi realizado pela divulgação da pesquisa por meio do site da Universidade Estadual de Campinas; de cartazes informativos nos Departamentos e Institutos da mesma Universidade; em uma academia da cidade de Franco da Rocha (São Paulo) e convites orais em reuniões do Grupo de Cirurgia da Obesidade do Hospital das Clínicas – Unicamp.

3.4. Critérios de Inclusão e Exclusão.

Os critérios de inclusão foram: indivíduos entre 18 e 60 anos de idade, sedentários $IMC \geq 30\text{kg/m}^2$ para os indivíduos obesos e até $24,9\text{kg/m}^2$ para o grupo controle (7). Os critérios de exclusão foram: hipertensão arterial, diabetes mellitus, reposição hormonal, insuficiências renal e hepática, uso de corticoides ou outros fármacos que interfeririam na sensibilidade e secreção de insulina e na função renal. Pacientes com parentesco em primeiro grau de indivíduos com hipertensão arterial e diabetes mellitus também foram excluídos das amostras em estudo.

3.5. Aspectos Éticos.

Todos os voluntários incluídos foram informados e esclarecidos previamente sobre a pesquisa. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas sob o número 1221/2009.

No momento da assinatura do termo de consentimento, o voluntário foi orientado a comparecer em data e local específico para a realização da avaliação pertinente à pesquisa, na Unidade Metabólica, no Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.6. Parâmetros Clínicos e Laboratoriais Avaliados.

Os pacientes foram avaliados quanto à função renal, pressão arterial, sensibilidade e secreção de insulina, tolerância à glicose, citocinas plasmáticas e composição corporal. O estudo englobou registro de dados como: idade, sexo, período menstrual, tabagismo, etilismo, uso de medicamento, antecedentes de doenças pessoais e familiares.

3.7. Protocolo Experimental.

Os voluntários foram submetidos a avaliação corporal através das Medidas Antropométricas e Bioimpedância. Em seguida realizou-se Avaliação da Pressão Arterial, Avaliação da Função Glomerular e Tubular Renais pelo *Clearance* de Lítio e Creatinina, Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG) e Teste de Tolerância à Insulina (Kitt).

3.8. Medidas Antropométricas.

A mensuração da massa corporal foi realizada utilizando balança mecânica da marca Welmy com precisão de 100 g, sendo que o voluntário encontrava-se vestindo roupas leves e sem sapato. Para a medida da altura foi utilizado um estadiômetro acoplado à balança com divisão de 0,5cm. As medidas foram também realizadas com os indivíduos descalços (7).

3.9. Fórmula para Cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC).

O IMC foi calculado pela divisão da massa corporal, em quilos, pela altura, em metros, ao quadrado. A classificação do estado nutricional por IMC foi realizada, para ambos os sexos, através dos critérios da Organização Mundial de Saúde (7).

3.10. Avaliação da Composição Corporal.

A avaliação da composição corporal por Bioimpedância Elétrica (BIA) foi realizada utilizando-se aparelho Biodynamics Modelo 310, após um jejum de 12 horas. Além disso, os pacientes foram orientados a não ingerir bebida alcoólica, café, bebidas à base de cola, guaraná, chá mate ou preto e a não praticar exercícios físicos no dia anterior aos exames (115). No exame da Bioimpedância, os valores de massa magra, massa hídrica e de gordura corporal e a percentagem de gordura corporal foram estimados através de equações contidas no software do próprio aparelho, utilizando os valores de bio-resistência obtidos em cada paciente.

a-) Avaliação pela BIA.

A Bioimpedância Elétrica é conceituada como um método simples, não invasivo, para quantificação dos componentes da composição corporal. Um procedimento de fácil aplicação e desempenho, que requer pouco tempo para a medida, não causa desconforto, permitindo estimar, de forma válida e precisa, a massa livre de gordura, a gordura corporal total, a água corporal total e a massa celular (115). Baseia-se no princípio de que a impedância, resultante das resistência e reatância ao fluxo elétrico, se relaciona ao volume e a composição corporal como agente condutor de energia. No organismo humano, o tecido magro, altamente condutivo, contém grandes quantidades de água e eletrólitos com baixa resistência elétrica (impedância), porém, a gordura composta de lipídeos e triacilgliceróis e os ossos, são condutores fracos, caracterizando-se como uma via de alta resistência elétrica, com baixa concentração de água e eletrólitos condutores (116; 117).

3.11. Avaliação da Pressão Arterial.

A pressão arterial foi aferida por esfigmomanômetro de mercúrio, após repouso mínimo de 15 minutos em decúbito dorsal. Quando o diâmetro do braço era maior que 30 cm, foram utilizadas braçadeira e *Cuffs* apropriados (118). Foram obtidas três aferições, com intervalo de 1 minuto entre elas. A média das duas últimas medidas foi computada.

Foram considerados o primeiro e o último som de Korotkof para a pressão sistólica e diastólica respectivamente. Hipertensão arterial foi definida como pressão arterial sistólica maior que 140 mmHg ou pressão diastólica maior que 90mmHg, de acordo com critérios das Diretrizes Brasileiras de 2011 (119).

3.12. Avaliação da Função Glomerular e Tubular Renal pelos *Clearances* de Lítio e Creatinina Concomitantemente com a Curva Glicêmica

Uma única dose de um comprimido de carbonato de lítio (Li_2CO_3) 300 mg foi administrada ao paciente, no dia anterior ao procedimento, às 18 horas. O Li_2CO_3 é habitualmente utilizado como marcador da manipulação tubular renal de sódio e água (120). No dia subsequente assim que paciente se apresentava na Unidade Metabólica foram realizados os procedimentos de aferição da pressão arterial, massa corporal e altura. Após a realização das medidas foi calculado o IMC e em seguida uma sobrecarga hídrica foi administrada, por via oral, a um intervalo de 20 minutos. Essa sobrecarga correspondia a um volume hídrico de 20 ml para cada quilo de massa. Para voluntários com $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ a sobrecarga foi calculada para um IMC de 25 Kg/m^2 . Após a ingestão da sobrecarga hídrica, o voluntário foi orientado a esvaziar a bexiga e a partir de então teve início o período basal de coleta de urina (tempo 0). A seguir procedeu-se a punção de veia ante-cubital de um dos membros superiores com Scalp nº 19 ou 20, mantida pérvia com solução de heparina 1:125, administrada a cada coleta de amostras de sangue. A aferição da pressão arterial foi realizada em intervalos de 60 minutos no braço contralateral a venóclise.

A coleta de urina foi realizada por micções espontâneas, a intervalos de 1 hora, medindo o volume gravimetricamente, e recolhendo alíquotas para dosagens posteriores. Após cada micção era feita reposição hídrica pela ingestão de um volume de água, semelhante ao volume urinário imediatamente coletado no período anterior. Foram coletadas amostras no tempo basal (identificado como tempo 0, sendo a primeira coleta após 60 minutos da sobrecarga hídrica). Neste momento foi administrado via oral 75g de glicose para a realização da curva glicêmica (vide item 3.15). Após a coleta basal foram realizadas coleta de urina e sangue nos tempos 60 e 120 minutos, para a avaliação da função renal. As amostras de sangue foram subdivididas e acondicionadas em dois frascos, um contendo fluoreto de sódio a 2% e outro sem anticoagulante, de forma a obtermos após centrifugação, soro e plasma. As

amostras de sangue e urina, colhidas nos horários especificados, foram estocadas em freezer a -20°C para determinações analíticas posteriores.

As variáveis avaliadas para a função renal foram volume urinário, *clearance* de lítio e creatinina, fração de excreção de sódio, fração de excreção proximal e pós-proximal de sódio e fração de excreção de potássio. Para os cálculos das variáveis funcionais renais, tendo em conta que estudamos indivíduos com diferentes constituições corporais de gordura e massa magra, utilizamos um fator de correção massa magra (mm)/massa total (mt), ambos em quilogramas para corrigir diferenças de massa magra entre os grupos estudados.

3.13. Determinação das Concentrações de Sódio, Potássio, Lítio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias.

As concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, potássio e lítio foram determinadas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil). Os metais alcalinos quando submetidos à alta temperatura, absorvem energia da fonte de calor tornando-se excitadas em sua forma atômica. Quando resfriados, estes átomos voltam ao estado normal não excitado, reemitindo sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais na região visível da luz (Na^+ 589nm, Li^+ 670nm, K^+ 768nm). Quando aspirado através de uma chama de baixa temperatura, o metal alcalino emite depois de excitado pelo calor da chama, uma discreta onda de frequência, a qual pode ser isolada por um filtro ótico. Essa emissão é proporcional ao número de átomos excitados, portanto, a concentração do íon na amostra.

A creatinina plasmática e urinária foi determinada pelo método colorimétrico por espectrofotometria utilizando-se um espectrofotômetro Micronal B462. A creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo avermelhado. Nesse pH alcalino ocorre a formação do complexo creatinina-picrato. Com a diminuição do pH por adição de ácido, a coloração devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromógenos. Pela diferença entre as duas leituras obtidas pelo pH ácido, tem-se o real valor da creatinina.

3.14. Fórmulas para Cálculo do *Clearance* e de Frações de Excreção.

a) Taxa de Filtração Glomerular estimada pelo *Clearance* de Creatinina (C_{Cr}):

Corresponde à depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula $(U.V/P)$, sendo U a concentração urinária de creatinina, V o fluxo urinário dividido pelo período de coleta em minutos multiplicado pela razão: massa magra dividida pela massa total, e P a concentração plasmática de creatinina. Os resultados foram expressos em ml/min/(mm/mt).

b) Fração de Excreção de Sódio (FE_{Na}):

Corresponde à fração da carga filtrada de sódio excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula $(C_{Na}/C_{Cr}).100$, sendo C_{Na} o *clearance* de sódio (sódio urinário x volume urinário/sódio plasmático), C_{Cr} o *clearance* de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

c) Fração de Excreção de Potássio (FE_K):

Corresponde à fração da carga filtrada de potássio excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula $(CE_K/CF_K).100$, sendo CE_K a carga excretada de potássio (volume urinário x potássio urinário/1000), e CF_K a carga filtrada de potássio (*clearance* de creatinina x potássio plasmático/1000). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

d) Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP_{Na}):

Corresponde à fração da carga filtrada de sódio excretada ao longo do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula $(C_{Li}/C_{Cr}).100$, sendo C_{Li} *clearance* de lítio (lítio urinário x volume urinário/lítio plasmático), e C_{Cr} *clearance* de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

e) Fração de Excreção Pós-Proximal de Sódio ($FEPP_{Na}$):

Corresponde à fração da carga filtrada de sódio excretada ao longo dos segmentos distais do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula $(C_{Na}/C_{Li}).100$, sendo C_{Na} *clearance* de sódio e o C_{Li} , o *clearance* de lítio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

f) Carga Filtrada de Sódio (CF_{Na}):

Corresponde à carga total de sódio filtrada pelos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula ($C_{Cr} \cdot P_{Na}$), sendo C_{Cr} *clearance* de creatinina, P_{Na} a concentração plasmática de sódio. Os resultados foram expressos em ml/min/(mm/mt).

g) Carga Excretada de Sódio (CE_{Na}):

Corresponde à carga total de sódio excretada pelos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula ($V \cdot U_{Na}$), sendo V o fluxo urinário dividido pelo período de coleta em minutos multiplicado pela razão: massa magra dividida pela massa total, e U_{Na} a concentração urinária de sódio. Os resultados foram expressos em ml/min/(mm/mt).

3.15. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG).

Esse teste avaliou a tolerância à glicose e a secreção de insulina em resposta à ingestão de glicose. Os voluntários compareceram pela manhã em jejum de 12 horas de alimentos e 4 horas de água. O teste foi realizado em ambiente tranquilo com temperatura constante ao redor de 25°C. O teste foi precedido de um período basal de 60 minutos. Nesta fase, foram colhidas amostras de sangue para dosagens de glicemia e insulinemia. Os voluntários permaneceram em repouso durante todo o experimento. Foram então, administradas, por via oral, 75 gramas de glicose, em solução aquosa em um volume final de 300 ml, ingeridas em até 5 minutos (tempo zero – início da ingestão). Após a ingestão de glicose, seguiu-se um período experimental de 120 minutos, durante o qual foram coletadas amostras de sangue nos tempos 30', 45', 60', 90' e 120' seguintes à ingestão de glicose, para as análises séricas de insulina, glicose e peptídeo C.

1. A sensibilidade à insulina foi estimada a partir da insulinemia e glicemia de jejum, utilizando a fórmula descrita:

✓ HOMA-IR - para avaliar a sensibilidade: $(I0 \times G0)/22,50$ (121; 122).

Onde, **G0** = glicemia de jejum, mmol/dl e **I0** = insulinemia de jejum, mU/ml.

2. A resistência à insulina foi estimada a partir da insulinemia e glicemia de jejum, utilizando a fórmula descrita:

✓ QUICKI - para avaliar a resistência: $1/(\log I0) + (\log G0)$; (121; 122).

Onde **G0** = glicemia de jejum, mg/dl e **I0** = insulinemia de jejum, mU/ml.

3. A funcionalidade das células β pancreáticas foi estimada a partir da insulinemia e glicemia de jejum, utilizando a fórmula descrita:

- ✓ % Células β - para avaliar a percentagem de células β funcionantes: $(20 \times I_0)/(G_0 - 3,5)$; (121; 122).

Onde **G0** = glicemia de jejum, mmol/dl e **I0** = insulinemia de jejum, mU/ml.

3.16. Fórmula para Cálculo das Curvas (ASC) de Glicose e Insulina no Teste de Tolerância Oral à Glicose.

As áreas sob as curvas de insulina e glicose após o TTOG foram obtidas através do cálculo da área do trapézio considerando-se toda a área sob as respectivas curvas (123). Áreas incrementais foram calculadas como a diferença entre a ASC total e a área que seria obtida se o valor basal de insulina ou glicose fossem mantidos ao longo do tempo experimental ($ASC_{incr} = ASC_{total} - (\text{valor basal} \times \text{tempo experimental em min})$).

3.17. Teste de Tolerância à Insulina (TTI).

Para avaliar a sensibilidade periférica à ação da insulina, foi também realizado o teste de tolerância à insulina, logo após a curva glicêmica e o *clearance* de lítio e creatinina, com coleta de sangue no tempo zero e seguida da infusão de 0,1U de insulina regular humana por quilograma de massa corporal diluída em 0,9ml de solução salina 0,9%. Amostras de sangue venoso foram coletadas nos tempos: 3, 6, 9, 12 e 15 minutos após o final da infusão de insulina. Essas amostras ficaram acondicionadas em tubos de vidro com fluoreto de sódio a 2% e, posteriormente, após separação do soro, foram utilizadas para a determinação da glicose sérica. Para calcular a velocidade de desaparecimento da glicose (K_{tti}) durante os 15 minutos, ou seja, índice de sensibilidade à insulina, foi utilizado a seguinte equação: $K_{tti} = 0,696/t_{1/2}$ (122).

3.18. Acondicionamento das Amostras.

As amostras de sangue e urina coletadas, foram imediatamente identificadas e colocadas na geladeira, ao término do estudo, foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a

4°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R), a 3.000 rpm, por 15 minutos. Foram a seguir divididas em alíquotas e armazenadas em freezer -20°C, para posteriores dosagens.

3.19. Métodos Analíticos.

Proteinúria: As dosagens foram realizadas em urina pelo método de vermelho de pirogalol e molibdato de sódio, por espectrofotometria.

Glicose: Método enzimático, automatizado através de equipamento bioanalisador de glicose YSI 2300.

Colesterol e frações: método colorimétrico automatizado, realizado no laboratório de bioquímica do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Triglicérides: método colorimétrico automatizado, realizado no laboratório de bioquímica do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Ácido Úrico: método colorimétrico automatizado, realizado no laboratório de bioquímica do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Método Elisa: Estes ensaios empregaram a técnica de imuno-ensaio sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para a substância alvo foi pré-adicionado em uma microplaca ainda na fábrica. As amostras, controles e padrões foram pipetados para os poços e se a substância em estudo estivesse presente seria ligada pelo anticorpo imobilizado. Depois de lavar as substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal com enzima ligada específica para a substância foi adicionado aos poços. Após uma lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato foi adicionada aos poços. A enzima de reação produz um produto azul que fica amarelo quando a “solução de parada” foi adicionada. A intensidade de medição de cor está em relação direta com a quantidade de substância alvo ligado na etapa inicial. Os valores da amostra foram então lidos a partir da curva padrão.

Para as reações realizadas neste projeto, foram usados kits comerciais de Elisa:

- Adiponectina: Método imunoenzimático – Elisa – Kit MILLIPORE- Billerica, USA, sensibilidade: 0,155 ng/mL.
- IL-6: Método imunoenzimático – Elisa - Kit R&D SYSTEMS® - Minneapolis, USA, sensibilidade: 0,039 pg/mL.
- Leptina: Método imunoenzimático – Elisa – Kit MILLIPORE - Billerica, USA, sensibilidade: 0,195 ng/mL.
- TNF- α : Método imunoenzimático – Elisa – Kit R&D SYSTEMS® - Minneapolis, USA, sensibilidade: 0,106 pg/mL.
- Insulina: Método imunoenzimático – Elisa – Kit MILLIPORE - Billerica, USA, sensibilidade: 1 μ U/mL.
- Peptídeo C: Método imunoenzimático Elisa – Kit MILLIPORE - Billerica, USA, sensibilidade: 0,05ng/ml/ μ U/mL.
- PCR: Método imunoenzimático – Elisa – Kit - DIAsource ImmunoAssays S.A. - Louvain-la-Neuv, Belgium, sensibilidade: 10ng/mL.
- AGL: Método colorimétrico enzimático Wako NEFA, Wako Chemical, Nuess, Germany, sensibilidade: 0,0014mEq/L.

3.20. Análise Estatística dos Resultados.

Para a análise estatística foi empregado o teste para amostras não paramétricas *Kruskal Wallis* ou mediana e desvio dos quartis quando apropriado. Para a análise quanto ao sexo foi usado o teste *Chi Square*. Para as correlações a avaliação foi realizada por meio do teste de Regressão Simples e Correlação de *Spearman*. Os resultados foram expressos como média \pm Desvio Padrão da Média (DP). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% sendo considerados resultados significativos aqueles cujo *p* foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os softwares utilizados em todos os testes estatísticos foram SPSS Statistics 17.0 e GraphPad Prims 5 Demo.



4. RESULTADOS

4.1. Características Gerais.

Todos os 40 voluntários realizaram o estudo em todas as suas fases.

Após processamento das amostras de insulina e as análises metabólicas dos diferentes grupos em estudo, os resultados para HOMA-IR mostraram entre o grupo de obesos dois perfis distintos definidos pelo *standard score* ou *z-score*: um grupo normo-insulinêmico (OB NI) e outro hiperinsulinêmico (OB HI) (nos quais os valores calculados para HOMA-IR encontram-se além daqueles pertencentes ao alfa crítico previamente definido) para a resistência à insulina. Assim, o grupo com foi dividido em função do HOMA-IR (Figura 1).

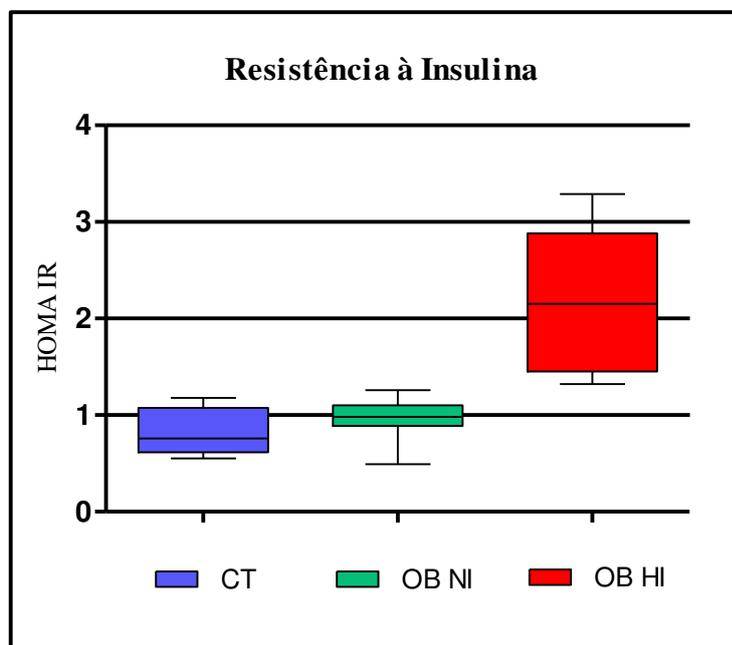


Figura 1: Resistência à insulina ($HOMA_{IR}$). Os resultados estão expressos em mediana e os intervalos entre 95% e 25%.

Os três grupos eram comparáveis quanto à idade e por definição experimental, diferiam quanto à massa corporal e o IMC. A massa de gordura corporal (Figura 2A) e massa magra (Figura 2B) eram significativamente maiores nos obesos, como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1: Características antropométricas do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNvsOBHI
Sexo: M/F*	4/9	13	2/13	15	5/7	12	ns	-	-	-
Idade (anos)	33±12	13	29±7	15	29±8	11	ns	ns	ns	ns
Massa Corporal (Kg)	63,71±8,98	13	95,67±12,78	15	103,464±12,89	11	0,000	0,000	0,000	ns
Altura (m)	1,66±0,10	13	1,63±0,09	15	1,69±0,09	12	ns	ns	ns	ns
IMC (kg/m ²)	22,92±2,03	13	35,25±3,80	14	37,05±3,88	12	0,000	0,000	0,000	ns
Gordura (Kg)	18,66±3,98	10	36,70±7,15	14	40,80±9,24	12	0,000	0,000	0,000	ns
Massa magra (Kg)	41,49±6,02	10	57,22±8,02	15	63,76±10,12	11	0,000	0,000	0,000	ns
Água corporal (%)	48,77±4,98	11	41,34±5,16	14	42,04±4,72	11	0,006	0,004	0,008	ns
Taxa metabólica basal (Kcal)	1261,3±183,53	10	1740±244,07	15	1938,45±307,62	11	0,000	0,000	0,000	ns

M/F – masculino / feminino; IMC – índice de massa corporal; ns – não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*.

Valor de p para comparação entre os grupos através da análise descritiva *Chi-Square*.

p - comparação entre todos os grupos. p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

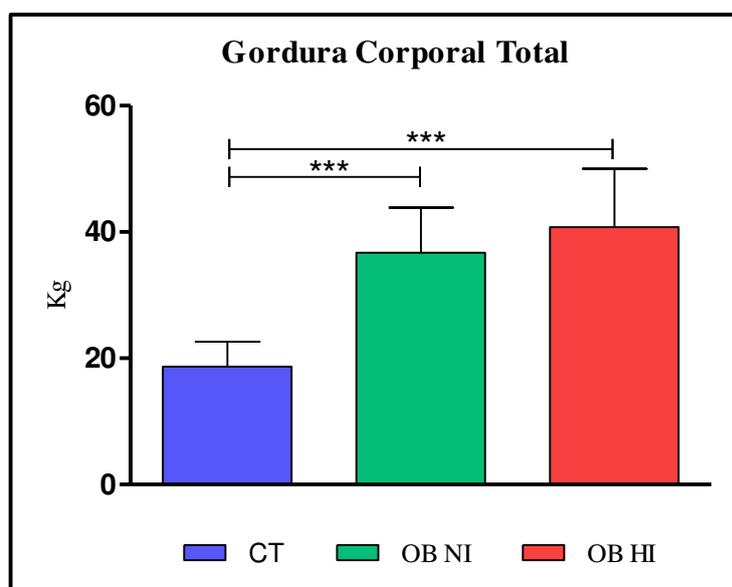


Figura 2A: Gordura corporal total em quilogramas (kg). Os resultados estão expressos em média ± DP.***P<0,001.

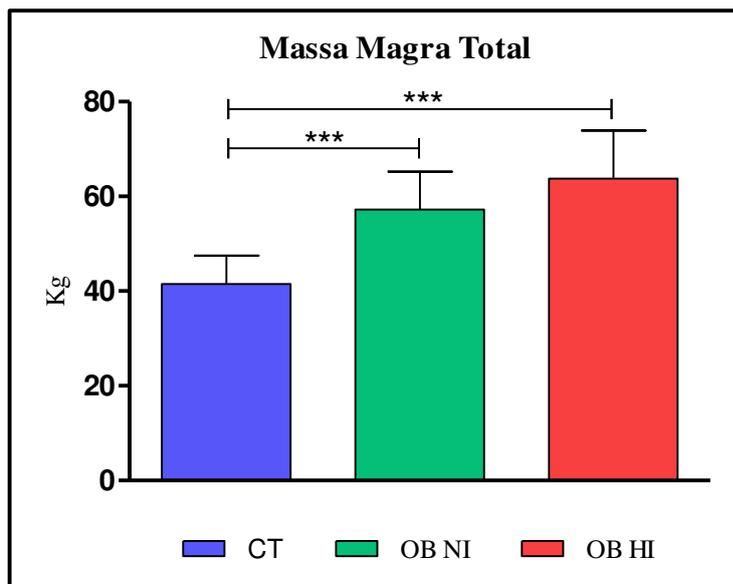


Figura 2B: Massa magra total em quilogramas (kg). Os resultados estão expressos em média \pm DP. *** $P < 0,001$.

4.2. Resultados de Teste Oral de Tolerância à Glicose.

Os níveis séricos de insulina e peptídeo C foram diferente entre os três grupos. Os níveis insulinêmicos diferem largamente entre os três grupos em todos os tempos (Figura 3A). Para os níveis séricos de glicose durante o teste, houve diferença nos tempos 60 e 90 entre o grupo CT e o grupo de OB HI (Figura 3B).

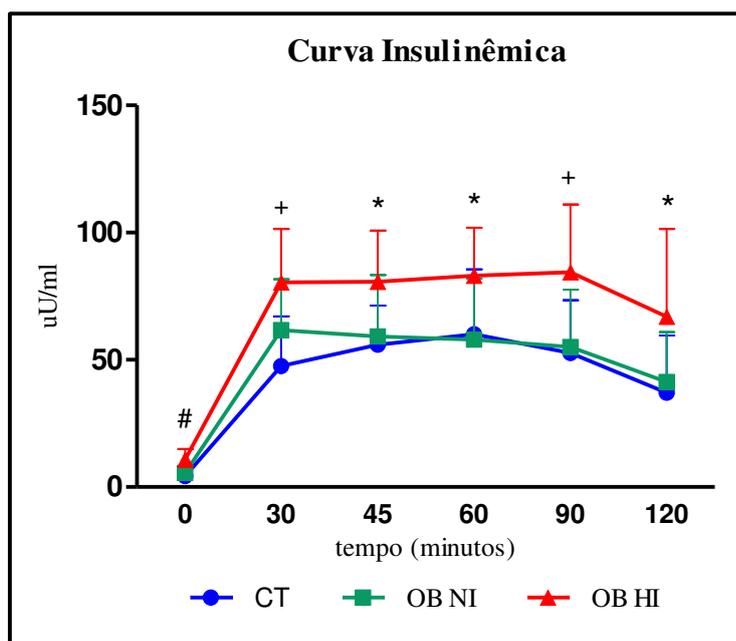


Figura 3A: Curva insulinêmica em microunidades por mililitros. Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05; +P<0,01 e #P<0,001.

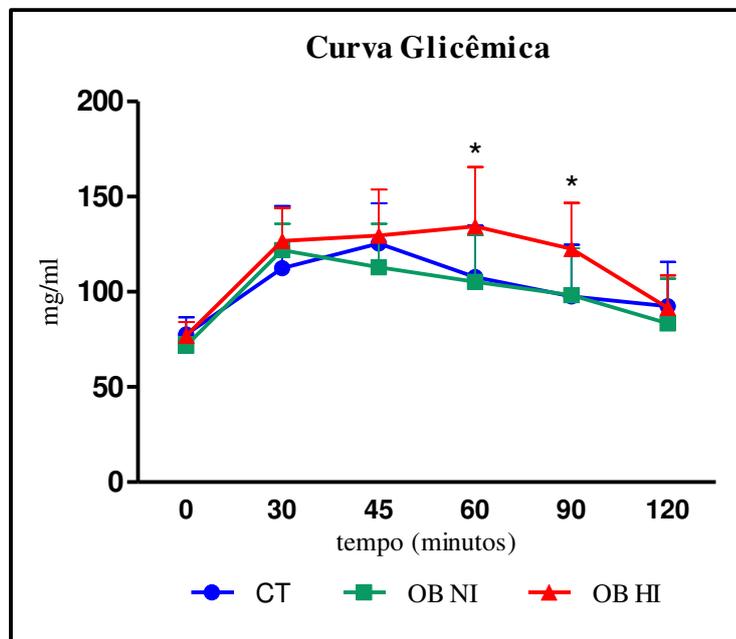


Figura 3B: Curva glicêmica em miligramas por mililitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05

Na Tabela 2 são mostrados os resultados da glicemia, insulinemia e peptídeo C em jejum e os cálculos derivados destas medidas durante o teste oral de tolerância à glicose para todos os grupos estudados. A área sob a curva de insulina resultante do teste oral demonstrou grande semelhança entre o grupo CT e o grupo de OB NI e, diferença significativa entre o grupo CT e o grupo de OB HI e entre os grupos de obesos (Figura 3C e 3D). Para a área sob a curva de glicose, houve grande diferença entre o grupo CT e o grupo de OB HI, igualando no tempo 120 (Figura 3E e 3F).

Tabela 2: Resultados do teste de tolerância oral à glicose do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE	n	OBESO NORMO	n	OBESO HIPER	n	p	p ¹	p ²	p ³
	(CT)		(OB NI)		(OB HI)			CTvsOBNI	CTvsOBHI	OBNIvsOBHI
Insulinemia										
Basal (μU/ml)	4,25±0,86	12	5,51±1,18	15	10,85±4,09	11	0,000	0,005	0,000	0,000
Glicemia										
Basal (mg/ml)	77,61±9,03	13	71,83±4,48	15	76,96±7,04	11	ns	ns	ns	0,018
Peptídeo C										
Basal (ng/ml)	0,774±0,12	11	1,13±0,82	14	1,37±0,59	11	0,002	ns	0,000	0,027
ASC ins total	4555,42±1244,41	12	5248,31±2020,19	15	7109,78±1693,16	12	0,003	ns	0,001	0,008
ASC ins 30'	640,72±315,16	13	842,81±295,31	15	1030,17±278,96	12	0,015	ns	0,007	ns
ASC ins 45'	670,74±287,92	13	794,89±327,83	15	1032,29±255,38	12	0,024	ns	0,012	0,032
ASC ins 60'	764,91±296,73	13	766,97±359,59	15	1052,14±230,40	12	0,037	ns	0,022	0,028
ASC ins 90'	1547,15±522,30	13	1498,10±600,14	14	2160,77±574,16	12	0,011	ns	0,017	0,005
ASC ins 120'	1088,71±421,60	12	1265,23±586,62	14	1834,41±695,19	12	0,013	ns	0,007	0,024
ASC gli total	2942,06±2007,76	12	3511,95±2169,92	15	4777±1889,62	12	ns	ns	0,018	ns
ASC gli 30'	485,00±366,24	12	700,29±241,82	14	775,50±227,20	12	ns	ns	0,040	ns
ASC gli 45'	568,87±295,84	12	639,45±273,60	15	803,00±263,94	12	ns	ns	0,050	ns
ASC gli 60'	569,19±306,99	12	558,90±315,30	15	835,12±344,39	12	0,039	ns	0,028	0,026
ASC gli 90'	797,50±646,29	12	988,90±767,56	15	1502,62±663,75	12	ns	ns	0,021	ns
ASC gli 120'	521,50±615,28	12	661,90±753,32	15	860,75±503,04	12	ns	ns	ns	ns
ASC PepC	703,66±262,76	11	784,58±258,29	14	1100,38±284,35	11	0,011	ns	0,005	0,019

ASC – área sob a curva; ins – insulina; gli – glicose; pepC – peptídeo C; ns – não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*

p - comparação entre todos os grupos. p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

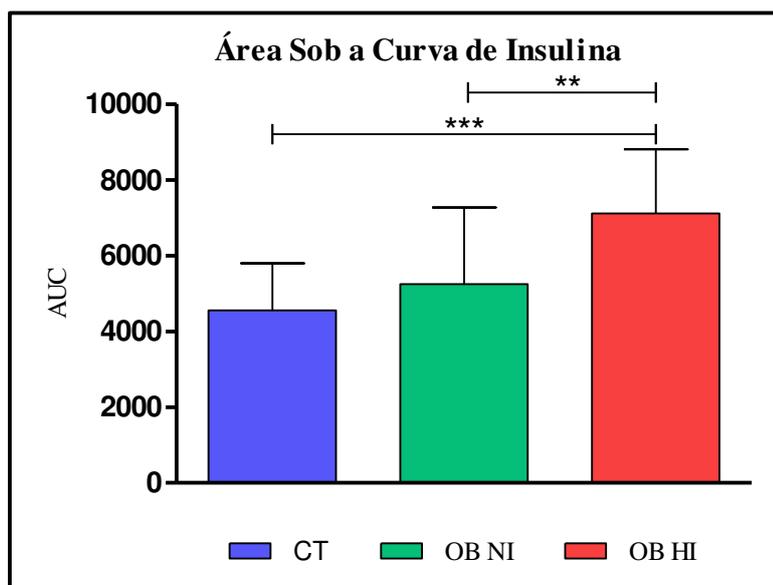


Figura 3C: Área sob a curva total de insulina. Os resultados estão expressos em média \pm DP. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

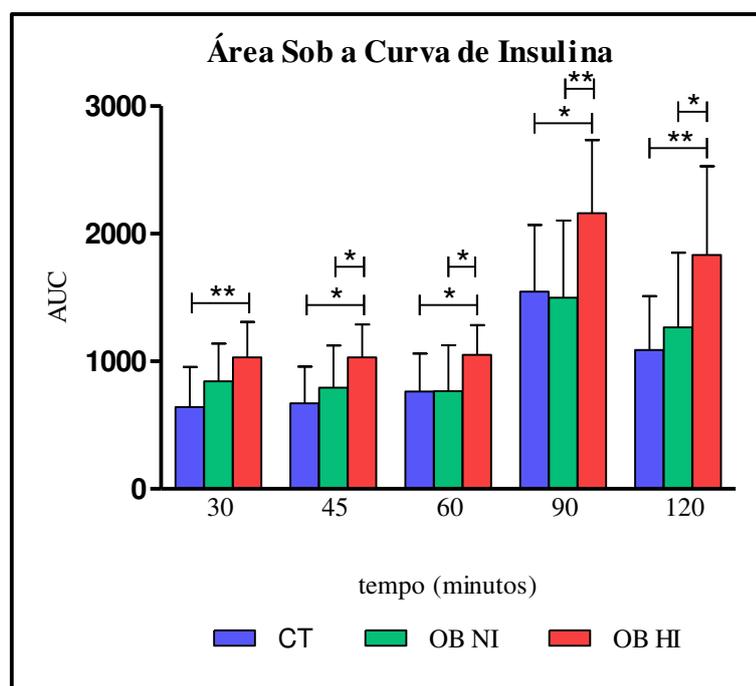


Figura 3D: Área sob a curva de insulina nos tempos de coleta. Os resultados estão expressos em média \pm DP. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

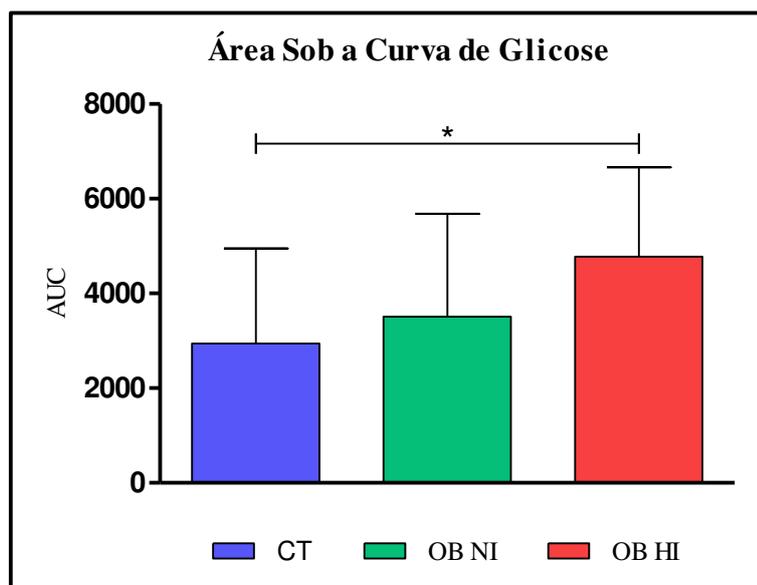


Figura 3E: Área sob a curva total de glicose. Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05.

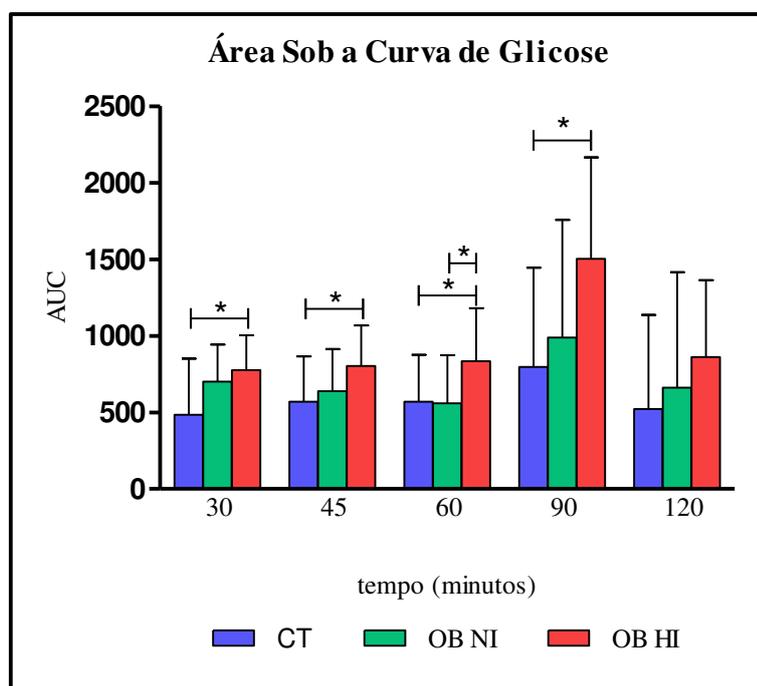


Figura 3F: Área sob a curva de glicose nos tempos de coleta. Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05.

Na tabela 3, avaliado o perfil metabólico quanto à resistência à insulina (HOMA-IR) (Figura 4A), sensibilidade à insulina (QUICKI) (Figura 4B), funcionalidade das células β pancreáticas (HOMA $_{\% \beta}$) (Figura 4C) e teste de tolerância à insulina (Kitt) (Figura 6D), mostrando diferenças significativas entre os grupos para o HOMA e QUICKI, onde esta diferença persistiu entre o grupo CT e o grupo de OB HI e também entre os grupos de obesos. Porém para o HOMA $_{\% \beta}$, houve diferença entre o grupo CT e os grupos de obesos, não havendo diferença entre os grupos de obesos.

Tabela 3: Características metabólicas do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNIvsOBHI
HOMA	0,83±0,23	12	0,98±0,22	15	2,19±0,70	12	0,000	ns	0,000	0,000
QUICKI	0,40±0,02	12	0,38±0,01	14	0,34±0,02	12	0,000	ns	0,000	0,000
Kitt	2,09±1,22	11	3,58±1,91	15	2,40±0,97	11	ns	ns	ns	ns
Funcional de células β (%)	125,78±61,01	12	406,13±511,42	15	361,63±468,51	11	0,007	0,003	0,019	ns

HOMA - Modelo de Avaliação da Homeostase; QUICKI - Índice de Sensibilidade à Insulina; Kitt - Índice Quantitativo para Avaliar Sensibilidade à Insulina; ns - não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*.

p - comparação entre todos os grupos. p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

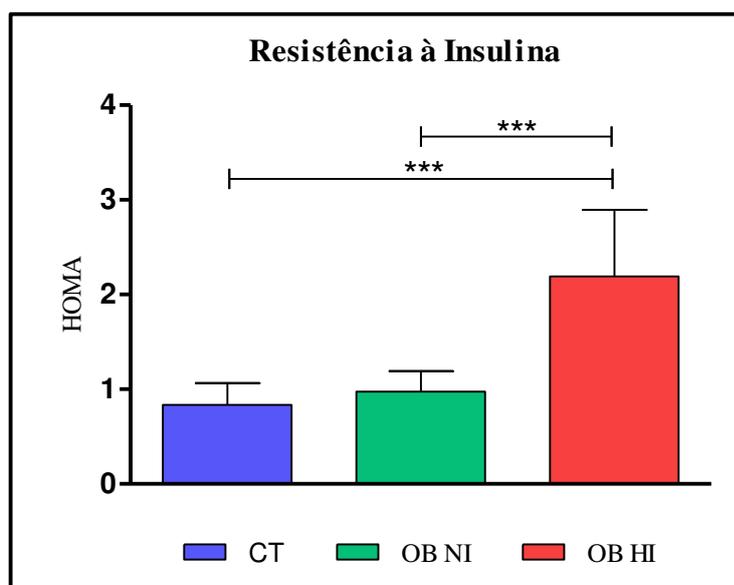


Figura 4A: Resistência à insulina ($HOMA_{IR}$). Os resultados estão expressos em média \pm DP.
*** $P < 0,001$.

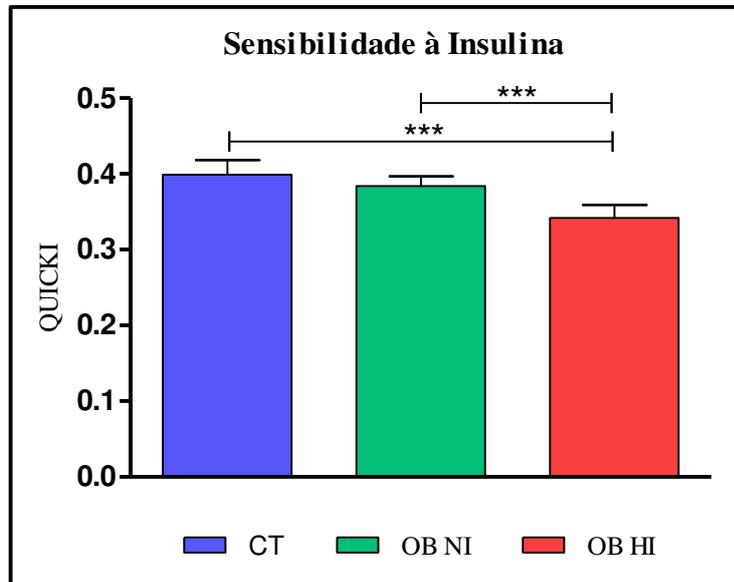


Figura 4B: Sensibilidade à insulina (QUICKI). Os resultados estão expressos em média \pm DP.
*** $P < 0,001$.

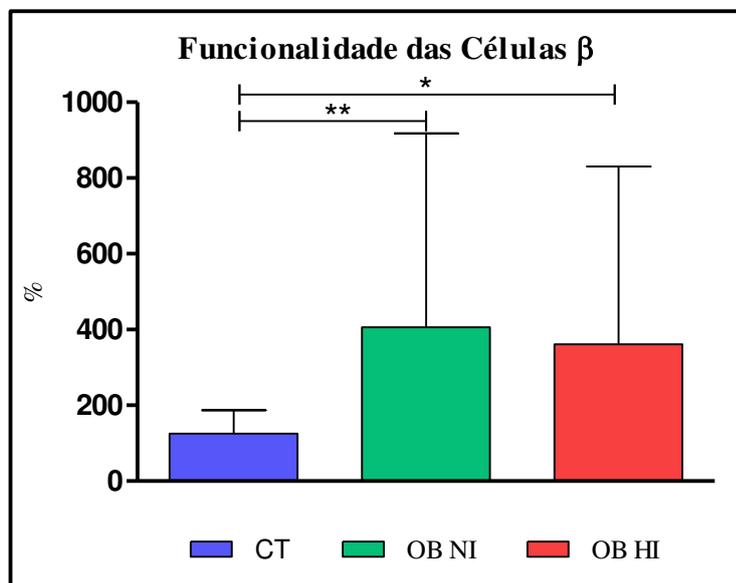


Figura 4C: Funcionalidade das células β ($HOMA_{\%_{\beta}}$) em percentual. Os resultados estão expressos em média \pm DP. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

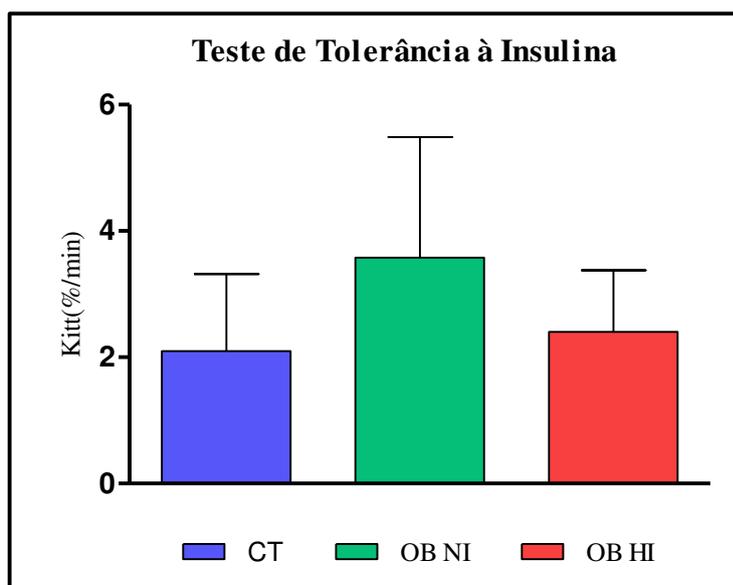


Figura 4D: Teste de tolerância à insulina (Kitt) em percentual por minuto. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

4.3. Perfil Lipídico e Ácido Úrico.

Em relação às características metabólicas (Tabela 4), o perfil lipídico dos grupos apresentou algumas diferenças significativas; na concentração sérica do colesterol total houve diferença entre o grupo CT e o grupo de OB NI, o LDL foi diferente entre os três grupos de voluntários e entre o grupo CT e o grupo de OB HI (Figura 5A); o ácido úrico (Figura 5B) foi diferente entre os dois grupos de obesos; e triglicérides e ácidos graxos livres não apresentaram diferença significativa (Figura 5C e 5D). ($p < 0,05$).

Tabela 4: Perfil lipídico, ácido úrico e ácidos graxos livres no período basal do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNIvsOBHI
Colesterol (mg/dl)	169,33±40,08	12	186,64±27,07	14	184,55±15,97	11	ns	0,045	ns	ns
HDL – colesterol (mg/dl)	35,08±13,31	13	26,50±4,64	14	26,73±8	11	ns	ns	ns	ns
LDL – colesterol (mg/dl)	113,17±32,31	12	133,67±27,39	15	139,83±24,56	12	0,040	ns	0,015	ns
VLDL – colesterol (mg/dl)	18,92±6,99	12	21,87±10,28	15	22,91±8,3	11	ns	ns	ns	ns
Triglicérides (mg/dl)	94,92±34,45	12	111,00±50,13	15	114,91±41,06	11	ns	ns	ns	ns
Ácido Úrico (mg/dl)	4,75±1,53	13	4,49±0,89	15	5,25±1,07	11	ns	ns	ns	0,033
Ácidos graxos livres (mg/dl)	382,05±129,80	12	545,11±454,67	14	396,58±97,1	12	ns	ns	ns	ns

HDL – proteínas de alta densidade; LDL – proteínas de baixa densidade; VLDL – proteínas de muito baixa densidade; ns – não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*.

p - comparação entre todos os grupos.

p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

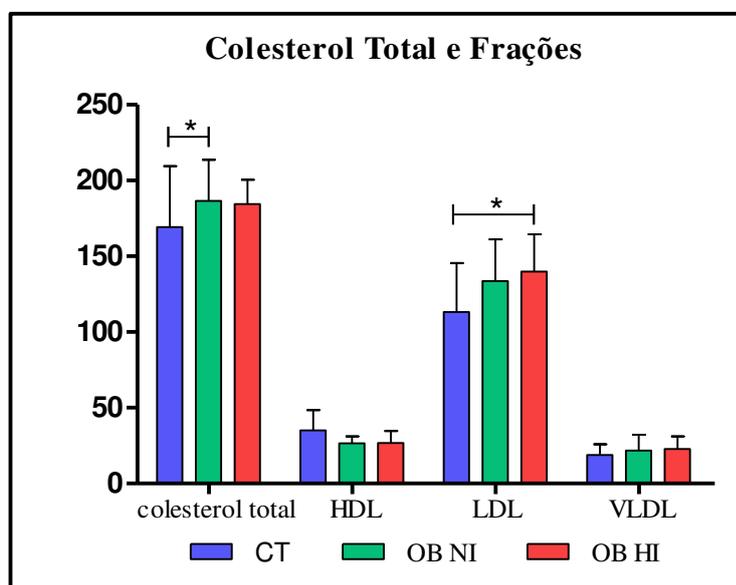


Figura 5A: Colesterol total, proteínas de alta densidade (HDL), proteínas de baixa densidade (LDL) e proteínas de muito baixa densidade (VLDL) em miligramas por decilitro. Os resultados estão expressos em média ± DP. *P<0,05.

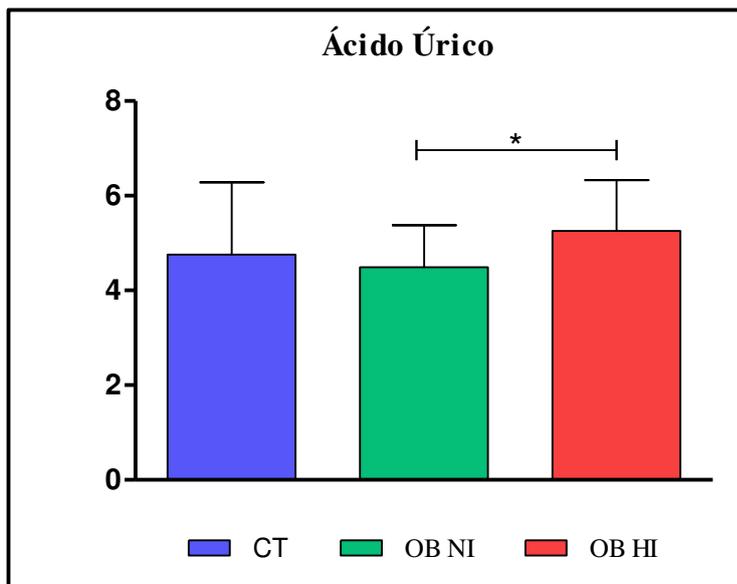


Figura 5B: Ácido úrico em miligramas por decilitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05.

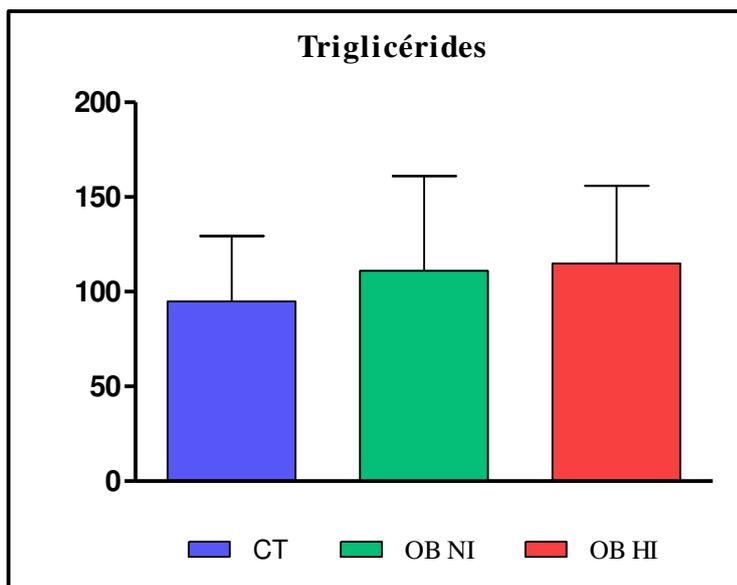


Figura 5C: Triglicérides em miligramas por decilitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

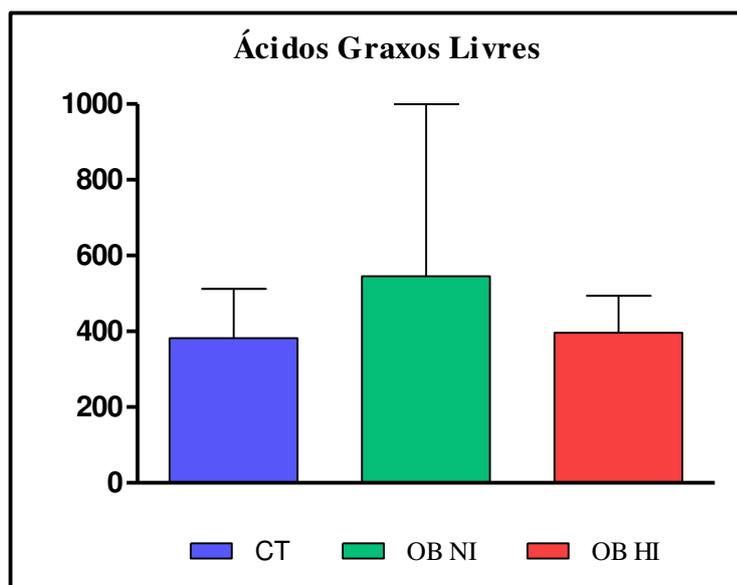


Figura 5D: Ácidos graxos livres em miligramas por decilitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

4.4. Citocinas e Marcadores Inflamatórios.

As concentrações circulantes de TNF- α , IL-6 e Proteína C-reativa, medidas no período basal e apresentadas na Tabela 5, foram significativamente diferente entre os três grupos, sendo maiores nos grupos de obesos quando comparados ao grupo CT (Figuras 6A, 6B e 6C).

A adiponectina também medida no período basal (Tabela 5), não apresentou diferença significativa entre os três grupos, porém entre o grupo de obesos houve diferença significativa (Figura 6D).

Quanto à leptina (Tabela 5), houve também diferença entre os três grupos. Os obesos apresentaram maiores concentrações de leptina que o grupo controle (Figura 6E).

Tabela 5: Resultados de citocinas e marcadores inflamatórios no período basal do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNIvsOBHI
TNF- α (pg/ml)	1,62 \pm 0,40	12	2,13 \pm 0,60	15	2,01 \pm 0,51	12	0,012	0,005	0,028	ns
IL-6 (pg/ml)	0,90 \pm 0,38	12	1,97 \pm 1,10	15	1,95 \pm 0,96	12	0,001	0,001	0,001	ns
PCR (mg/l)	1,56 \pm 2,25	11	5,56 \pm 4,89	15	6,37 \pm 6,70	12	0,025	0,006	ns	ns
Adiponectina (ug/ml)	7,64 \pm 2,94	12	8,91 \pm 3,39	15	6,32 \pm 2,49	12	ns	ns	ns	0,040
Leptina (ug/ml)	11,99 \pm 10,63	12	40,70 \pm 21,54	15	33,51 \pm 21,82	12	0,006	0,002	0,018	ns

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa; IL-6 – interleucina 6; PCR – proteína C reativa; ns – não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*.

p - comparação entre todos os grupos. p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

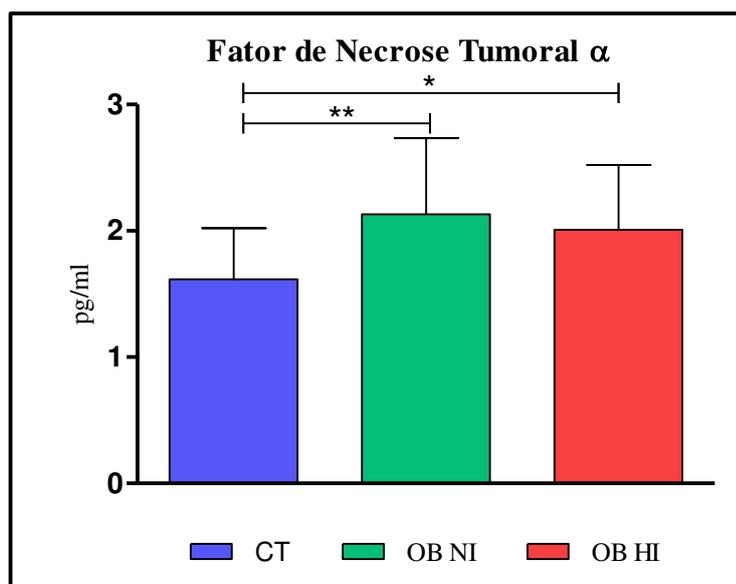


Figura 6A: Fator de necrose tumoral α (TNF- α) em picogramas por mililitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05 e **P<0,01.

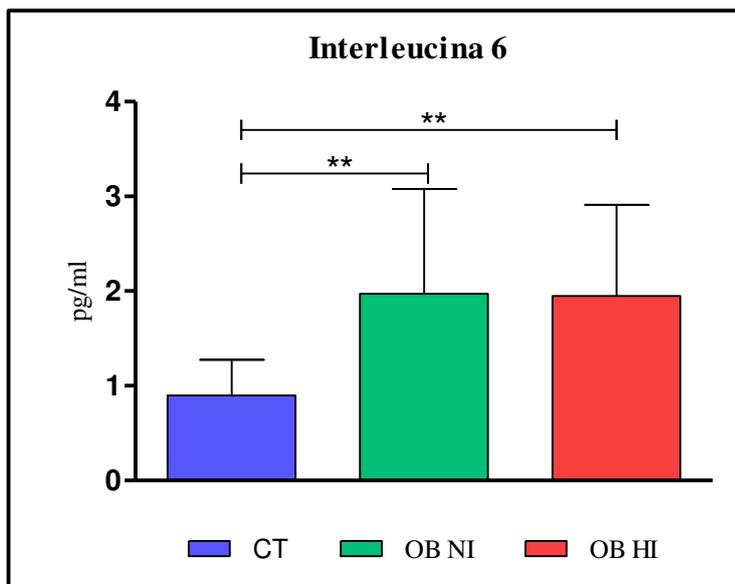


Figura 6B: Interleucina 6 (IL6) em picogramas por mililitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP. ****P<0,01.**

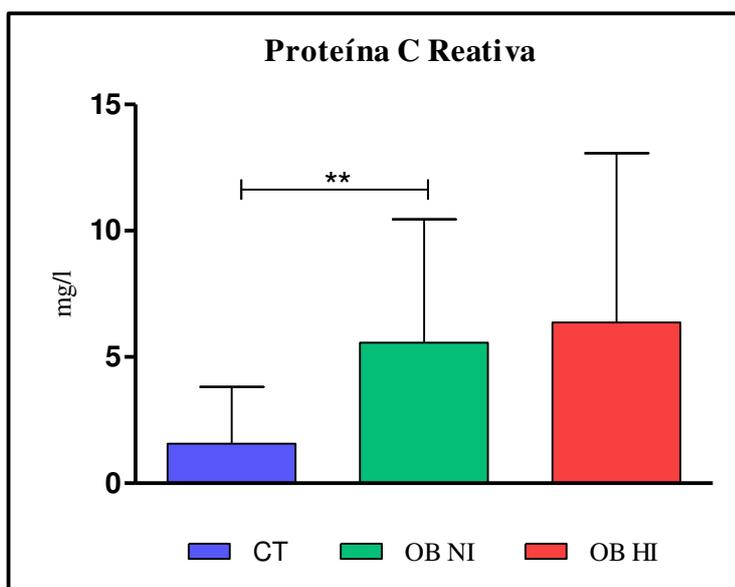


Figura 6C: Proteína C reativa (PCR) em miligramas por litro. Os resultados estão expressos em média \pm DP. ****P<0,01.**

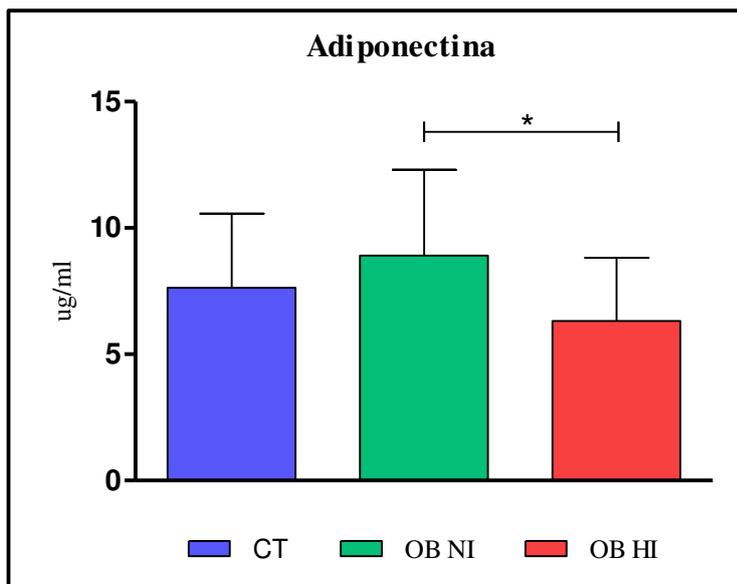


Figura 6D: Adiponectina em microgramas por mililitro. Os resultados estão expressos em média \pm DP. * $P < 0,05$.

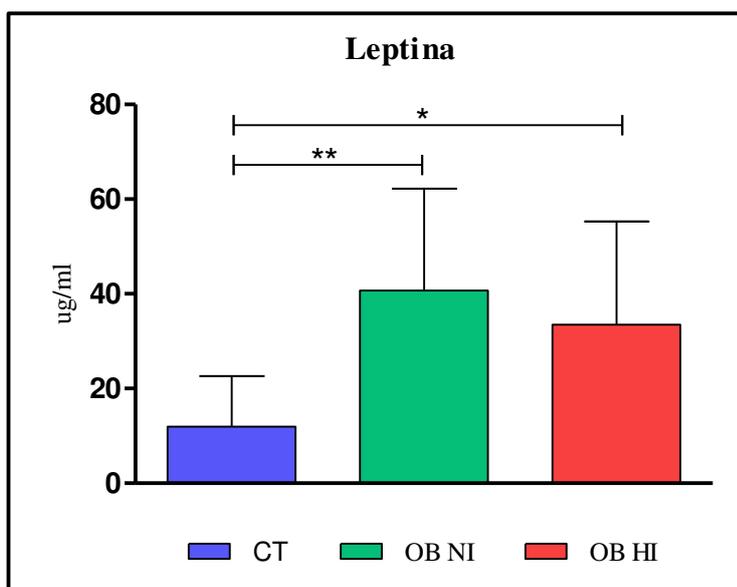


Figura 6E: Leptina em microgramas por mililitro Os resultados estão expressos em média \pm DP. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.5. Avaliação da Pressão Arterial.

A média das medidas da pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica foram significativamente diferentes entre os três grupos (Tabela 6). A pressão arterial sistólica foi diferente entre o grupo controle (CT) e o grupo de OB HI. Já na pressão arterial diastólica, foi significativamente diferente entre o grupo CT e o grupo de OB NI (Figura 7).

Tabela 6: Pressão arterial sistólica e diastólica do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNIvsOBHI
PA sistólica (mmHg)	114,85±16,65	13	122,73±12,35	15	130,70±4,71	10	0,006	ns	0,002	0,024
PA diastólica (mmHg)	73,17±12,46	12	84,14±8,39	14	82,33±9,30	9	ns	0,031	ns	ns

PA – pressão arterial; ns – não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*.

p - comparação entre todos os grupos.

p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

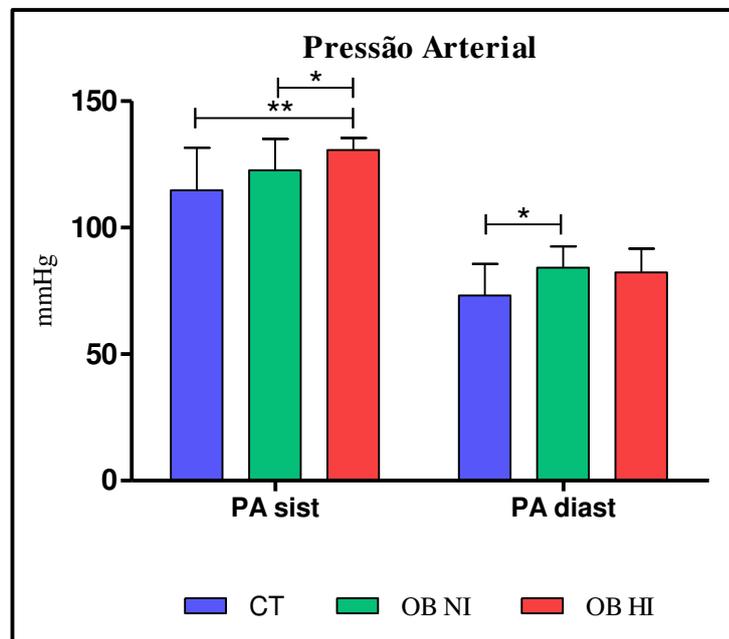


Figura 7: Pressão arterial sistólica e diastólica (PA sist e PA diast) em milímetros de mercúrio (mmHg). Os resultados estão expressos em média ± DP. *P<0,05 e **P<0,01.

4.6. Avaliação da Função Tubular Renal.

Após os *clearances* de lítio e creatinina o estudo demonstrou alterações pontuais da função glomerular e tubular renal nos três grupos de voluntários avaliados (Tabela 7). Quanto ao volume urinário (Figura 8A), no tempo 120 foi significativamente diferente entre os três grupos; quanto à taxa de filtração glomerular (Figura 8B), no período basal houve diferença significativa entre os três grupos, observada entre o grupo CT e o grupo de OB HI. Para o *clearance* de lítio e a fração de excreção proximal (Figuras 8C e 8D) não foram observadas diferenças significativas. Porém avaliando a fração de excreção pós-proximal de sódio, pôde-se observar uma diferença significativa no tempo 60 minutos entre os grupos, e esta diferença encontra-se entre o grupo CT e o grupo de OB NI e entre os grupos de obesos (Figura 8E). Para carga filtrada de sódio a diferença encontrada foi no tempo basal e tempo 120 entre o grupo CT de o grupo de OB HI (Figura 8F). A carga excretada de sódio apresentou diferença apenas no tempo 60 entre os grupos de obesos (Figura 8G). Porém quanto às frações de excreção de sódio e potássio no período basal ou após a ingestão de glicose, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figuras 8H e 8I).

Tabela 7: Avaliação da função tubular renal do grupo CT e grupos de OB NI e OB HI.

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNIvsOBHI
Vol urinário T0 (ml/min(mm/mt))	5,72±2,31	10	7,06±2,45	14	7,54±1,60	12	ns	ns	0,041	ns
Vol. urinário T60 (ml/min(mm/mt))	8,04±2,67	11	8,39±2,15	14	9,81±3,12	12	ns	ns	ns	ns
Vol. urinário T120 (ml/min(mm/mt))	5,91±2,33	10	9,07±2,46	14	9,90±2,16	11	0,005	0,008	0,002	ns
TFG T0 (ml/min(mm/mt))	53,66±9,01	9	66,93±20,09	14	77,37±28,13	11	0,038	ns	0,007	ns
TFG T60 (ml/min(mm/mt))	65,35±15,42	11	72,98±20,79	14	80,50±22,54	10	ns	ns	ns	ns
TFG T120 (ml/min(mm/mt))	58,82±20,17	10	67,84±15,45	12	73,24±13,10	11	ns	ns	0,049	ns
Cli T0 (ml/min(mm/mt))	13,75±6,11	9	11,62±3,41	14	14,08±3,41	11	ns	ns	ns	ns
Cli T60 (ml/min(mm/mt))	13,07±3,94	10	14,38±3,67	14	14,67±4,08	11	ns	ns	ns	ns
Cli T120 (ml/min(mm/mt))	13,09±6,19	10	14,42±3,70	13	15,56±4,26	12	ns	ns	ns	ns
FEPNa T0 (%)	22,13±9,33	9	18,55±3,31	13	17,74±3,13	11	ns	ns	ns	ns
FEPNa T60 (%)	20,23±4,81	10	21,75±4,35	13	18,24±5,28	12	ns	ns	ns	ns
FEPNa T120 (%)	20,34±4,29	10	20,31±5,41	13	20,55±5,62	12	ns	ns	ns	ns
FEPPNa T0 (%)	9,41±2,18	9	8,41±2,52	13	8,82±3,42	11	ns	ns	ns	ns
FEPPNa T60 (%)	7,46±1,94	10	5,91±1,13	13	7,92±2,68	11	0,029	0,035	ns	0,022
FEPPNa T120 (%)	6,38±2,93	11	5,66±2,01	14	6,32±2,24	10	ns	ns	ns	ns
FENa T0 (%)	1,74±0,54	9	1,63±0,63	14	1,66±0,72	11	ns	ns	ns	ns
FENa T60 (%)	1,33±0,33	10	1,26±0,46	13	1,36±0,43	11	ns	ns	ns	ns
FENa T120 (%)	1,32±0,40	10	1,19±0,49	14	1,36±0,52	11	ns	ns	ns	ns
CFNa T0 (ml/min(mm/mt))	7,04±1,49	9	8,76±2,75	14	10,16±3,93	11	ns	ns	0,015	ns
CFNa T60 (ml/min(mm/mt))	8,47±2,24	11	9,58±2,79	14	11,17±3,32	11	ns	ns	ns	ns
CFNa T120 (ml/min(mm/mt))	7,60±2,36	10	8,98±1,91	12	9,57±1,64	11	ns	ns	0,029	ns
CENa T0 (ml/min(mm/mt))	0,16±0,07	10	0,13±0,05	14	0,17±0,05	10	ns	ns	ns	ns
CENa T60 (ml/min(mm/mt))	0,12±0,04	11	0,11±0,03	13	0,17±0,08	12	ns	ns	ns	0,049
CENa T120 (ml/min(mm/mt))	0,1±0,04	10	0,10±0,04	14	0,13±0,06	10	ns	ns	ns	ns
FEK T0 (%)	12,85±5,76	9	11,85±3,92	14	13,39±5,24	12	ns	ns	ns	ns
FEK T60 (%)	12,05±7,10	11	8,51±3,12	14	9,24±3,23	11	ns	ns	ns	ns

	CONTROLE (CT)	n	OBESO NORMO (OB NI)	n	OBESO HIPER (OB HI)	n	p	p ¹ CTvsOBNI	p ² CTvsOBHI	p ³ OBNIvsOBHI
FEK T120 (%)	6,71±3,44	11	4,76±1,31	14	5,81±1,88	11	ns	ns	ns	ns
Proteinúria (mg/dl)	1,24±0,62	11	1,02±0,42	12	1,07±0,35	10	ns	ns	ns	ns

T – tempo em minutos; Vol. – volume; TFG – taxa de filtração glomerular; Cli – clearance de lítio; FEPNa – fração de excreção proximal de sódio;

FEPPNa - fração de excreção pós-proximal de sódio; FENa – fração de excreção de sódio; FEK – fração de excreção de potássio;

ns – não significativo.

Valores de p para comparação entre os grupos através da análise não paramétrica de *Kruskal Wallis*.

p - comparação entre todos os grupos. p¹ ; p²; p³ - comparação entre os grupos.

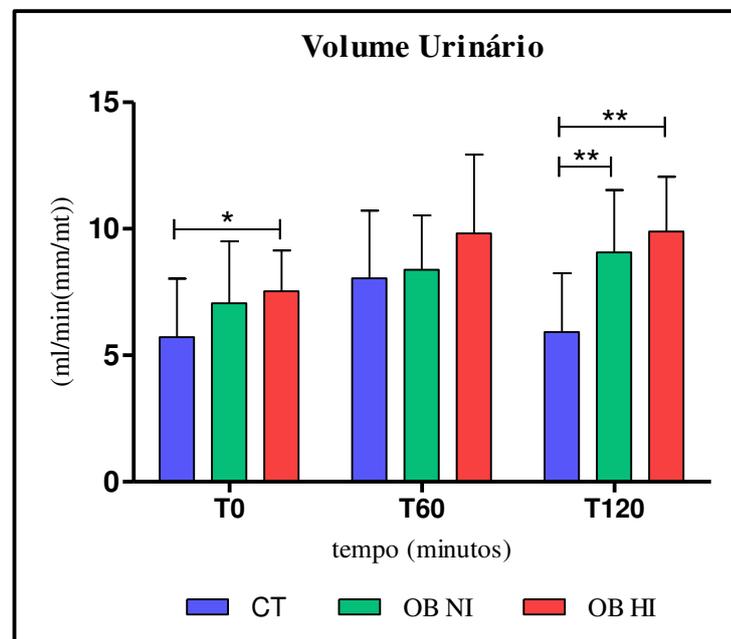


Figura 8A: Volume urinário (VU) em ml por minuto pela razão massa magra/massa total em Kg (ml/min(mm/mt)). Os resultados estão expressos em média ± DP. *P<0,05 e **P<0,01.

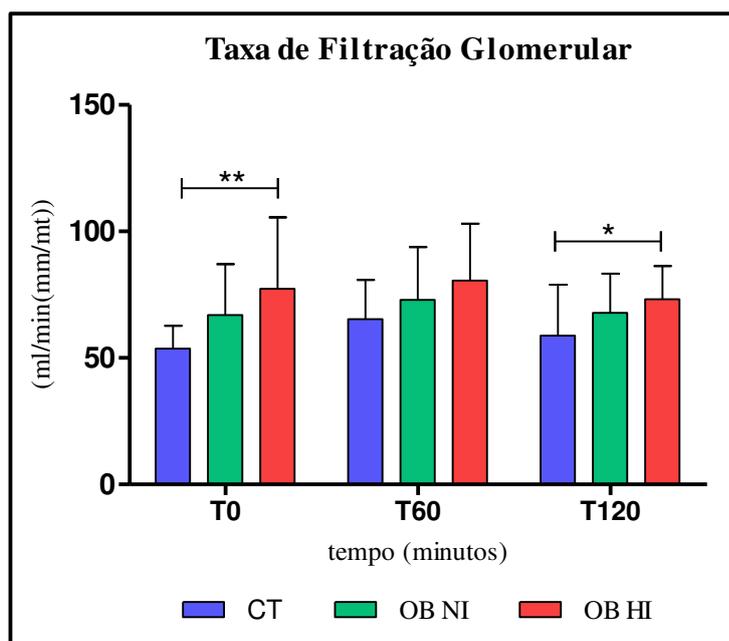


Figura 8B: Taxa de filtração glomerular (TGF) em ml por minuto pela razão massa magra/massa total em Kg (ml/min(mm/mt)). Os resultados estão expressos em média \pm DP. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

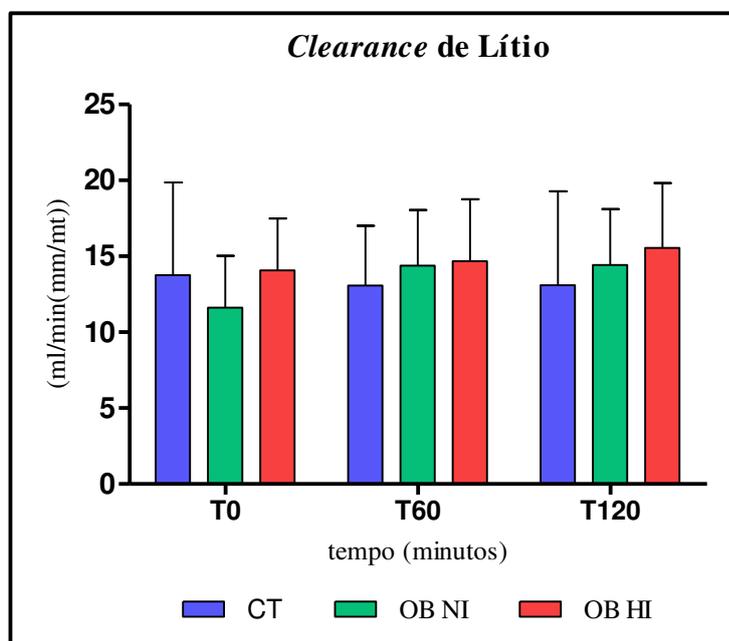


Figura 8C: Clearance de lítio (CLi) em ml por minuto pela razão massa magra/massa total em Kg (ml/min(mm/mt)). Os resultados estão expressos em média \pm DP.

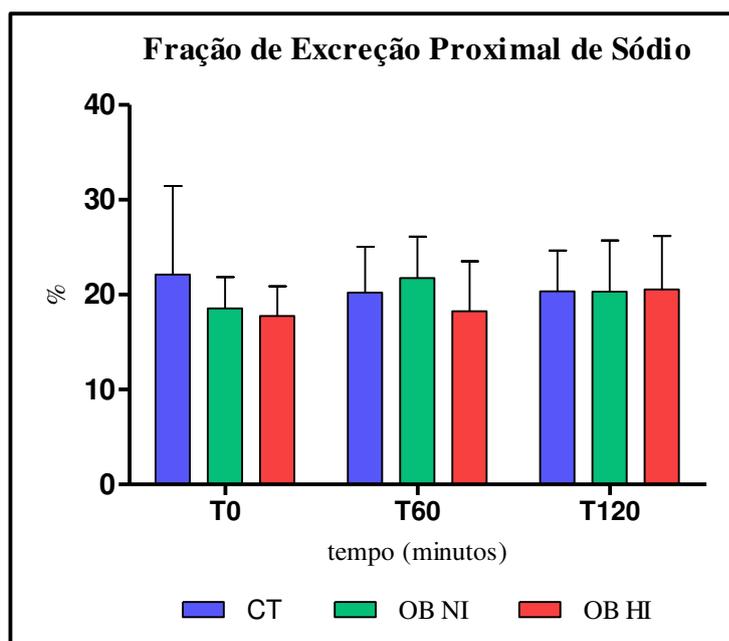


Figura 8D: Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa) em percentual. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

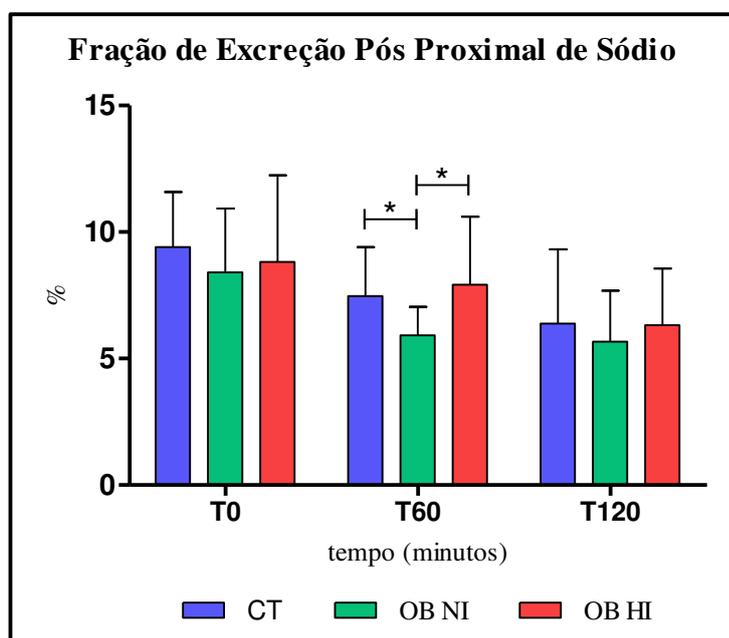


Figura 8E: Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa) em percentual. Os resultados estão expressos em média \pm DP. * $P < 0,05$.

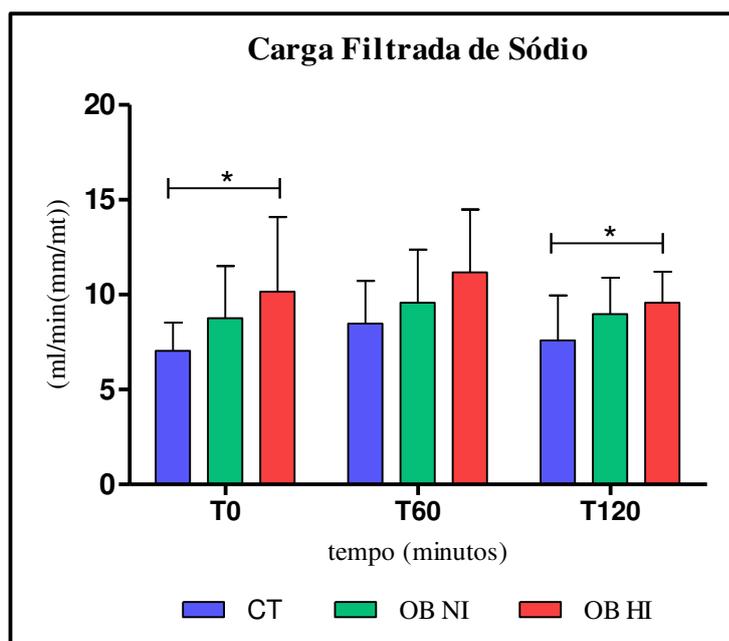


Figura 8F: Carga filtrada de sódio (CFNa) em ml por minuto pela razão massa magra/massa total em Kg (ml/min(mmm/mt)). Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05.

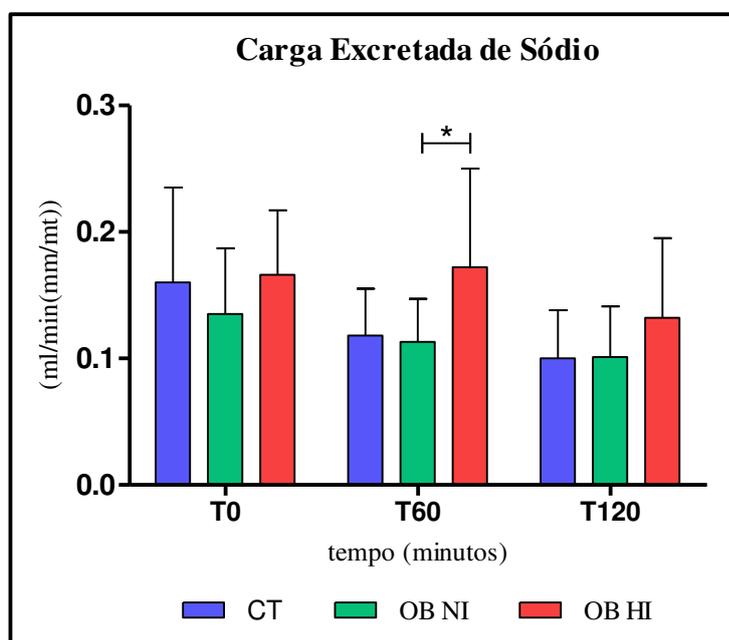


Figura 8G: Carga excretada de sódio (CENa) em ml por minuto pela razão massa magra/massa total em Kg (ml/min(mmm/mt)). Os resultados estão expressos em média \pm DP. *P<0,05.

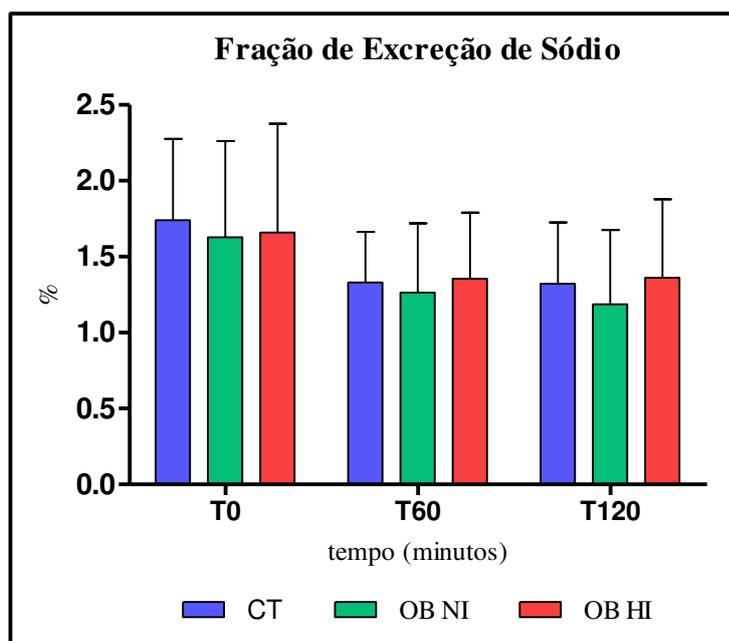


Figura 8H: Fração de excreção de sódio (FENa) em percentual. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

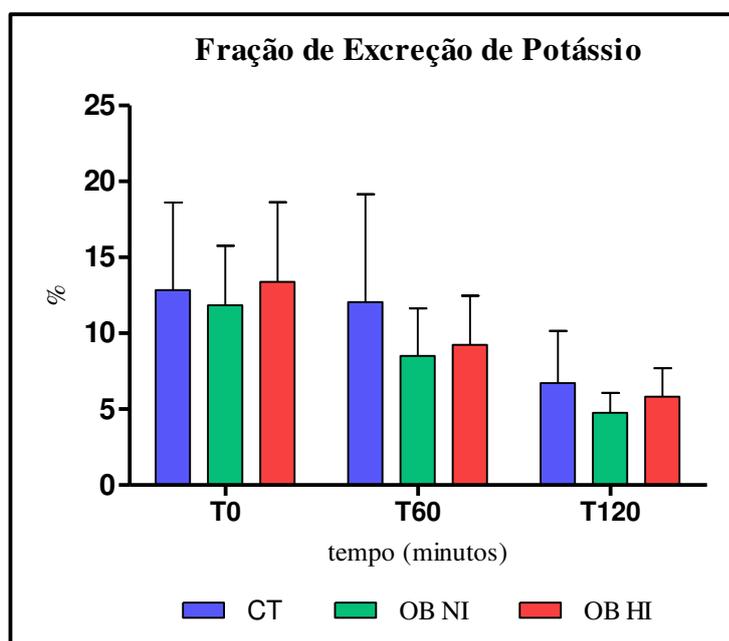


Figura 8I: Fração de excreção de potássio (FEK) em percentual. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

4.7. Correlação entre variáveis.

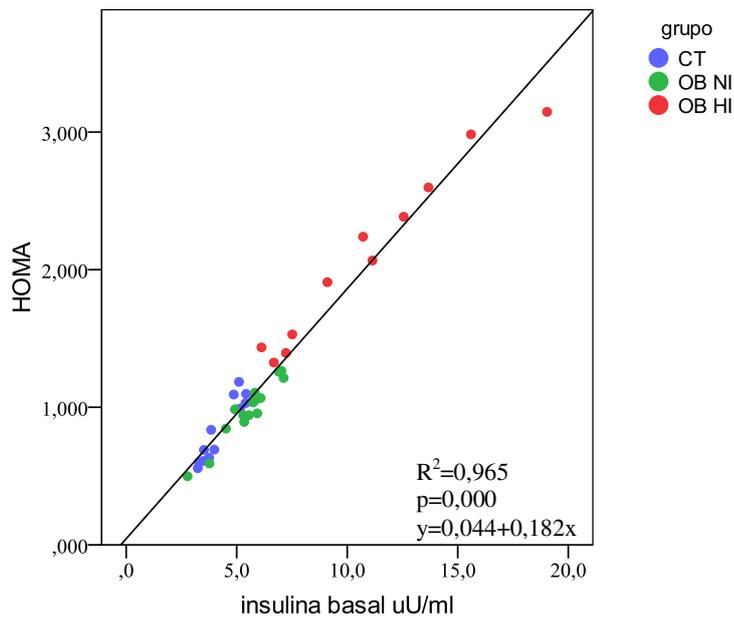


Figura 9A: Correlação entre o HOMA-IR e a insulina de jejum. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

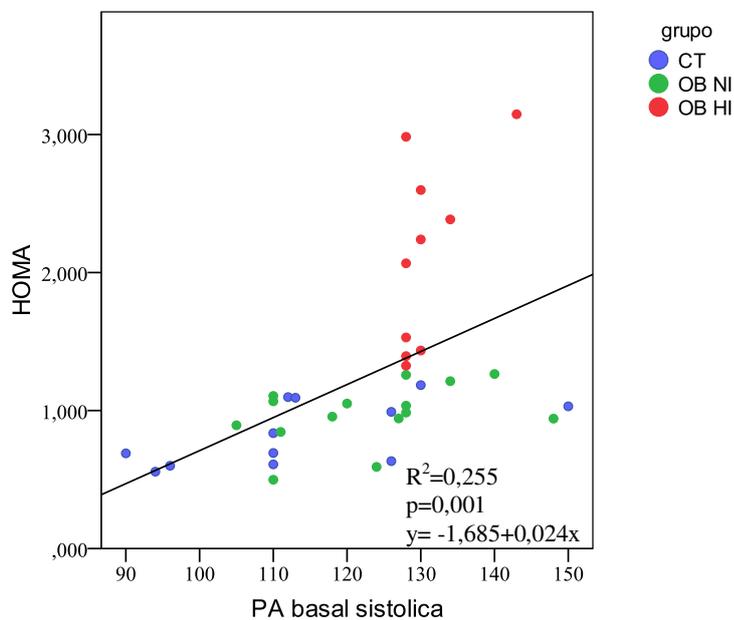


Figura 9B: Correlação entre o HOMA-IR e a pressão arterial sistólica. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

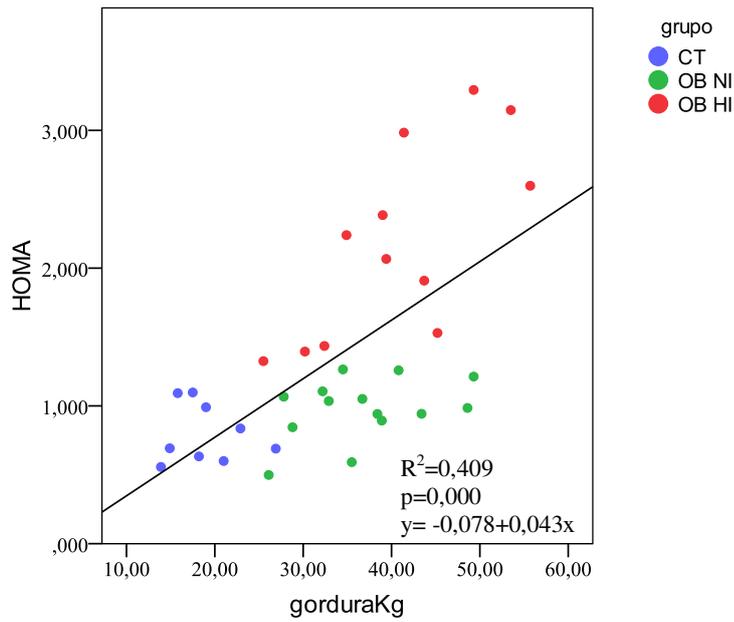


Figura 9C: Correlação entre o HOMA-IR e a gordura corporal. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

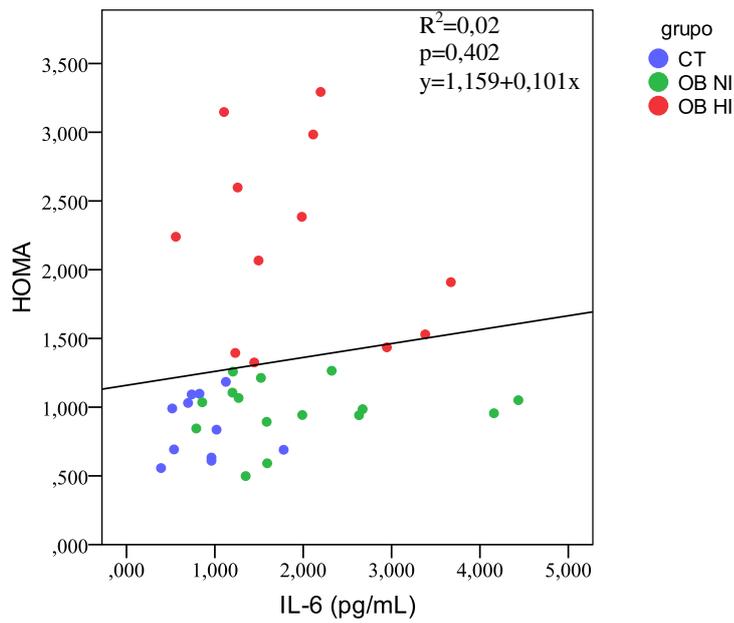


Figura 9D: Correlação entre o HOMA-IR e IL-6. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

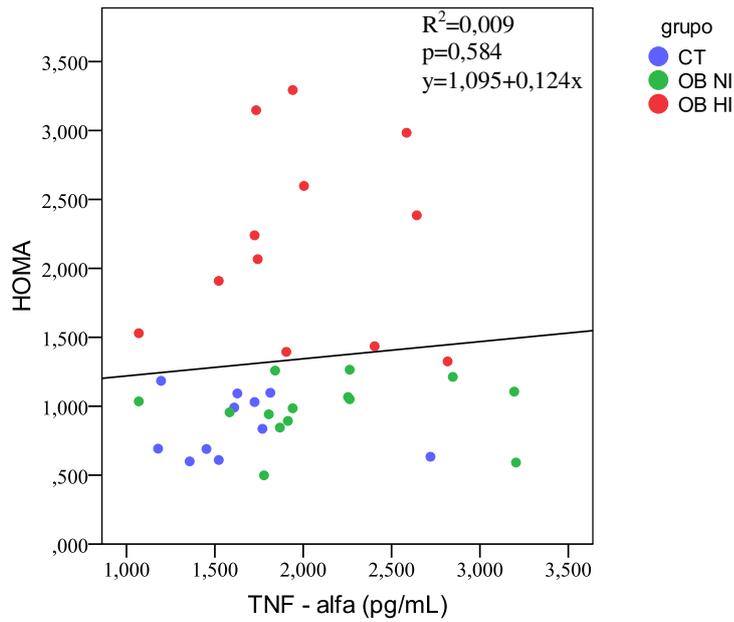


Figura 9E: Correlação entre o HOMA-IR e TNF- α . Os resultados estão expressos em média \pm DP.

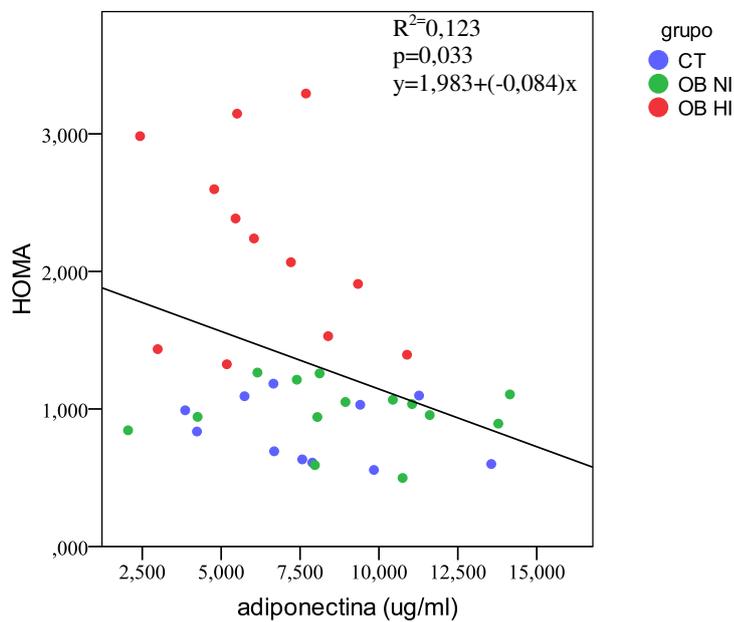


Figura 9F: Correlação entre o HOMA-IR e adiponectina. Os resultados estão expressos em média \pm DP.

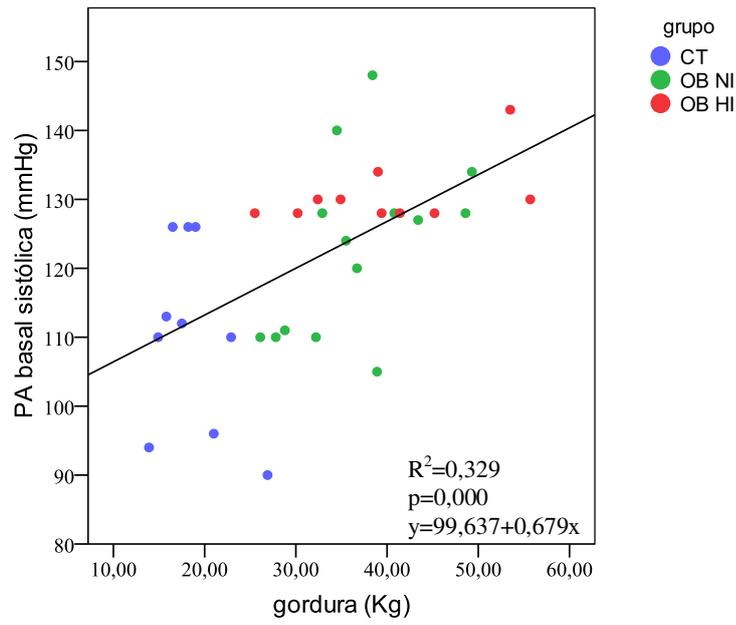


Figura 9G: Correlação entre pressão arterial sistólica e a gordura corporal. Os resultados estão expressos em média \pm DP.



5. DISCUSSÃO

A prevalência de obesidade cresce em proporções alarmantes no mundo, revelando um quadro epidemiológico preocupante (3). O que impulsiona este sobrepeso e a obesidade são principalmente o sedentarismo e o consumo de dieta hipercalórica, interagindo com fatores genéticos e epigenéticos (124; 125; 126).

Características gerais.

Para a divisão inicial dos voluntários o IMC foi caráter classificatório, e para este critério a diferença entre indivíduos eutróficos e obesos foi altamente significativa (Tabela 1). Quando avaliada a composição corporal, tanto a massa total de gordura (kg) quanto à massa magra (kg) foram significativamente diferentes entre os grupos (Figuras 2A e 2B).

Os grupos não apresentaram diferença significativa quanto à idade. A relação de distribuição dos gêneros foi de 44,4% de homens para o grupo controle e 35%, para o grupo de obesos.

Perfil metabólico.

Ao avaliarmos, através do *z-score*, o nível de insulina basal desses voluntários, estabelecemos a partir do índice HOMA IR definido para o grupo controle, indivíduos obesos metabolicamente distintos, um grupo de obesos normo-insulinêmicos (OB NI), que apresentavam níveis similares de insulinemia padrão HOMA IR em relação aos voluntários controles (CT) e o grupo de obesos hiperinsulinêmicos (OB HI), com um HOMA IR significativamente elevado e característico de uma população com resistência à insulina (Figura 1). Em 1985, Mattheus e colaboradores, publicaram uma nova abordagem baseada em um modelo estrutural para avaliação da resistência à insulina, o HOMA IR. A partir de então, diversos estudos tem empregado este índice sendo que mais de 8.600 trabalhos na literatura citam este indicador como adequado na caracterização de resistência periférica em trabalhos clínicos e epidemiológicos (120; 127; 128; 129). Portanto, após a caracterização do HOMA IR dos voluntários, estabelecemos todas as variáveis estudadas para três grupos distintos: 13 indivíduos controles (CT) ($IMC \leq 24,9$), 15 indivíduos obesos normo-insulinêmicos – (OB NI) e 12 indivíduos obesos hiperinsulinêmicos (OB HI) ($IMC \geq 30$).

Avaliação Teste de Tolerância Oral à Glicose.

Ao avaliarmos a insulina basal destes voluntários identificamos uma diferença acentuada entre todos os grupos estudados. Ambos os grupos de voluntários obesos apresentaram insulina basal elevada, quando comparados com o grupo CT (Tabela 2). Entre o grupo CT e o grupo de OB NI houve uma diferença significativa, contudo a insulina do grupo OB HI parte de uma concentração basal duas vezes maior que os outros dois grupos de voluntários (CT e OB NI). Estes não foram caracterizados como indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 por manterem a glicemia de jejum assim como todas as glicemias durante o TTOG dentro dos padrões de normalidade (Figura 3B).

Quando avaliada a curva insulínica (Figura 3A) ou área sob a curva de insulina (Figuras 3C e 3D), fica evidente a hiperinsulinemia do grupo OB HI. Estes voluntários mantêm padrões de distribuição para glicemia dentro de um intervalo de normalidade (Figuras 3E e 3F), embora já apresentem um quadro de resistência à insulina. Para Carvalho e colaboradores, a resistência à insulina pode estar presente por vários anos antes do aparecimento de alterações dos níveis plasmáticos de glicose. (54).

O teste QUICKI, usado para avaliar a sensibilidade à insulina, apresentou uma diferença altamente significativa entre o grupo CT e o grupo OB HI e entre os grupos de obesos, fortalecendo a prévia quanto à existência de resistência à insulina neste subgrupo. Outra variável avaliada com respostas significantes foi a funcionalidade das células β ($HOMA_{\% \beta}$). Foi observada uma diferença significativa entre o grupo CT e o grupo OB NI e entre o grupo CT e o grupo OB HI. Os grupos de obesos apresentam um recrutamento maior das células β , para produção de insulina, quando comparados ao grupo CT. Estes resultados sugerem que o grupo de OB NI passa por um período em que há um evidente aumento da funcionalidade das células β , responsável por manter a glicemia dentro de padrões de normalidade. A insulina deste grupo de OB NI está muito próxima à insulina do grupo CT, sugerindo que este grupo de obesos normo-insulinêmicos possa estar perdendo progressivamente a função pancreática cuja característica de comportamento sugere um maior recrutamento de células β pancreáticas, para compensar uma possível menor produção individual destas. O estudo não avaliou o tempo de obesidade dos diferentes indivíduos estudados, no entanto, pode-se aventar a possibilidade de que esta perda

funcional das células β pancreáticas esteja relacionada ao tempo de obesidade e a lipotoxicidade, sendo possível sugerir que quanto maior for este período, maiores são as alterações observadas.

Avaliação pressórica.

Quanto à avaliação pressórica, nenhum dos voluntários relatou histórico pessoal ou familiar de hipertensão arterial. Porém, a pressão arterial sistólica avaliada no momento da realização da coleta das amostras de sangue e urina, foi significativamente maior para o grupo de OB HI quando comparado aos outros dois grupos (Figura 7), embora estes níveis não caracterizem ainda este grupo como hipertenso segundo critérios das Diretrizes Brasileiras 2011 (119).

Avaliação das funções glomerular e tubular renal.

Este estudo utilizou os *clearances* de creatinina e lítio respectivamente, para avaliação da filtração glomerular e da manipulação tubular renal de sódio. Tem sido demonstrado pela literatura que a obesidade também aumenta as exigências metabólicas no rim. O número de nefros não acompanha o aumento da massa corporal, no entanto, a taxa de filtração glomerular e fluxo plasmático renal devem aumentar para atender as demandas metabólicas mais elevadas deste órgão. Isto ocorre à custa de um aumento das pressões intra-glomerulares e intracapilar peritubulares e pode ser fator deletério para adultos a partir da evidencia de uma redução progressiva do número de nefros com o passar do tempo (90).

Há poucos estudos que examinaram diretamente o impacto do ganho excessivo de peso sobre a reabsorção tubular de sódio em diferentes segmentos do nefro. Algumas evidências sugerem que o aumento da reabsorção de sódio ocorre possivelmente, no segmento espesso da alça de Henle (18).

Ao avaliarmos a função renal dos voluntários através dos *clearances* de lítio e creatinina, após ingestão oral de glicose, a reabsorção elevada de sódio com a consequente redução na excreção pós-proximal deste íon, possivelmente mediada entre outros fatores pela insulina, se mostrou similar entre os grupos avaliados, apesar do elevado e persistente nível de insulina sérica no grupo de OB HI. A excreção urinária de sódio foi semelhante entre os grupos de obesos, o que

pode sugerir a presença de outros mecanismos para explicar o aumento da pressão no grupo de OB HI. Ao avaliar a reabsorção tubular de sódio pode-se sugerir que os grupos voluntários controles ou obesos, independente dos subgrupos (OB NI ou OB HI), apresentam uma sensibilidade tubular renal normal à insulina. Os efeitos da insulina sobre a reabsorção de sódio são evidenciados há muito tempo (31), porém ainda não existe um consenso quanto aos mecanismos exatos implicados neste processo. Alguns estudos mostram que o efeito antinatriurético da insulina ocorre predominantemente na região pós-proximal do túbulo renal (31,130). Contudo um aumento na reabsorção de sódio em situações de elevados níveis séricos de insulina pode ocorrer por uma diminuição na fração de filtração, e/ou como resposta a estimulação neuro-humoral através de uma elevação da atividade neural simpática renal, ou pelo aumento da atividade do SRA, bem como pela supressão da liberação central ou periférica de peptídeos natriuréticos (131). Neste estudo, após a sobrecarga oral de glicose, a taxa de filtração glomerular, estimada pelo clearance de creatinina não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados, sugerindo, conseqüentemente, que a antinatriurese observada seja mediada prioritariamente, por mecanismos tubulares diretos. A contribuição da carga filtrada de glicose para o aumento do transporte tubular proximal de sódio, através de um aumento da atividade do cotransportador Na^+ /glicose pode ser sugerido como parte dos mecanismos que justifiquem a antinatriurese observada em todos os grupos estudados.

O trocador Na^+/H^+ é um sistema de transporte envolvido na regulação do pH intracelular, crescimento e proliferação celular, regulação do volume celular e absorção transepitelial de Na^+ , Cl^- , HCO_3^- . Conlin e colaboradores observaram que a insulina, além de aumentar o cálcio intracelular, também ativa o trocador Na^+/H^+ (132). Assim, as observações fornecem suporte a possíveis mecanismos e ações da insulina que poderiam estar envolvidas ao desenvolvimento da hipertensão arterial em indivíduos obesos, apesar do inalterado transporte tubular de sódio no grupo de OB HI.

Alterações da atividade eferente neural renal, do SRA e peptídeos natriuréticos após sobrecarga oral de glicose não foram avaliados neste trabalho. Entretanto podemos sugerir que um aumento na ativação do SRA e/ou no SNS poderia contribuir de maneira expressiva, em longo prazo, para a elevação da resposta inflamatória, resistência à insulina e alterações renais neste grupo de OB HI.

Correlações entre avaliação pressórica, perfil metabólico e inflamatório.

O presente estudo demonstra que o grupo de OB HI tem os níveis glicêmicos mais elevados, observados pelo TTOG quando comparado aos grupos CT e OB NI. Estes resultados demonstram que a elevação glicêmica e da pressão arterial, permitem supor que a resistência à insulina pode resultar de um conjunto de desordens metabólicas e inflamatórias, que podem promover alterações hemodinâmicas, e principalmente a elevação pressórica em um grupo específico de pacientes obesos hiperinsulinêmicos (133; 134; 135; 136).

Neste estudo a combinação da hiperinsulinemia, HOMA IR elevado e o índice QUICKI reduzido, demonstram a existência de resistência à insulina neste grupo de OB HI.

Existem evidências que a resistência à insulina contribui para a etiologia da hipertensão em alguns pacientes (137; 138; 139). Há uma relação sólida entre obesidade, insulina plasmática e o aumento da pressão arterial, mecanismos pelos quais a resistência à insulina e/ou hiperinsulinemia aumentam os riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, porém estas interações não estão definitivamente estabelecidas. Dados epidemiológicos evidenciam que pacientes com diabetes mellitus tipo 2 tem três vezes mais chances de desenvolver hipertensão arterial e, a associação entre diabetes e hipertensão arterial aumenta fortemente a possibilidade destes pacientes desenvolverem doenças cardiovasculares e renais (140). Porém embora a relação entre hiperinsulinemia e aumento da pressão arterial citados anteriormente não demonstram a uma relação casual, diversos estudos têm evidenciado mecanismos através dos quais esta relação pode acontecer. Uma hipótese para a elevação da pressão arterial no presente estudo em voluntários obesos com hiperinsulinemia poderia decorrer de uma redução na resposta vasodilatadora induzida pela insulina e mediada por óxido nítrico (NO) nestes indivíduos. Segundo Carvalho e colaboradores, indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 apresentam uma vasodilatação reduzida quando mediada pelo NO. Quando a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) está sistemicamente disfuncional, ocorre uma menor resposta vasodilatadora dependente do endotélio neste grupo de indivíduos, em decorrência de uma redução na liberação de NO estimulado pela insulina (54).

Assim nossos resultados podem sugerir que a progressão da resistência à insulina pode desencadear doenças cardiovasculares, principalmente elevação da pressão arterial em indivíduos obesos com hiperinsulinemia.

Obesidade e hipertensão são duas desordens altamente relacionadas, porém é preciso mais cuidado na tentativa de estabelecer tal associação. Neste trabalho pôde-se observar de forma clara um aumento na pressão arterial no grupo de OB HI. Este aumento de pressão é caracterizado como um fator de risco para doenças cardiovasculares. Estudos em ratos *knockout* ou induzidos por dieta que causam obesidade, mostram uma evidente associação entre disfunção diastólica e um aumento da pressão arterial (141; 142; 143). Segundo Faselis e colaboradores, estima-se que 37% da população adulta apresenta um aumento de pressão e que 40% destas pessoas progridem para hipertensão em aproximadamente dois anos (142). Embora os mecanismos entre o aumento da pressão e a hiperinsulinemia do grupo de OB HI precise ser mais investigado, podemos supor que a disfunção endotelial e o aumento da atividade simpática, juntamente com o perfil inflamatório, observado nos indivíduos obesos com ou sem hiperinsulinemia, pode em longo prazo desencadear alterações na reabsorção de água e sódio e conseqüentemente hipertensão arterial (144). Em modelos animais resistentes à insulina, a deficiência na captação tecidual periférica de glicose e do efeito de vasodilatação da insulina, são manifestações observadas muito precocemente (145; 146). Outros fatores muito associados à resistência à insulina não estudados aqui são, o aumento na atividade do SRA e do estresse oxidativo na obesidade (38).

O descontrole na expansão do tecido adiposo é a característica fundamental da obesidade. O tecido adiposo deixou de ser visto apenas como um estoque de reservas energéticas e passou a ser um órgão endócrino e do sistema imune, interferindo em diversas respostas a diferentes agressões ou desajustes metabólicos (46). No presente estudo confirmamos que na obesidade, há uma secreção elevada de leptina, TNF- α , IL-6 e PCR, e estas citocinas estão associadas à resistência à insulina e a progressão da inflamação em órgãos ou sistemas específicos (147). Embora não tenha sido evidenciado diferença significativa entre os grupos de obesos, TNF- α , IL-6 e PCR podem causar resistência à insulina, através da ativação da MAP quinase, da PKC e SOSC-3, mediada por degradação do proteossoma (145). Outros estudos têm demonstrado que o tratamento de animais com TNF- α leva à redução da autofosforilação do receptor de insulina e inibição subsequente da fosforilação de IRS-1. O TNF- α induz modificação do IRS-1 por fosforilação em serina, tornando essa molécula inábil para a transdução do sinal da via insulínica intracelular. Em ratos obesos a neutralização dos efeitos do TNF- α provocou aumento da sensibilidade à insulina. Neste sentido, camundongos deficientes em TNF- α permaneceram sensíveis à insulina quando mesmo quando tratados com dieta rica em gordura (54). Outra fator

desencadeante da resistência à insulina seria a ativação do Toll-Like-Receptor 4 (TLR-4) e talvez outros TLRs por um excesso de nutrientes tais como ácidos graxos saturados, lipopolissacarídeos (LPS), ácido úrico e/ou disbiose intestinal contribuindo significativamente para inflamação sistêmica e hepática e a hiperinsulinemia em obesos. (148; 149)

Como descrito acima, estudos prévios tem demonstrado que o sistema renina-angiotensina, desempenhando um importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina. Quando inibidores da enzima conversora de angiotensina ou bloqueadores do seu receptor AT1 são administrados para o tratamento de hipertensão arterial, estes promovem um aumento da sensibilidade à insulina em pacientes hipertensos previamente resistentes à insulina. Basicamente a angiotensina II é capaz de reduzir a fosforilação em tirosina e aumentar a fosforilação em serina da subunidade β do receptor de insulina, assim como do IRS-1, mecanismos estes que desencadeiam a resistência à insulina (35).

Componentes do SRA não foram avaliados no presente estudo, porém, sabe-se que o tecido adiposo é sítio de produção de angiotensinogênio, renina, enzima conversora da angiotensina, angiotensina II e os receptores AT1R e AT2R (20), sendo a expansão do tecido adiposo no grupo obeso, uma possível hipótese para a resistência à insulina observada no grupo de OB HI.

Tem sido demonstrado que a adiponectina apresenta um efeito oposto às citocinas descritas acima. O aumento do tecido adiposo está também relacionado negativamente com os níveis séricos de adiponectina e conseqüentemente, aos seus efeitos antagônicos a citocinas pró-inflamatórias (20; 75). Dentre as ações metabólicas da adiponectina inclui aumento da sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo (54). Estudos observaram que a sinalização da adiponectina nestes tecidos acontece através da via MAP quinase, fosforilando esta proteína, e por conseqüência, pela fosforilação e inativação da enzima acetil CoA carboxilase (ACC), assim como pela ativação do receptor ativador e proliferador de peroxissomo α (PPAR α) elevando a oxidação de ácidos graxos e a captação da glicose pelos tecidos (150). Neste estudo ao avaliarmos o perfil inflamatório dos voluntários, não evidenciamos diferenças significativas entre os grupos de obesos normo ou hiperinsulinêmicos, contudo, os níveis séricos de adiponectina, foram significativamente menores no grupo de OB HI (Figura 6D), quando comparado aos outros grupos (Tabela 5). Este resultado pode ser correlacionado positivamente a resistência à insulina e ao aumento da pressão arterial, observado no grupo de OB HI.

Pesquisas evidenciam a possibilidade da implicação da adiponectina na gênese da hipertensão arterial. Animais deficientes para adiponectina, tratados com dieta rica em sal, mostram um aumento significativo na pressão arterial sistólica quando comparados ao tipo selvagem, independente da resistência à insulina, enquanto um aumento na expressão de adiponectina pode diminuir a pressão arterial sistólica em camundongos geneticamente obesos (151). Estudos clínicos evidenciaram que uma hipoadiponectinemia é um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial, independentemente da existência paralela de resistência à insulina ou diabetes (152; 153). Assim, tendo em conta as evidências na literatura comprovadas pelo presente estudo, podemos sugerir que a secreção de adiponectina aumentada no grupo OB NI, quando comparada ao grupo de OB HI, seja de extrema importância para a manutenção da sensibilidade à insulina e pressão arterial. Recentemente, estudos tem focado nos efeitos da adiponectina no SNS, no SRA e na função renal. A relação entre o aumento da atividade do SNS, resistência à insulina e hipertensão está bem reconhecida (31; 140; 145). A ativação do SNS na obesidade tem uma importante associação na disfunção metabólica (154). A hiperatividade simpática está correlacionada com a hipertensão e também está intrinsecamente relacionada com o início, manutenção e progressão da hipertensão arterial (155). Um estudo recente mostrou que a supressão da atividade do SNS esta associada à elevação da expressão de adiponectina. Por outro lado Tanida e colaboradores mostraram que a adiponectina atenua a pressão arterial e a atividade do SNS (156). Assim, a elevação da adiponectina no grupo de OB NI pode estar favorecendo a redução da ativação do SNS e consequentemente promovendo o controle ou a não elevação da pressão arterial.

Embora o aumento da atividade do SNS esteja associado à resistência à insulina, o aumento da atividade do SRA também corrobora para a resistência periférica insulínica. Esta atividade aumentada do SRA é um fator importante no desencadeamento de doenças renais e cardiovasculares em indivíduos obesos e diabéticos. Assim, as alterações metabólicas associadas à obesidade, têm sido associadas ao aumento na produção de angiotensina II, e ambas integram relevantes mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da resistência à insulina, hiperinsulinemia e hipertensão arterial (157).



6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do estudo concluímos que:

Indivíduos obesos apresentam uma massa adiposa maior que os indivíduos magros, e este excesso corrobora as alterações no metabolismo de carboidratos, na pressão arterial e no perfil inflamatório.

A resistência insulínica está presente na obesidade, porém este fenótipo não é encontrado em todos os indivíduos obesos.

O perfil lipídico, ácidos graxos livres e ácido úrico dos grupos estudados não foi um fator diferencial, contudo, podemos evidenciar diferenças significativas entre as citocinas avaliadas no grupo controle e nos grupos de obesos. Indivíduos obesos apresentam um quadro inflamatório muito importante para a modulação da resistência à insulina observada no grupo de obesos hiperinsulinêmicos. Porém o grupo de obesos normo-insulinêmico, embora evidenciado um aumento das citocinas inflamatórias, a concentração sérica aumentada de adiponectina, mantém a sensibilidade à insulina deste grupo. A concentração sérica de leptina estava aumentada nos grupos de obesos, confirmando sua ação na indução da produção de TNF- α e IL-6.

A pressão arterial sistólica aumentada no grupo de obeso hiperinsulinêmico nos mostrou a relação da resistência à insulina e o aumento da pressão arterial.

A função tubular glomerular renal pelo *clearance* de lítio e creatinina, nos mostrou que a reabsorção de sódio foi muito similar entre os grupos, independente da concentração de insulina.

A correlação entre a resistência à insulina e as variáveis insulina de jejum, pressão arterial sistólica, gordura corporal e adiponectina foi positiva, mas ao correlacionarmos a resistência à insulina com as citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-6 não foram significantes, mostrando mais uma vez que a modulação da resistência à insulina está neste estudo determinada pela concentração sérica de adiponectina.

Ao correlacionarmos pressão arterial sistólica com a massa de gordura, podemos evidenciar uma correlação positiva entre as variáveis, mostrando a influencia do aumento da massa adiposa na elevação da pressão arterial.

Por fim concluímos que a obesidade vem acompanhada de uma clara elevação da atividade inflamatória. É possível que esta atividade inflamatória esteja associada a distúrbios da modulação metabólica da via de carboidratos e lipídios pela modificação da sensibilidade periférica insulínica. Como resultado, a resistência periférica insulínica observada, avaliada

pelo HOMA-IR, está correlacionada à elevação da pressão arterial sistólica e diastólica, especificamente no grupo de obesos hiperinsulinêmicos.

O estudo também mostra que a despeito da retenção renal de sódio promovida pela sobrecarga oral de glicose, esta é dissociada dos níveis insulinêmicos alcançados pelos diferentes grupos experimentais.

As alterações observadas nos obesos hiperinsulinêmicos são provavelmente atenuadas pela concentração sérica de adiponectina no grupo de obesos normo-insulinêmico.

Contudo estes mecanismos precisam ser mais estudados para entendimento da associação entre obesidade, resistência à insulina, aumento da reabsorção de sódio e pressão arterial em obesos hiperinsulinêmicos.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rutkowski P, Klassen A, Sebekova K, Bahner U, Heidland A. Renal disease in obesity: the need for greater attention. *J Renal Nutrition*. 2006;16(3):216-223.
2. Salve MGC. Estudo sobre peso corporal e obesidade. *Revista Digital Buenos Aires*, 2005;89,ano10 [acesso em 04/jan/2013]; Disponível em: <http://www.efdeportes.com>
3. Organização Pan Americana de Saúde, Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. 2003.
4. Phillips CM, Perry IJ. Does Inflammation Determine Metabolic Health Status in Obese and Nonobese Adults? *J Clin Endocrin Metab*. 2013;26:2013-2038.
5. Coutinho, W. Obesidade: Conceitos e classificação. In: Nunes MA, Appolinário JC, Galvão AL, Coutinho W, *et al*. Transtornos alimentares e obesidade. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda.;1998:197-202.
6. Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman, DA, Schorr, AB, *et al*. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev of Cardiovasc Ther*. 2008;6(3):343-368.
7. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of WHO Consultation on Obesity. Geneva, 2000 Reprinted 2004.p:8-16.
8. International Association for the Study of Obesity. The Global Epidemic. [Acessado em 10/set.2009]. Disponível em <http://www.ionf.org/globalepidemic.asp>
9. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635-643.
10. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35:595-601.

11. Ramos AMPP, Barros Filho AA. Prevalência da obesidade em adolescentes de Bragança Paulista e sua relação com a obesidade do país. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(6):663-668.
12. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006;443:289–295.
13. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism.* 2004;89:2522-2525.
14. World health statistics 2013 (WHO) WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
15. World health statistics 2012. World Health Organization. Geneva. 2012 p:35.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.
17. Sowemimo AO, Yood SM, Moore JJ, Huang M, Ross R, Mcmillian U, *et al.* Natural history of morbid obesity without surgical intervention. *Surg Obes Relat Dis.* 2007;3(1):73-77.
18. Hall JE, Henegar JR, Dwyer TM, Liu J, Silva AA, Kuo JJ, *et al.* Is obesity a major cause of chronic kidney disease? *Adv. Ren Replace Ther.* 2004;11(1):41-54.
19. Cruz NG, Sousa LP, Sousa MO, Pietrani NT, Fernandes AP, Gomes KB. The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;99(2):85-92.
20. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(2):216-229.
21. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1597-1607.

22. Hunter S J, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 1998;105:331-345.
23. Muscelli E, Pereira JA, Lazzarin MACT, Silva CA, Pareja JC, Saad MJA. Lack of insulin inhibition on insulin secretion in non-diabetic morbidly obese patients. *Int J Obes.* 2001;25:798-804.
24. Muscelli E, Camastra S, Catalano C, Galvan AQ, Ciociaro D, Ferrannini E. Metabolic and cardiovascular assessment in moderate obesity: Effect of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(9):2937-2943.
25. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morrioni M, Ferrannini E. Insulin resistance in morbid obesity. Reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes.* 2002;51:144-51.
26. Camastra S, Manco M, Mari A, Baldi S, Gastaldelli A, Greco AV, *et al.* Beta-cell function in morbidly obese subjects during free living: long-term effects of weight loss. *Diabetes.* 2005; 54(8): 2382-2389.
27. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Buzzigoli E, Mahankali S, Ferrannini E, *et al.* Separate contribution of diabetes, total fat mass, and fat topography to glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3914–3921.
28. Tappy L, Felber J P, Jéquier E. Energy and substrate metabolism in obesity end postobese state. *Diabetes Care.* 1991;14(12):1180-1188.
29. Knight SF, Imig JD. Obesity, insulin resistance, and renal function.” *Microcirculation.* 2007;14:349-362.
30. Sarafidis, PA. Obesity, insulin resistance and kidney disease risk: insights into the relationship. *Curr Opin Nephrol Hypertension.* 2008;17:450-456.

31. Gontijo JA, Muscelli EO, Reduced renal sodium excretion in primary hypertensive patients after an oral glucose load. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(10):1291-1299.
32. Gabriely I, Yang XM, Cases JA, Ma XH, Rossetti L, Barzilai N. Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(3):R795-802.
33. Silva A, Carmo J, Dubinion J, Hall JE. Role of sympathetic nervous system in obesity related hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2009;11(3):206-215.
34. El-Atat FA, Stas SN, Mcfarlane SI, Sowers JR. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. *J Am Soc Nephrology.* 2004;15:2816-2827.
35. Carvalho-Filho MA, Carvalheira JBC, Velloso LA, Saad MJA. Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(2):195-203.
36. Wang O, Chen K, Zhao Y, Gao K, Sun YG, Yang M. Association between metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Khonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2008;36(7):618-622.
37. Souza ML, Berardi EO, Gontijo JÁ, Leme Junior CA, Cavicchio JR, Saad MJ. Insulin resistance and myocardial hypertrophy in the attenuated reduction in mean arterial pressure after a glucose load in hypertensive patients. *Braz J Med Biol Res.* 1995;28(9):967-972.
38. Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moriwa N, Murakami H, *et al.* Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *Journal of Hypertension.* 2004;22(10):1977-1982.
39. Ting SMS, Nair H, Ching I, Taheri S. Overweight, obesity and chronic kidney disease. *Nephron Clin PracT.* 2009;112(3):121-127.

40. Ku Ms, Lue KH, Li C, Sun HL, Chou MC. Association between angiotensina-converting enzyme gene polymorphism and childhood allergic rhinitis in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006;39(4):297-301.
41. Evangelista AR. Estudo comparativo do uso da eletroestimulação na mulher associada com atividade física visando à melhora da performance muscular e redução do perímetro abdominal. *Rev Fisioter Brasil.* 2003;4(1):49–59.
42. Guimarães DED, Sardinha FLC, Mizurini DM, Tavares do Carmo MG. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Revista de Nutrição.* 2007;(5):549-559.
43. Guirro, E, Guirro R. *Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologia.* 3.Ed. São Paulo: Editora Manole. 2004.
44. Maughan R, Gleeson M, Greenhaff P. *Bioquímica do exercício e do treinamento.* São Paulo: Manole, 2000.
45. Araújo APS, Menóia E. Atividade lipolítica durante a prática de atividade física: enfoque sobre o consumo de oxigênio, produção de ATP e o estímulo neuro–humoral. *Revista Saúde e Pesquisa.* 2008;1(2):177-184.
46. Wiecek A, Kokot F, Chudek J, Adameczak M. The adipose tissue-a novel endocrine organ of interest to the nephrologists. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:191-195.
47. Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest.* 2004;113(7):1530-1532.
48. Tchernof A, Bélanger C, Morisset AS, Richard C, Maolloux J, Laberge P, *et al.* Regional differences in adipose tissue metabolism in women. *Diabetes.* 2006;55(5):1353-1360.
49. Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathol Biol.* 2006;54(7):375-386.

50. Smith SA. Central role of the adipocyte in the insulin-sensitising and cardiovascular risk modifying actions of the thiazolidinediones. *Biochimie*. 2003;85(12):1219-1230.
51. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, *et al*. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: Effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5662-5667.
52. Hammelen VV, Dicker A, Rydén M, Hauner H, Lönnqvist F, Näslund E, *et al*. Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes*. 2002;51(7): 2029-2036.
53. Hotamisligil G, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995; 95:2409-2415.
54. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB, Citocinas disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras de Endocrinol e Metab*. 2006;50(2):304-312.
55. Exel EV, Gussekloo J, Craen AJM, Frolich M, Wiel AB, Westendorp RGJ. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:1088-1092.
56. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Citocinas. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000:113-130.
57. Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*. 2000;21(6):697-738.
58. Axelsson J. Obesity in chronic kidney disease: Good or bad? *Blood Purification*. 2008;26:23–29.

59. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):4-7.
60. Waldherr R, Noronha IL, Niemir Z, Krüger C, Stein H, Stumm G. Expression of cytokines and growth factors in human glomerulonephritides. *Pediatr Nephrol*. 1993;7(4):471-478.
61. Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. *J Bras Nefrol*. 2011;33(3):351-364.
62. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson JR, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, *et al*. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia-The good, the bad, and the ugly. *Kidney International*. 2005;67:1216-1233.
63. Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, *et al*. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- α or its receptors. *Diabetologia*. 2002;45:805-812.
64. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2169-2180.
65. Cho MH, Lee HS, Choe BH, Kwon SH, Chung KY, Koo JH, *et al*. Interleukin-8 and Tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol*. 2003;23(4):260-266.
66. Tang J, Yan H, Zhuang S. Inflammation an oxidative stress in obesity-related glomerulopathy. *Int J Nephrol*. 2012;2012:608397.
67. Patel NSA, Chatterjee PK, Di Paola R, Mazzon E, Britti D, Sarro A, *et al*. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;312:1170-1178.

68. Volp ACP, Alfenas RCR, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. *A Bras End e Metab.* 2008;52(3):537-549.
69. Pachaly MA, Nascimento MM, Sulnam ME, Hayashi SY, Riella MC, Manfro RC, *et al.* Interleukin-6 is a better predictor of mortality as compared to c-reactive protein, homocysteine, pentosidine and advanced oxidation protein products in hemodialysis patients. *Blood Purif.* 2008;26:204-210.
70. Kielar ML, John R, Bennett M, Richardson JA, Shelton JM, Chen L, *et al.* Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3315-3325.
71. Dummer CD, Thomé FS, Veronese FV. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: Novos conceitos de um velho problema. *Ver Assoc Med Bras.* 2007;53(5):446-540.
72. Black S, Kushner I, Samols D. C-Reactive Protein. *J Biol Chem.* 2004;279(47):48487-90.
73. Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effects of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2007;99:15B26.
74. Lech M, Rommele C, Anders HJ. Pentraxins in nephrology: C-reactive protein, serum amyloid P and pentraxin-3. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(4):803-811.
75. Asterholm IW, Scherer PE. Enhanced metabolic flexibility associated with elevated adiponectin levels. *Am J Pathol.* 2010;176:1364–1376.
76. Looker HC, Krakoff J, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tanaka S, Nelson RG, *et al.* Adiponectin concentrations are influenced by renal function and diabetes duration in pima indians with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4010-4017.
77. Ahima RS. Linking adiponectin to proteinuria. *The J of Clin. Invest.* 2008;118(5):1619-1622.

78. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, *et al.* Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clinical Investigation.* 2008;118(5):1645-1656.
79. Iglesias P, Díez JJ. Adipose tissue in renal disease: clinical significance and prognostic implications. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(7):2066-2077.
80. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:371-379.
81. Levine DZ, Iacovitti M, Robertson SJ, Mokhtar GA. Modulation of single-nephron GFR in the db/db mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol.* 2006;290:R975–R981.
82. Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T. An association between metabolic syndrome and the estimated glomerular filtration rate. *Inter Med.* 2008;47:1399-1406.
83. Pinhal CS, Lopes A, Torres DB, Felisbino SL, Rocha Gontijo JA, Boer PA. Time-course morphological and functional disorders of the kidney induced by long-term high-fat diet intake in female rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(10):2464-2476.
84. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D'Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int.* 2001;59:1498-1509.
85. Praga M. Obesity – a neglected culprit in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1157-1159.
86. Tsuboi N, Koike K, Hirano K, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T. Clinical features and long-term renal outcomes of Japanese patients with obesity-related glomerulopathy. *Clin Exp Nephrol.* 2012;17(3):379-385.
87. Jha V, Wang AY, Wang HY. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(3):32-38.

88. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ JR. Obesity-induced hypertension: renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension* 1993;22:292–299.
89. Nerpin E, Risérus U, Ingelsson E, Sundström J, Jobs M, Larsson A, *et al.* Insulin sensitivity measured with euglycemic clamp is independently associated with glomerular filtration rate in a community – based cohort. *Diabetes Care*. 2008;31(8):1550-1555.
90. Kramer H, Luke A. Obesity and kidney disease: a big dilemma. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007;16(3):237-241.
91. Ejerblad E, Forede MC, Lindblad P, Fryzek J, Mclaughlin JK, Nyrén O. Obesity and risk for chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrology*. 2006;17(6):1695-1702.
92. Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsch J, Gafter U. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol*. 2000;278:817–822.
93. Reisin E. Obesity and the kidney connection. *Am J Kidney Dis*. 2001;38:1129–1134.
94. Stengel B, Tarver-Carr ME, Powe NR, Eberhardt MS, Brancati FL. Lifestyle factors, obesity and the risk of chronic kidney disease. *Epidemiology*. 2003;14:479-487.
95. Davy, KP, Hall JE. Obesity and hypertension: two epidemics or one? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286:803-813.
96. Iseki K, Ikemiya Y, Kinjo K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney International*. 2004;65:1870-1876.
97. Chen J, Gu D, Chen CS, Wu X, Hamm LL, Muntner P, *et al.* Association between the metabolic syndrome and kidney disease in chinese adults. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:1100-1106.

98. Massiéra F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, *et al.* Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *The FASEB Journal*. 2001;15:15, p.2727-2729.
99. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue express angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensina II. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(11):3925-3929.
100. Harte AL, McTernan PG, McTernan CL, Crocker J, Starcynski J, Barnett AH, *et al.* Insulin increases angiotensinogen expression in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes, obesity and metabolism*. 2003;5:426-467.
101. Goossens GH, Blaak EE, Van Baak MA, Possible involvement of the adipose tissue renin angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity related disorders. *The International Association for the Study of Obesity*. 2003;4:43-55.
102. Cassis LA, Polices B, Yiannikouris F, Thatcher SE. Local adipose tissue renin angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10(2):93-98.
103. Saiki A, Ohira M, Endo K, Koide N, Oyama T, Murano T, *et al.* Circulation angiotensin II is associated with body fat accumulation and insulin resistance in obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2009;58:708-713.
104. Phillips CM. Metabolically healthy obesity: Definitions, determinants and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(3):219-227.
105. Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, Rabasa-Lhoret R, Poehlman ET. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89: 2569-2575.
106. Meigs JB, Wilson PWF, Fox CS, Vasan RS, Nathan DM. , Sullivan LM *et al.* Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:2906-2912.

107. Wildman RP, Kaplan R, Manson JE, Rajkovic A, Connelly SA, Mackey RH, *et al.* Body size phenotypes and inflammation in the Women's Health Initiative Observational Study. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2011;19:1482-1491.
108. Aguilar-Salinas CA, García EG, Robles L, Riaño D, Ruiz-Gomez DG, García-Ulloa AC, *et al.* High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4075-4079.
109. Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C, O'Shea DB. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2009;17:601-605.
110. Karelis A, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab*. 2004;30:569-572.
111. Li S, Chen W, Srinivasan SR, Xu J, Berenson GS. Relation of childhood obesity/cardiometabolic phenotypes to adult cardiometabolic profile: The Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol*. 2012;176 (7):142-149.
112. Appleton SL, Seaborn CJ, Visvanathan R, Hill CL, Gill TK, Taylor AW, *et al.* Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. *Diabetes Care*. 2013;36(8):2388-2394.
113. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, *et al.* The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4145-4150.
114. Koster A, Stenholm S, Alley DE, Kim LJ, Simonsick EM, Kanaya AM *et al.* Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2010;18:2354-2361.
115. Mattar R. Avaliação da composição corporal por bioimpedância: uma nova perspectiva. *J Biomolec Med Free Rad*. 1995;4(1):27-29.

116. Rocha EEM. Impedância bioelétrica: avaliação da composição corporal na prática clínica. *Nutrição Enteral e Esportiva*. 1994;3:7-10.
117. Heyward VH, Stolarczyk LM. Avaliação da composição corporal aplicada. São Paulo: Editora Manole, 2000.
118. Rastam L, Prineas RJ, Gomez-Marin O. Ratio of cuff/arm circumference as a determinant of arterial blood pressure measurements in adult. *J Inter Med*, 1990;227:225-232.
119. Diretrizes Brasileiras de Monitorização Ambulatorial (MAPA) e Residencial (MRPA) da Pressão Arterial. *Revista Hipertensão*, julho e agosto de 2011, ano 14, 14(1):8
120. Menegon LF, Zapparoli A, Boer PA, Almeida AR, Gontijo JA. Long-term effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling and arterial blood pressure in rats. *Brain Res Bull*. 2008;76(4):344-348.
121. Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Trecher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
122. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol e Metab*. 2006;50(2):208-215.
123. Potteiger JA, Jacobsen DJ, Donnelly JE. A Comparison of methods for analyzing glucose and insulin areas under the curve following nine months of exercise in overweight adults. *Int J Obes*. 2002;26:87-89.
124. Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med*. 2012;63:329-343.
125. Garver WS, Newman SB, Gonzales-Pacheco DM, Castilho JJ, Heidenreich RA, Orland RA. The genetics of childhood obesity and interaction with dietary macronutrients. *Genes Nutr*. 2013;8:271-287.

126. Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92:707-715.
127. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1487-1495.
128. Reis MCS. Definição de valores de referência para os índices HOMA-IR e HOMA-BETA e sua importância clínica em amostra populacional do Distrito Federal. [Dissertação]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2009.
129. Nolan JJ, Faerch K. Estimating insulin sensitivity and beta cell function: perspectives from the modern pandemics of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55:2863-2867.
130. Kirchner KA. Insulin increases loop segment chloride reabsorption in the euglycemic rat. *Am J Physiol.* 1988; 255:F1206-F1213.
131. Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal human. *JCI.* 1991; 87:2246-2252.
132. Conlin PR, Kim SY, Williams GH, Canessa ML. Na/H exchanger kinetics in adrenal glomerulosa cells and its activation by angiotensin II. *Endocrinology.* 1990; 127:236-244.
133. Ferrannini E, Buzzicoli G, Bonadonna RN. Insulin resistance in essential hypertension. *Eng J Med.* 1985; 317:350-357.
134. Florey CV, Uppal S, Lowy C. Relation between blood pressure, weight, and plasma sugar serum insulin levels in schoolchildren age 9-12 years in Westland, Holland. *Br Med J.* 1976; 1:1368-1371.
135. Lucas CP, Estigarribia JA, Darga LL, Reaven GM. Insulin and blood pressure in obesity. *Hypertension.* 1985; 7:702-706.

136. Minicardi V, Camellini L, Belloidi G, Ferrannini E. J Clin Endocrinol Metabol. 1986; 62:1302-1304.
137. Wong C, Marwick TH. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007;4:436-443.
138. Witteles RM, Fowler MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. J Am Coll Cardiol. 2008; 51:93-102.
139. Abel ED, O'Shea KM, Ramasamy R. Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:2068-2076.
140. Sowers JR. Diabetes mellitus and vascular disease. Hypertension 2013;61:943-947.
141. Majane OH, Vengethasamy L, du Toit EF, Makaula S, Woodiwiss AJ, Norton GR. Dietary induced obesity hastens the progression from concentric cardiac hypertrophy to pump dysfunction in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 2009;54:1376-83.
142. Faselis C, Doumas M, Kokkinos JP, Demosthenes P, Kheirbek R, Sherif HM, *et al.* Exercise capacity and progression from prehypertension to hypertension. Hypertension. 2012;60:333-8.
143. DeMarco VG, Johnson MS, Ma L, Pulakat L, Mugerfeld I, Hayden MR, *et al.* Overweight female rats selectively breed for low aerobic capacity exhibit increased myocardial fibrosis and diastolic dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012;302:H1667-1682.
144. Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. Hypertension. 2003; 41:625-633.
145. Aroor AR, Mandavia CH, Sowers JR. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. Heart Fail Clin. 2012;8: 609-617.

146. Abel ED, O'Shea KM, Ramasamy R. Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2068-2076.
147. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006; 55:1537-1545.
148. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*. 2012;4:1095-119.
149. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34:39-58.
150. Santos AC. As conexões entre a ativação de TLR4 por ácidos graxos e a indução de stress de retículo endoplasmático – implicações na gênese da obesidade. [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2008
151. Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, *et al.* Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension*. 2006;47:1108-1116.
152. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, *et al.* Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*. 2004;43:1318-1323.
153. Chow WS, Cheung BM, Tso AW, Xu A, Wat NM, Fong CH, *et al.* Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. *Hypertension*. 2007;49:1455-1461.
154. Mancia G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, Julius S, *et al.* The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2007;25:909-920.
155. Grassi G. Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertens Res*. 2006;29: 839-847.

156. Tanida M, Shen J, Horii Y, Matsuda M, Kihara S, Funahashi T, *et al.* Effects of adiponectin on the renal sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007; 232:390-397.
157. Bender SB, McGraw AP, Jaffe IZ, Sowers JR. Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: an early contributor to diabetes-related vascular disease? *Diabetes*. 2013; 62:313-319.



8. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Estudo da função renal em indivíduos obesos.

Equipe de pesquisa: Amanda Roberta de Almeida

Michele Bianca Zanini

Aglécio Luiz de Souza

José Antonio Rocha Gontijo

Sarah Monte Alegre

Justificativa: Esse estudo tem como objetivo avaliar a função renal em indivíduos com IMC ≥ 30 , sem hipertensão e diabetes, avaliar níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias e as de sinalização de insulina e angiotensina presentes na obesidade e comparar essas variáveis com indivíduos de peso normal (IMC ≤ 25).

Procedimentos: Se você concordar em participar haverá um registro de seus dados como idade, sexo, nível de atividade física, histórico de doenças etc. Será realizada uma avaliação composta pelas medidas de peso, altura, circunferência da cintura e do quadril, composição corporal através de bioimpedância (usado para avaliar a quantidade de músculo e gordura do seu corpo). Além disso, será avaliada a curva glicêmica (teste de tolerância á glicose oral) e a função renal, por meio do clearance de creatinina e lítio, onde por 3 horas, você irá beber água para manter um fluxo renal constante e assim coletaremos urina, mediremos sua glicemia e nível de insulina. Para a realização do clearance de lítio, você deverá tomar um comprimido de carbonato de lítio 300mg, 14 horas antes do início das coletas. Para análise sanguínea, será colhido um total de 20 ml em jejum para dosagens bioquímicas como a quantificação de colesterol, triglicérides, glicemia, insulina, ácido úrico, interleucina-6, fator de necrose tumoral – α , proteína C reativa, radicais livres e enzimas antioxidantes e 100 ml de sangue durante toda a curva glicêmica e clearance de creatinina. Esta realização de coleta de sangue não acarretará nenhum prejuízo à saúde dos envolvidos. Todos esses procedimentos serão realizados na Unidade Metabólica do HC-UNICAMP e acompanhados por médico habilitado para a realização do procedimento. Uma semana após a curva glicêmica, iremos realizar uma biópsia do músculo e tecido adiposo da coxa esquerda. Também será realizada em ambiente adequado, com material estéril e descartável. Esse procedimento será feito por médicos

capacitados e treinados para a sua realização. Não há riscos previsíveis de prejuízo de seu tecido muscular ou problemas relacionados à movimentação.

Riscos: Ao participar, você não estará correndo nenhum risco de vida. Haverá coleta de sangue que não acarretará qualquer risco a sua saúde.

A coleta será realizada após jejum mínimo de 12 horas, por pessoas devidamente treinadas. Os exames serão realizados no Laboratório da Unidade Metabólica (6º andar - Hospital de Clínicas) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O material utilizado para a coleta será totalmente descartável, excluindo qualquer possibilidade de contaminação.

Benefícios: Você será informado (a) sobre todos os resultados dos exames realizados.

Participação e afastamento: Sua participação é voluntária e você poderá deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem penalização ou prejuízo à sua saúde.

Sigilo: Os resultados serão mantidos em sigilo e sua identidade não será revelada nem divulgada em apresentações ou publicações.

Você também receberá tratamento médico e indenização por órgão financiador caso haja danos que justifiquem, causados diretamente pela pesquisa.

A presença de responsáveis ou cônjuge, se o desejarem será permitido durante a realização dos exames.

Telefones para contato: Se você tiver alguma dúvida, comentário ou reclamação pode entrar em contato com a equipe de pesquisa.

Professora Sarah Monte Alegre – Departamento de Clínica Médica, FCM - Unicamp,

Fones: (19) 35217098 / 35219202.

Amanda Roberta de Almeida.

Fone: (19) 35219132

Michele Bianca Zanini.

Fone: (19) 35217155

Aglécio Luiz de Souza.

Fone: (19) 35219202

José Antonio Rocha Gontijo.

Fone: (19) 35218927

Anexos

136

Ou com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Fone: (19) 35218936

Consentimento:

Eu, _____

RG número: _____ data de nascimento: ___/___/___

Residente: _____

Estou suficientemente informado e concordo em participar dessa pesquisa

Assinatura do voluntário: _____, data: ___/___/___

Prehypertensive, metabolic and inflammatory disorders are associated to decreased adiponectin and enhanced insulin plasma levels in a specific subgroup of obese subjects.

Running title: Metabolic and inflammatory disorders in obese subjects

Amanda Roberta de Almeida, Sarah Monte-Alegre, Michele Bianca Zanini, Aglécio Luiz Souza, Elinton Adami Chaim, Maurício Etchebehere & José Antonio Rocha Gontijo

Disciplina de Medicina Interna, Laboratório de Metabolismo Hidrossalino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-592 Campinas, SP, Brasil.

Conflict of interest: We affirm that there is no conflict of interest

Acknowledgments:

Grants from CNPq (No.500868/91-3), CAPES and FAPESP (2010/52696-0 and 2009/52325-5) supported this work. The authors wish to thank Bs. Conceição Aparecida da Silva for expert technical assistance.

Correspondence:

J.A.R. Gontijo, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-592 Campinas, SP, Brasil.

Phone: 55-19-3521 8924; FAX: 55-19-3521 8925

E-mail: gontijo@fcm.unicamp.br

Abstract

Obesity and hypertension are two complex disorders that are closely interrelated, but the precise underlying association remains elusive. Therefore, the present study was designed to establish relationship between presumable metabolic disorder, renal sodium retention and enhanced blood pressure in a group of obese subjects compared with, gender and age-matched, lean volunteers. The present study demonstrates that a hyperinsulinemic subgroup of well-characterized metabolic syndrome bearers-obese subjects, but not all obese subjects, show higher glycemic and elevated blood pressure levels when compared to lean subjects (LS) and normoinsulinemic (NI) groups. Here, the combination of hyperinsulinemia, higher HOMA-IR associated with lower QUICKI indexes in HI obese subgroup, strongly suggests the occurrence of insulin resistance and, as previously demonstrated, a defect in insulin-stimulated glucose uptake. The surprising finding of the present report showed a similar insulin-mediated reduction of post-proximal renal sodium excretion in both, lean and obese subjects, after oral glucose load, despite elevated and persistent insulin serum levels in hyperinsulinemic obese subgroup. The renal sodium reabsorption data from current study could at least argue favorably to normal kidney insulin sensitivity in these volunteers. In conclusion, this study highlight the importance of dysfunctional inflammatory modulation associated with metabolic disorders (hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance), high blood pressure, and renal dysfunction in a particular subgroup of obeses. Further studies will be required to define the precise mechanism involved in the interaction between obesity, serum insulin-glucose levels, abnormal renal sodium reabsorption and elevated blood pressure in HI obese subjects.

- *Keywords:* Obesity, metabolic syndrome, arterial hypertension, inflammation, renal function

Introduction

Worldwide epidemiological study recently showed that about to 1,4 billion adult people were overweight, body mass index (BMI) above to 25 and, 500 million were considered obese with BMI above to 30 [1]. Obesity, a public health problem of the first order for industrialized and non-industrialized countries dramatically cause a reduction in overall life expectancy [2]. The prevalence of obesity in different populations is related to environmental factors, such as reduced physical activity and diet, mainly. Nowadays,

with growing industrialization and modern lifestyle, the access to high fat and carbohydrate diets has changed the eating habits of the population. These aspects interact with genetic factors, which may explain the excessive body fat throughout the world [3]. Overweight and obesity are related to increased prevalence of cardiovascular disease, dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus, neurological disease, chronic kidney disease and cancers [4-7]. Obesity appears to be an important factor in elevating blood pressure in many prehypertensive individuals since studies have shown that high blood pressure is more prevalent in obese than in non-obese subjects [1,3]. In this way, experimental studies have demonstrated that weight gain, even over a period of a few weeks, consistently elevates blood pressure and weight loss decreases blood pressure independent of changes in sodium intake. Recently, study in our laboratory has demonstrated that podocyte injury in parallel with proteinuria and evidence of epidermal mesenchymal transition transformation are associated with long-term loss of kidney function and renal sodium and water retention in obesity induced by high-fat diet intake in rats [7]. However, establishing cause-and-effect relations has been hampered by the lack of suitable animal models that mimic obesity induced hypertension in humans and that allow sequential changes in renal, endocrine, and cardiovascular function to be monitored during the development of obesity. Although this association between obesity and hypertension is widely recognized, the mechanisms responsible for weight-related changes in blood pressure have not been elucidated. Also, sparse reports that deal with the relationship between inflammatory response, plasma insulin and cytokines levels and blood pressure in obese subjects are known [to revision see ref. 50,60]. Additionally, in prehypertensive obese subjects inflammatory response, insulin resistance and other surrogate markers may be associated with enhanced tubular sodium reabsorption [17,31-37,59,60]. However, the pathophysiological mechanisms and humoral factors involved in obesity and that lead to sodium retention and higher blood pressure in obesities are still unclear. Therefore, the present study was designed to establish relationship between presumable metabolic disorder, renal sodium retention and enhanced blood pressure in a group of obese subjects compared with, age-matched lean volunteers. To address the different parameters among lean and obese groups, the study was performed by examining oral glucose tolerance test, HOMA-IR and QUICKI index, renal tubule sodium handling and plasmatic inflammatory cytokine markers.

Subjects and Methods

Subjects - A total of 40 normotensive volunteers aged 18-58 years were enrolled in the study and divided into two subject groups: (1) 13 lean (LS, BMI 22.92 ± 2.03) and, (2) 27 outpatient obese (OS, BMI 36.15 ± 3.84) volunteers. Body mass index (BMI) was calculated based on ratio between body mass (in kg) and squared height (in meters) [weight (kg)/height (m²)]. On the basis of fasting plasma insulin and glucose levels homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), two distinct obese subgroup profiles were identified by HOMA-IR z-score, and subdivided in (3) 15 normoinsulinemic obese (NI, BMI 35.25 ± 3.80 kg/m²) and (4) 12 hyperinsulinemic obese (HI, BMI 37.05 ± 3.88 kg/m²). The characteristics of these experimental groups are presented in Table 1. A complete medical examination was carried out to exclude arterial hypertension (their office systolic and diastolic pressure should be lower than 140 and 90 mmHg, respectively, when measured on at least three occasions) and personal history of diabetes mellitus (fasting glucose less than 5mM), or chronic renal, liver and others endocrine diseases. Both lean and obese subjects had negative first degree familiar histories of diabetes mellitus and arterial hypertension. None of the volunteers had shown recent changes in the body weight or dietary habits, and they were asked to continue their normal activities throughout the study. The female participants were studied during the follicular phase of the menstrual cycle. Other exclusion's criteria for all the subjects were: steroidal and non steroidal anti-inflammatory therapies, hormonal substitutive or contraceptive therapy, hormonal therapy for any thyroid dysfunctions, drugs or alcohol abuse, smoking and mental disability. The protocol (#1221/2009) was approved by Institutional Ethics Committee and all subjects gave their consent to participate of the study after being informed about the nature and purpose of the investigation, which was conducted according to the guidelines for human experimentation established by the Declaration of Helsinki (1964) and Brazilian laws on this matter. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Experimental design: Measurements and Definitions – The studies were performed in the morning after 12-14 h overnight fast during which water ingestion was permitted as previously described [8-10]. Briefly, a single dose of lithium carbonate (Li₂CO₃) 300 mg was administered to the all subjects 14 hours before the renal tests. At 8:00 a.m.,

each subject was asked to empty his bladder and to discard the urine. An intravenous catheter was then inserted into the left arm. Immediately thereafter, water diuresis was induced by an oral loading equivalent to 20 ml of tap water/kg body lean mass given between 8:00 and 8:45h a.m. The subjects rested comfortably in the sitting position throughout the study and stood only to urinate. The urinary volume losses were replaced with drinking tap water every hour from 9:00 to 11:00h a.m. A oral glucose tolerance test (*OGTT*) consisting of a 75 g glucose load as a 22% solution in water was performed in the morning concomitantly with renal tests in both lean and obese groups. Venous blood was sampled at 30, 45, 60, 90 and 120 minutes for determination of glucose and insulin plasma levels. For each subject, the following parameters were determined: blood pressure measured by an appropriated mercury cuff, using a stethoscope placed over the brachial artery for auscultation of pulse, according to the Task Force Report on High Blood Pressure (NHBPEP, 1996), BMI percentile, as well as serum concentrations of glucose, insulin, total cholesterol, triacylglycerols, high-density lipoproteins (HDL) and low-density lipoproteins (LDL) cholesterol. On the basis of fasting plasma insulin and glucose levels homeostasis model, assessment of insulin resistance (HOMA-IR) [11] and quantitative insulin-sensitivity check (QUICKI) [12] indexes were calculated. HOMA-IR and QUICKI were calculated according to the formulae: $HOMA-IR = \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{fasting blood glucose (mM)} / 22.5$ and, $QUICKI = 1/[\log \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) + \log \text{fasting blood glucose (mg/100 ml)}]$, i.e. $1/[\log \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) + \log \text{fasting blood glucose (mM)} \times 18.182]$.

Creatinine and Lithium Clearance: The creatinine clearance (*CCr*) used to estimate the glomerular filtration rate and the lithium clearance (*CLi*) used to estimate the sodium output from the proximal tubule were calculated by standard formulas $(U.V)/P$ where, U is the urinary creatinine and lithium concentrations, V is the urinary flow and P is the creatinine and lithium plasma levels. Fractional sodium (FE_{Na}) and potassium (FE_K) excretion were calculated as $C_{Na}/C_{Cr} \times 100$ and $CE_K/CF_K \times 100$, respectively, where C_{Na} is sodium clearance, CE_K is potassium clearance, CCr is creatinine clearance and CF_K is filtered load potassium. The fractional proximal (FEP_{Na}) and post-proximal ($FEPP_{Na}$) sodium excretion were calculated as $C_{Li}/C_{Cr} \times 100$ and $C_{Na}/C_{Li} \times 100$, respectively [7,13-15].

Biochemical analysis: Plasma and urine sodium and potassium concentrations were measured by flame photometry (Micronal, B262, São Paulo, Brazil), while creatinine concentrations were determined spectrophotometrically (Instruments Laboratory, Genesys V, USA). The Glucose Analyzer YSI 2300 measured plasma glucose. Plasma concentrations of insulin and C-peptide were measured by immunoassay (Millipore, Billerica, USA, with sensibility of 1 μ U/ml; and 0,05ng/ml, respectively). The HDL, LDL cholesterol and Triglyceride levels were also measured using enzyme immunoassay kits with a Modular Analytic P Biochemistry Analyzer (Roche®) according to the manufacturers' protocols. The cytokines were measured by immunoassay (adiponectin, Millipore, Billerica, USA, sensibility 0,155 ng/ml; IL-6 R&D SYSTEMS®, Minneapolis, USA, sensibility 0,039 pg/ml; leptin Millipore, Billerica, USA, sensibility 0,195 ng/ml; TNF- α R&D SYSTEMS®, Minneapolis, USA; CRP DIAsource ImmunoAssays S.A, Louvain-la-Neuv, Belgium, sensibility 10ng/ml).

Data presentation and statistics: All analyses were performed using SPSS (SPSS version 17.0). Data obtained from this study are expressed as the mean \pm SD or median and quartile deviation when appropriated. The diagnostic checking was performed by analysis of the correlations of residues between the model and the samples. The integrated glucose and insulin secretion, i.e., the total area under curve (tAUC, mg/ml/120 min and μ U/ml/120 min, respectively) was calculated by the trapezoidal method and we have used it to establish the statistical difference between the lean and subgroups of obese subject. Statistical analyses were performed using non-parametric analysis by Kruskal-Wallis test or Student *t*-test when appropriated from GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA). Comparisons involving only two means within or between groups were carried out using a Student *t*-test. We also analyzed independent factors related to systolic blood pressure, body constitution and HOMA-IR index values with multiple linear regression analysis. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Subjects Characteristics - The characteristics of the all groups included in this study are presented in Table 1. The three groups were well matched for age. The mean age of the lean and obese subjects was respectively, 33 \pm 12 and 29 \pm 7.5 years (NI, 29 \pm 7.0; HI,

29 ± 8.0). Considering the gender distribution, 44.4% of LS and 35% of OS were male. On the basis of fasting plasma insulin and glucose levels homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), two distinct obese subgroup profiles were identified by HOMA-IR z-score, and subdivided in normoinsulinemic obese and hyperinsulinemic obese volunteers (Figure 1). The mean HOMA-IR index value were significantly higher in HI obese subgroup when compared to LS and NI [HI: 2.19±0.70 (n=12) vs. LS: 0.83±0.23 (n=12) and NI: 0.98±0.22 (n=15), P<0.0001].

The BMI differed significantly (P<0.0001) between LS (22.92 ± 2.03) and both normoinsulinemic (35.25 ± 3.80 kg/m²) and hyperinsulinemic (37.05 ± 3.88 kg/m²) obese subjects (Table 1). Mean lean mass (kg), fat mass (kg), percentual water body constitution (%) and basal metabolic rate (kcal) were significantly higher in both obese subgroups when compared to LS values (Table 1). There were no significant differences between the plasmatic values to triglyceride, cholesterol, HDL, LDL and very-low density lipoprotein from the LS group compared with OS subgroups (Table 2). Additionally, as can be seen in Table 3 and Figure 2, the basal systolic blood pressure (in mmHg) from HI subjects (130.7 ± 4.71) was significantly higher than from LS (114.8 ± 16.6, P<0.002) and NI (122.7 ± 12.3, P<0.024) volunteers while the diastolic blood pressure was different in NI subgroup when compared to LS subjects (P<0.031).

Fasting Glucose and Insulin levels and Glucose Tolerance Test (GTT) –The HI subgroup showed higher basal plasmatic insulin and C peptide levels after overnight fasting (Insulin: 10.85±4.09 µg/ml and C peptide: 1.37±0.59 ng/ml), when compared to the LS (Insulin: 4.25±0.86 µg/ml and C peptide: 0.774±0.12 ng/ml, P<0.0001) and NI (Insulin: 5.51±1.18 µg/ml and C peptide: 1.13±0.82 ng/ml, P<0.027) groups (Table 4, Figure 3). The fasting glucose plasma level was significantly different only when obese HI and NI were compared (P<0.024) (for details see Table 4). Otherwise, the HI group achieved significantly higher plasma glucose concentrations than the LS and NI groups at 30, 60, 90 and 120 minutes, when analyzed the post-absorptive plasma glucose levels after glucose oral loading (Table 4). Thus, the incremental total area under the curve (tAUC) to glucose (Figure 3A) and insulin (Figure 3B) in HI was significantly higher (P<0.001) when compared to the LS and NI obese subgroup. The HOMA-IR index, taken as a measure of insulin resistance, was significantly enhanced in HI subjects when compared to the LS and NI subgroups (Figure 1). Reciprocally, the QUICKI index, a

measure of insulin sensitivity, was significantly decreased in HI obese subjects when compared with LS and NI volunteers ($P < 0.0001$) (Table 4, Figure 3C).

Cytokines and inflammatory response - Circulating concentrations of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein, measured in basal period, are presented in Table 5. The present study showed a striking inflammatory difference between evaluated lean and obese experimental groups, being significantly greater in obese subjects when compared to the control (Figure 4) subjects. Otherwise, the adiponectin measured in basal period (Table 5; Figure 4D), was significantly enhanced in NI subjects when compared to HI groups ($P < 0.04$). As presented in Figure 4, the obese subjects showed an expressive and significant increase of IL-6 (Figure 4A), TNF- α (Figure 4B) and C-reactive protein (Figure 4C) plasma levels compared with the LS group (Figure 6E). No difference in leptin plasma level was observed in HI and NI subgroups (Table 5).

Renal Function Data - The data for renal function of both LS and OS, after oral glucose load (OG), are summarized in Figure 6. The urinary flow rates (Figure 6B) did not significantly differ among the groups during the renal tubule sodium handling studies, except after 120 min of OG in HI subgroup. The glomerular filtration rate (Figure 6A), estimated by CC_r , before and after oral glucose load and, consequently, the calculated glomerular filtered load did not change significantly in LS subjects when compared to age-matched obese subgroups. The significant decrease of the $FEPP_{Na}$ (Figure 6D) in normoinsulinemic ($5.91 \pm 1.13\%$, $n=13$, $P < 0.035$ and $P < 0.022$, respectively vs. LS and HI) but not in LS ($7.46 \pm 1.94\%$, $n=10$) and in hyperinsulinemic obese subjects ($7.92 \pm 2.68\%$, $n=11$) was not accompanied by a significant decrease in proximal (FEP_{Na} , Figure 6E) and proximal sodium excretion (FE_{Na} , Figure 6C) however, we observed a consistent trend to FE_{Na} falling in all groups of subjects. This expressive decrease in $FEPP_{Na}$ and FE_{Na} produced by oral glucose intake was followed by significant decrease in kaliuresis (Figure 6F) in the all experimental groups. The experimental groups (LS: 1.24 ± 0.62 or obese NI: 1.02 ± 0.42 and HI: 1.07 ± 0.35) did not showed significant changes in urinary protein excretion (in mg/dl).

Parameters Interaction Analysis – Figure 7 shows the interaction between independent factors related to systolic blood pressure, body constitution and estimating HOMA-IR

index values with multiple linear regression analysis. The data confirms a positive and significant high correlation between basal fasting insulin plasma level, HOMA-IR index, fat body mass and systolic blood pressure ($P < 0.001$). However, a significant negative correlation was observed between increased HOMA-IR index and adiponectin plasma levels ($P < 0.033$).

Discussion

More and more evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of obesity on kidney morphology and function disorders. The prevalence of obesity is increasing by alarming proportions worldwide and more than 20% of the world population is overweight, while nearly 300 million are obese [16-19]. Driving forces for overweight and obesity include increasing sedentary lifestyle and consumption of a western diet high in fat, fructose and salt and their interaction with genetic factors and epigenetic processes [20-22]. The present study demonstrates that a hyperinsulinemic subgroup of well-characterized metabolic syndrome bearers-obese subjects, but not all obese subjects, particularly those hyperinsulinemic, show higher glycemic and elevated blood pressure levels when compared to LS and NI groups. Here, it has been supposed that insulin resistance may result from a cluster of inflammatory and metabolic disorders with an inherent potential for hemodynamic abnormalities particularly, arterial hypertension. Also in the current study, the combination of hyperinsulinemia, higher HOMA-IR associated with lower QUICKI indexes in HI obese subgroup, strongly suggests the occurrence of insulin resistance and, as previously demonstrated, a defect in insulin-stimulated glucose uptake [23-26].

There is substantial indirect evidence that insulin resistance may play a role in the etiopathology of hypertension in some patients. [27-30]. Furthermore, there is a highly significant relationship between obesity, plasma insulin concentration and increased blood pressure although, the mechanisms by which insulin resistance, hyperinsulinemia or both increase the risk of developing cardiovascular disease are not well defined. Otherwise, the prevalence of hypertension in type 2 diabetes mellitus is increased 3-fold, and the coexistence of hypertension in diabetic patients greatly enhances the development of cardiovascular disease and chronic renal failure [27]. The link between hyperinsulinemia and high blood pressure described above does not prove the presence of causal relationships, but experimental findings have shown possible

mechanisms, which may account for a putative relationship. However, taking in account prior data, our findings may suggest that progression of insulin resistance may cause profound cardiovascular dysfunction, particularly on arterial pressure control in obese subjects with hyperinsulinemia and insulin resistance.

Obesity and hypertension are two complex disorders that are closely interrelated, but the precise underlying association remains elusive. So, the current study shows, despite on normal range, a clear and significant increase of the arterial pressure in hyperinsulinemic obesities, characterizing a prehypertension state. Prehypertension is increasingly recognized as a risk factor for cardiovascular disease. This is supported by studies demonstrating the association of increased systolic or diastolic dysfunction in a prehypertension state in genetic or diet-induced rodent models of obesity [31-34]. It is estimated that 37% of the adult population has prehypertension and 40% of these people will progress to hypertension within a two-year time frame [31]. In this way, such as observed in the current study, impaired insulin stimulated uptake of glucose associated with impaired vasodilatation have been shown to be an early manifestations in insulin resistant models of obesity [19,36,37]. In this respect, increased activation of renin-angiotensin system (RAS) and enhanced oxidative stress within cardiovascular tissue in obesity are important mediators of insulin resistance and vasoconstriction [38].

Although the precise mechanism by which arterial blood pressure enhances in HI obese subjects remain to be elucidated, we may suppose that a systemic inflammatory response, confirmed in this study, endothelial dysfunction, sympathetic neural and renin-angiotensin overactivity and renal non-control of the fluid and electrolyte balance is thought to play a dominant role in the long-term sodium and water retention, vascular resistance and consequently on imbalance of blood pressure control [35]

The uncontrolled expansion of adipose tissue is the key feature of obesity. In the past two decades, the view of adipose tissue has gone from revolutionary change from inert energy store to the biggest endocrine organ [39]. The present study confirms that in the obese state, the secretion of leptin, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6 is increased, and these molecules have been shown to be associated with insulin resistance and the progression of inflammation [39]. The only hormone displaying an opposite trend is adiponectin. A large body of evidence implicates decreased adiponectin levels as a mediator of some of these effects. As such, the obesity-related downregulation of

adiponectin levels in this obese subgroup have been positively associated with insulin desensitization and significantly higher arterial pressure. Studies have demonstrated that adiponectin may be involved in the progression of hypertension. Thus, on a high-salt diet, Ohashi et al [40] showed that adiponectin-deficient animals display significantly higher systolic blood pressure compared with wild-type control animals independent of insulin resistance while overexpression of adiponectin can also decrease the systolic blood pressure in genetically obese mice. The association between adiponectin and hypertension is also evident in clinical studies by showing that hypoadiponectinemia is a risk factor for hypertension independent of insulin resistance and diabetes [41,42]. Taking in account these findings, speculatively in the present study, we may hypothesize that adiponectin, secreted from adipose tissue decreases the risk for insulin resistance, inflammation, and hypertension development in a particular subgroup of normoinsulinemic obesities (Figure 8).

The current investigation shows that obese group, particularly HI subjects, show a pronounced inflammatory profile characterized by enhanced TNF- α , IL-6 and PCR plasma levels. These findings confirm prior ones showing that obesity results in inflammatory responses that have been often referred such as metabolic inflammation or neologically by metaflammation [43,44]. Although mechanisms underlying this inflammatory response are not well understood, endoplasmic reticular stress is one of the cellular stress events that activate inflammatory signaling pathways including activation of JNK and mTOR [43,44]. These serine kinases not only mediate adipose tissue dysfunction but also phosphorylate serine residues of IRS-1, thereby mediating insulin resistance in muscle and adipose tissue. Also, have been shown that TNF- α and IL-6 cause systemic insulin resistance through activation of MAP kinases, protein kinase C (PKC) and SOCS-3 mediated proteasome degradation [19]. In addition to adipose tissue dysfunction, activation of Toll-like receptor 4 (TLR-4) and perhaps other TLRs induced by nutrients excess such as saturated fatty acid, gut derived lipopolysaccharide (LPS), uric acid and/or intestinal dysbiosis contributes significantly to hepatic and systemic inflammatory response in hyperinsulinemic obesities [45,46].

Nevertheless, despite the well-established association of adiponectin with metabolic disorders and hypertension, very few studies address the relationship between adiponectin and hypertension at a mechanistic level. Recently, several studies have also focused on the effects of adiponectin on the sympathetic nervous system (SNS), RAS

and kidney function. The role of increased SNS activity in insulin resistance and hypertension is increasingly recognized [9,14,19,27]. The potential importance of excessive SNS activity and increased cytosolic calcium in the genesis of experimental hypertension has been reported [47,48]. The disproportionate activation of SNS in the obese state is proposed to play important roles in obesity-associated metabolic dysfunction [49]. The hyperactivity of SNS has been shown unequivocally to correlate with the hypertensive state, and the SNS is, therefore, intricately involved with the initiation, maintenance, and progression of hypertension [50]. Recently, SNS overdrive has been shown to suppress adiponectin expression. Conversely, Tanida et al [51] have found that adiponectin attenuates blood pressure and sympathetic nerve activity. Considering the important role of SNS activation on blood pressure control, it is tempting to suggest that adiponectin may regulate SNS activity by inhibition of leptin action in the brain [51].

Although enhanced activation of SNS is another component of insulin resistance, it is often related to activation of RAS. Inappropriate activation of RAS is an important hormonal factor causing cardiovascular and renal injury in obese and diabetic subjects [52]. Under pathophysiological conditions, such as obesity-associated metabolic diseases, the overproduction of AngII plays an important role in the development and progression of insulin resistance, hyperinsulinemia and arterial hypertension. The RAS causes sustained sympathetic over-activity by modulating central neurons in the subfornical organ of the forebrain [53,54]. Although this system was not detailed here, the AngII effects on sympathetic activation are widely demonstrated by several studies. Thus, it has been clearly demonstrated the AngII action on presynaptic potentiating effect on sympathetic neurotransmission in humans and that administration of a relatively low-dose of AngII markedly increases blood pressure caused by central sympathetic outflow [55]. Interestingly, these neural responses are associated with modulation of peripheral T cell immune responses [53,54] suggesting a link between glucose metabolic disorders and the central regulation of systemic immune and/or inflammatory responses through brain AngII signaling and resultant increased SNS outflow.

The surprising finding of the present report showed a similar insulin-mediated reduction of post-proximal renal sodium excretion in both, lean and obese subjects, after oral glucose load, despite of elevated and persistent insulin plasma levels in

hyperinsulinemic obese subgroup. Taking in account the same decreased urinary sodium excretion in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects, we may suggest the presence of additional mechanisms to explain the greater blood pressure changes observed in HI subgroups. Furthermore, the renal sodium reabsorption data of the current study could at least argue favorably to normal kidney insulin sensitivity in these volunteers. The sodium-retaining effect of insulin has been known for a long time [9], but there is no consensus on the exact mechanism of action. Some studies support an antinatriuretic effect of insulin, predominantly in the post-proximal renal tubules [9,56]. An increase in renal sodium reabsorption at higher plasma insulin levels may be due to a decrease in filtration fraction, and/or may involve neurohumoral stimulation by the renal sympathetic nerve, RAS and suppression of natriuretic peptide release [57]. In the present study, the oral glucose load in LS or obese subjects unchanged the glomerular filtration rate, estimated by CCr and consequently, the glomerular filtered sodium load, suggesting that the antinatriuresis observed was mediated by direct tubular mechanisms. For all of experimental groups, the contribution of the glucose filtered load to tubule Na^+ reabsorption via a Na^+ /glucose cotransport should also be considered. Also, the Na/H exchanger is a ubiquitous transport system involved in the regulation of intracellular pH, cell growth and proliferation, cell volume regulation and transepithelial absorption of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- . Conlin et al. [58] have shown that insulin, which increased intracellular calcium, also activated the Na^+ / H^+ exchanger. Our data, was positively related with an increased post-proximal fractional reabsorption of sodium without enhanced tubular potassium excretion that would support that insulin action preceded the distal segments of nephron. Although, an exaggerated enhancement of serum insulin levels in response to an oral glucose load, associated with similar renal sodium reabsorption in NI and HI subjects, could not be enough to explain the development of high blood pressure in our specific HI subgroup of obese studied. Thus, the present findings provide additional insights about mechanisms and insulin function during high blood pressure development in obese subjects, beyond of those involved in the renal sodium transport.

Changes in the renal nerve activity, RAS and natriuretic peptides release after an oral glucose load was not tested in the present study. However, we may hypothesize that inappropriate activation of RAS and/or SNS may significantly contribute to this inflammatory response, progression of insulin resistance and kidney disorders in this

specific subgroup of hyperinsulinemic obese. We also may not rule out the participation of adiponectin in this process since the plasma adiponectin level is reported to be increased and to show a positive correlation with plasma natriuretic factors in chronic heart failure patients (59,60). However, here the obesity-associated metabolic syndrome, particularly in HI obese, causes a decrease in the expression and secretion of adiponectin. The present study demonstrated that the plasma adiponectin level was positively correlated with the enhanced natriuresis in normoinsulinemic obese subjects while it is decreased in HI subgroup. The plasma natriuretic peptide level had the same influence on adiponectin as that of the waist circumference, HDL-cholesterol, and triglycerides. We suppose that positive association between plasma adiponectin and normoinsulinemic individuals in our study suggests that adiponectin can retard the arterial pressure increase and so, may predict a better prognosis or morbidity of cardiovascular disease, specifically blood pressure enhancement, even in obese subjects. The precise mechanism of these phenomena remains unknown. Prospective investigations are therefore warranted to determine whether high adiponectin levels are related to better prognosis or future morbidity of metabolic or kidney disorders even in obese subjects.

In conclusion, this study highlight the importance of dysfunctional inflammatory modulation associated with metabolic disorders (hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance), high blood pressure, and renal dysfunction in a particular subgroup of obese. Supposedly, these metabolic and blood pressure abnormalities are striking attenuate by enhanced adiponectin plasma levels in HI subjects compared to LS and NI subjects (Figures 4 and 6). The findings of current study may also state that a maladaptive inflammatory response seems to be central to obese-associated cardiovascular disorder and insulin resistance. Further studies will be required to define the precise mechanism involved in the interaction between obesity, serum insulin-glucose levels, abnormal renal sodium reabsorption and elevated blood pressure in HI obese subjects.

References

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and

- epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011; 377: 557-567.
2. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1138-1145.
 3. Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH Jr. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012; 5: 75-87.
 4. Parker DR, Weiss ST, Troisi R, et al. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr*. 1993; 58: 129-136.
 5. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005; 366: 1197-1209.
 6. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 2011; 10: 819-828.
 7. Pinhal CS, Lopes A, Torres DB, Felisbino SL, Rocha Gontijo JA, Boer PA. Time-course morphological and functional disorders of the kidney induced by long-term high-fat diet intake in female rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28(10): 2464-2476.
 8. Souza ML, Berardi EO, Gontijo JA, Leme Júnior CA, Cavicchio JR, Saad MJ. Insulin resistance and myocardial hypertrophy in the attenuated reduction in mean arterial pressure after a glucose load in hypertensive patients. *Braz J Med Biol Res*. 1995; 28(9): 967-972.
 9. Gontijo JA, Muscelli EO. Reduced renal sodium excretion in primary hypertensive patients after an oral glucose load. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29(10): 1291-1299.
 10. Tanaka RC, Gontijo JA. Urinary acidification and renal sodium handling in a case of renal Fanconi syndrome. *Nephron*. 1998; 78(3): 339-340.
 11. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28(7): 412-419.
 12. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(7): 2402-2410.
 13. Furlan FC, Marshall PS, Macedo RF, Carvalheira JB, Michelotto JB, Gontijo JA. Acute intracerebroventricular insulin microinjection after nitric oxide synthase inhibition of renal sodium handling in rats. *Life Sci*. 2003; 72: 2561-2569.

14. Gontijo JA, Garcia WE, Figueiredo JF, Silva-Netto CR, Furtado MR. Renal sodium handling after noradrenergic stimulation of the lateral hypothalamic area in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25: 937-942.
15. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signaling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25(2): 380-388.
16. Reaven GM. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am.* 2011;95: 875-892.
17. Sowers JR, Whaley-Connell A, Hayden MR. The role of overweight and obesity in the cardiorenal syndrome. *Cardiorenal Med.* 2011;1: 5-12.
18. McCullough AJ. Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. *J Dig Dis* 2011;12: 333-40.
19. Aroor AR, Mandavia CH, Sowers JR. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. *Heart Fail Clin.* 2012;8: 609-617.
20. Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med.* 2012;63: 329-343.
21. Garver WS, Newman SB, Gonzales-Pacheco DM, et al. The genetics of childhood obesity and interaction with dietary macronutrients. *Genes Nutr.* 2013;8: 271-287.
22. Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92: 707-715.
23. Ferrannini E, Buzzicoli G, Bonadonna R. N. Insulin resistance in essential hypertension. *Eng J Med.* 1985; 317:350-357.
24. Florey CV, Uppal S, Lowy C. Relation between blood pressure, weight, and plasma sugar serum insulin levels in schoolchildren age 9-12 years in Westland, Holland. *Br Med J.* 1976; 1: 1368-1371.
25. Lucas CP, Estigarribia JA, Darga LL, Reaven GM. Insulin and blood pressure in obesity. *Hypertension.* 1985; 7: 702-706.
26. Minicardi V, Camellini L, Belloidi G, Ferrannini E. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1986; 62: 1302-1304.
27. Sowers JR. Diabetes mellitus and vascular disease. *Hypertension* 2013;61:943-947.
28. Abel ED, O'Shea KM, Ramasamy R. Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32: 2068-2076.

29. Wong C, Marwick TH. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4: 436-443.
30. Witteles RM, Fowler MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 93-102.
31. Faselis C, Doumas M, Kokkinos JP, et al. Exercise capacity and progression from prehypertension to hypertension. *Hypertension.* 2012;60: 333-8.
32. DeMarco VG, Johnson MS, Ma L, et al. Overweight female rats selectively breed for low aerobic capacity exhibit increased myocardial fibrosis and diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H1667-1682.
33. Majane OH, Vengethasamy L, du Toit EF, et al. Dietary induced obesity hastens the progression from concentric cardiac hypertrophy to pump dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2009;54: 1376-83.
34. DeMarco VG, Ford DA, Henriksen EJ, et al. Obesity-related alterations in cardiac lipid profile and nondipping blood pressure pattern during transition to diastolic dysfunction in male db/db mice. *Endocrinology.* 2013;154: 159-171.
35. Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension.* 2003; 41: 625-633.
36. Abel ED, O'Shea KM, Ramasamy R. Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32: 2068-2076.
37. Wong C, Marwick TH. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007; 4: 436-443.
38. Whaley-Connell A, Sowers JR. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14: 360-365.
39. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* 2006; 55: 1537-1545.
40. Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension.* 2006;47: 1108-1116.
41. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, Fu Y, Motone M, Yamamoto K, Matsuo A, Ohashi K, Kihara S, Funahashi T, Rakugi H, Matsuzawa Y, Ogihara T. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension.* 2004;43: 1318-1323.

42. Chow WS, Cheung BM, Tso AW, Xu A, Wat NM, Fong CH, Ong LH, Tam S, Tan KC, Janus ED, Lam TH, Lam KS. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. *Hypertension*. 2007;49: 1455-1461.
43. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 2012; 33: 26-34.
44. Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32: 1771-1776.
45. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34:39-58.
46. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, et al. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*. 2012;4: 1095-119.
47. Rinaldi G, Bohr D. Plasma membrane and its abnormalities in hypertension. *Am J Med Sci* 1988; 295: 389-395.
48. Abboud FM. The sympathetic system in hypertension. State-of-the-art review. *Hypertension* 1982; 4 (suppII): II208-II225.
49. Mancia G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, Julius S, Reid J, Van Zwieten PA. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2007;25: 909-920.
50. Grassi G. Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertens Res*. 2006;29: 839-847.
51. Tanida M, Shen J, Horii Y, Matsuda M, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I, Sawai H, Fukuda Y, Matsuzawa Y, Nagai K. Effects of adiponectin on the renal sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007; 232: 390-397.
52. Bender SB, McGraw AP, Jaffe IZ, et al. Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: an early contributor to diabetes-related vascular disease? *Diabetes*. 2013; 62: 313-319.
53. Abboud FM, Harwani SC, Chapleau MW. Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2012; 59: 755-762.
54. Harrison DG, Marvar PJ, Titze JM. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front Physiol*. 2012; 3: 128.

55. Lob HE, Marvar PJ, Guzik TJ, et al. Induction of hypertension and peripheral inflammation by reduction of extracellular superoxide dismutase in the central nervous system. *Hypertension*. 2010; 55: 277-83.
56. Kirchner KA. Insulin increases loop segment chloride reabsorption in the euglycemic rat. *Am J Physiol*. 1988; 255: F1206-F1213.
57. Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal human. *JCI*. 1991; 87: 2246-2252.
58. Conlin PR, Kim SY, Williams GH, Canessa ML. Na/H exchanger kinetics in adrenal glomerulosa cells and its activation by angiotensin II. *Endocrinology*. 1990; 127: 236-244.
59. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, Cardiovascular Function, and Hypertension. *Hypertension*. 2008; 51: 8-14.
60. Aroor AR, McKarns S, DeMarco FG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.07.001>.

Legends of Tables and Figures

Table 1. Subjects general clinical characteristics for obese and lean groups

	CONTROL (LS)	n	NORMOINSULINEMIC (NI)	n	HYPERINSULINEMIC (HI)	n	p	p ¹ LS vs. NI	p ² LS vs. HI	p ³ NI vs. HI
M/F*	4/9	13	2/13	15	5/7	12	ns	-	-	-
Age (years)	33±12	13	29±7	15	29±8	11	ns	ns	ns	ns
Body mass (Kg)	63.71±8.98	13	95.67±12.78	15	103.464±12.89	11	0.0001	0.0001	0.0001	ns
Height (m)	1.66±0.10	13	1.63±0.09	15	1.69±0.09	12	ns	ns	ns	ns
BMI (kg/m ²)	22.92±2.03	13	35.25±3.80	14	37.05±3.88	12	0.0001	0.000	0.0001	ns
Fat mass (kg)	18.66±3.98	10	36.70±7.15	14	40.80±9.24	12	0.0001	0.0001	0.0001	ns
Lean mass (kg)	41.49±6.02	10	57.22±8.02	15	63.76±10.12	11	0.0001	0.0001	0.0001	ns
Body water (%)	48.77±4.98	11	41.34±5.16	14	42.04±4.72	11	0.006	0.004	0.008	ns
Basal metabolic rate (kcal)	1261.3±183.53	10	1740±244.07	15	1938.45±307.62	11	0.0001	0.000	0.0001	ns

M/F - male/female; BMI - body mass index; Values are means ± DP; P values for comparison between groups by non-parametric analysis of Kruskal Wallis; * P values for comparison between groups by non-parametric analysis descriptive of Chi-Square; P - comparing all groups. P¹; P²; P³ - comparison between groups

Table 2. The table shows the serum parameter analyses to triglyceride, cholesterol, high-density (HDL), low-density (LDL), very-low density lipoprotein, uric and free fat acids plasma levels from the lean (LS) group, compared with the obese subgroup subjects.

	CONTROL	n	NORMINSULINEMIC	n	HYPERINSULINEMIC	n	P	p ¹	p ²	p ³
	(LS)		(NI)		(HI)			LS vs. NI	LS vs. HI	NI vs. HI
Cholesterol (mg/dl)	169.33±40.08	12	186.64±27.07	14	184.55±15.97	11	ns	0.045	ns	ns
HDL - cholesterol (mg/dl)	35.08±13.31	13	26.50±4.64	14	26.73±8	11	ns	ns	ns	ns
LDL - cholesterol (mg/dl)	113.17±32.31	12	133.67±27.39	15	139.83±24.56	12	0.040	ns	0.015	ns
VLDL - cholesterol (mg/dl)	18.92±6.99	12	21.87±10.28	15	22.91±8.3	11	ns	ns	ns	ns
Triglyceride (mg/dl)	94.92±34.45	12	111.00±50.13	15	114.91±41.06	11	ns	ns	ns	ns
Uric acid (mg/dl)	4.75±1.53	13	4.49±0.89	15	5.25±1.07	11	ns	ns	ns	0.033
Free fatty acids (mg/dl)	382.05±129.80	12	545.11±454.67	14	396.58±97.1	12	ns	ns	ns	ns

HDL - high-density lipoprotein; LDL - low-density lipoprotein; VLDL - very low-density lipoprotein; Values are means ± DP; P values for comparison between groups by non-parametric analysis of *Kruskal Wallis*; P - comparing all groups / P¹; P²; P³ - comparison between groups

Table 3. The table shows the basal systolic and diastolic blood pressure (in mmHg) data measured in obese and lean subjects

	CONTROL	n	NORMOINSULINEMIC	n	HYPERINSULINEMIC	n	P	p ¹	p ²	p ³
	(LS)		(NI)		(HI)			LS vs. NI	LS vs. HI	NI vs. HI
SBP (mmHg)	114.85±16.65	13	122.73±12.35	15	130.70±4.71	10	0.006	ns	0.002	0.024
DBP (mmHg)	73.17±12.46	12	84.14±8.39	14	82.33±9.30	9	ns	0.031	ns	ns

SBP - systolic blood pressure; DBP - diastolic blood pressure; Values are means ±DP; P values for comparison between groups by non-parametric analysis of *Kruskal Wallis*; P - comparing all groups; P¹; P²; P³ - comparison between groups.

Table 4. The table presents the glucose, insulin, C peptide plasma levels and total area under curve (tAUC) to Ins and Glu after oral glucose tolerance tests performed in obese and LS subjects

	CONTROL (LS)	n	NORMOINSULINEMIC (NI)	n	HYPERINSULINEMIC (HI)	n	P	P ¹ LS vs. NI	P ² LS vs. HI	P ³ NI vs. HI
Fasting Ins (μ U/ml)	4.25 \pm 0.86	12	5.51 \pm 1.18	15	10.85 \pm 4.09	11	0.0001	0.005	0.0001	0.000
Fasting Glu (mg/ml)	77.61 \pm 9.03	13	71.83 \pm 4.48	15	76.96 \pm 7.04	11	ns	ns	ns	0.018
Fasting C Pep (ng/ml)	0.774 \pm 0.12	11	1.13 \pm 0.82	14	1.37 \pm 0.59	11	0.002	ns	0.0001	0.027
tAUC Ins total	4555.42 \pm 1244.41	12	5248.31 \pm 2020.19	15	7109.78 \pm 1693.16	12	0.003	ns	0.001	0.008
tAUC Glu total	2942.06 \pm 2007.76	12	3511.95 \pm 2169.92	15	4777 \pm 1889.62	12	ns	ns	0.018	ns

Ins – insulin serum level; Glu – glucose serum level; C Pep – C peptide; Values are means \pm DP; P values for comparison between groups by non-parametric analysis of *Kruskal Wallis*; P - comparing all groups: P¹ ; P²; P³ - comparison between groups.

Table 5. The table shows the circulating plasma concentrations of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein, measured in basal period in obese and lean subjects

	CONTROL (LS)	n	NORMOINSULINEMIC (NI)	n	HYPERINSULINEMIC (HI)	n	P	P ¹ LS vs. NI	P ² LS vs. HI	P ³ NI vs.
TNF- α (pg/ml)	1.62 \pm 0.40	12	2.13 \pm 0.60	15	2.01 \pm 0.51	12	0.012	0.005	0.028	ns
IL-6 (pg/ml)	0.90 \pm 0.38	12	1.97 \pm 1.10	15	1.95 \pm 0.96	12	0.001	0.001	0.001	ns
CRP (mg/l)	1.56 \pm 2.25	11	5.56 \pm 4.89	15	6.37 \pm 6.70	12	0.025	0.006	ns	ns
Adiponectin (μ g/ml)	7.64 \pm 2.94	12	8.91 \pm 3.39	16	6.32 \pm 2.49	12	ns	ns	ns	0.040
Leptin (μ g/ml)	11.99 \pm 10.63	12	40.70 \pm 21.54	15	33.51 \pm 21.82	12	0.006	0.002	0.018	ns

TNF- α - tumor necrosis factor-alpha; IL-6 – interleukin 6; CRP – C reactive protein; Values are means \pm DP; P values for comparison between groups by non-parametric analysis of *Kruskal Wallis*; P - comparing all groups: P¹ ; P²; P³ - comparison between groups

Figure 1. Representation of HOMA-IR in control (LS, n=12) and obese normoinsulinemic (NI, n=15) and hyperinsulinemic (HI, n=12) subgroups. Data are expressed as median and quartile deviation. ** $P \leq 0.001$ versus control and NI (non-parametric analysis by Kruskal-Wallis test).

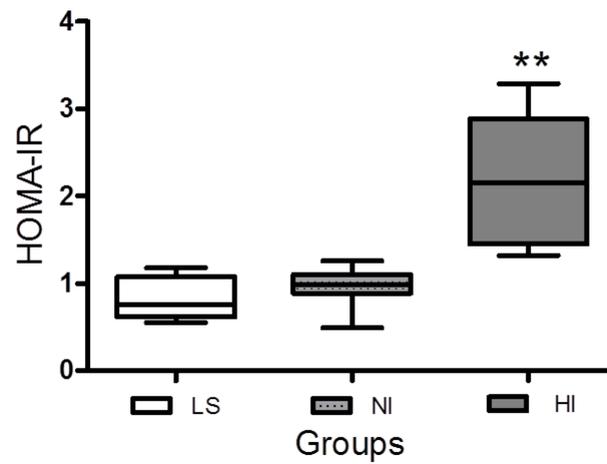


Figure 1

Figure 2. Graphic representation of arterial systolic and diastolic blood pressure in control lean (LS, n=13) subjects compared to normoinsulinemic (NI, n=15) and hyperinsulinemic (HI, n=10) volunteer subgroups. Results are expressed as mean \pm SD. * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ versus control (non-parametric analysis by Kruskal-Wallis test).

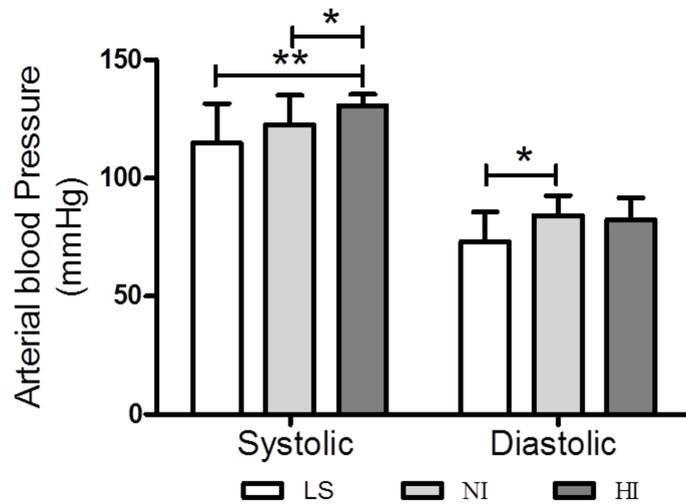


Figure 2

Figure 3. Graphic representation depicts the total area under curve to glucose (panel A) and insulin (panel B) serum levels after oral glucose test to control lean (LS, n=12) subjects compared to normoinsulinemic (NI, n=14) and hyperinsulinemic (HI, n=12) volunteer subgroups. Also shows the estimating of quantitative insulin-sensitivity check (QUICKI) index (panel C) values for lean and obese subjects. Results are expressed as mean \pm SD. * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ versus control (non-parametric analysis by Kruskal-Wallis test).

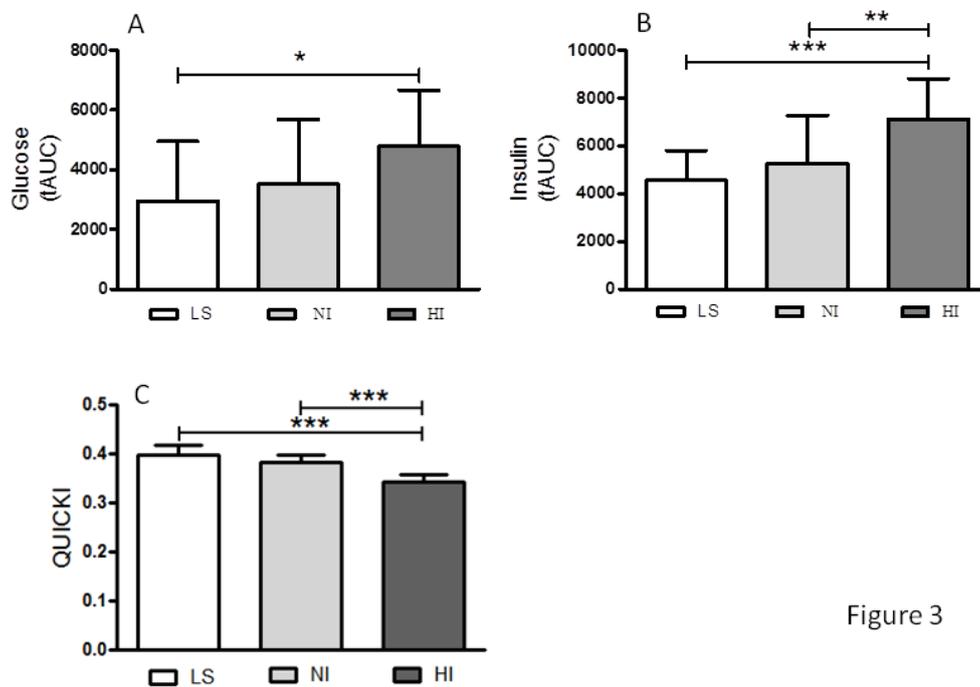


Figure 3

Figure 4. Graphic representation depicts the circulating plasma concentrations of IL-6 (panel A), TNF- α (panel B), and C-reactive protein (panel C) and Adiponectin (panel D), measured in basal period to control lean (LS, n=12) subjects compared to normoinsulinemic (NI, n=15) and hyperinsulinemic (HI, n=12) volunteer subgroups. Results are expressed as mean \pm SD. * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ versus control (non-parametric analysis by Kruskal-Wallis test).

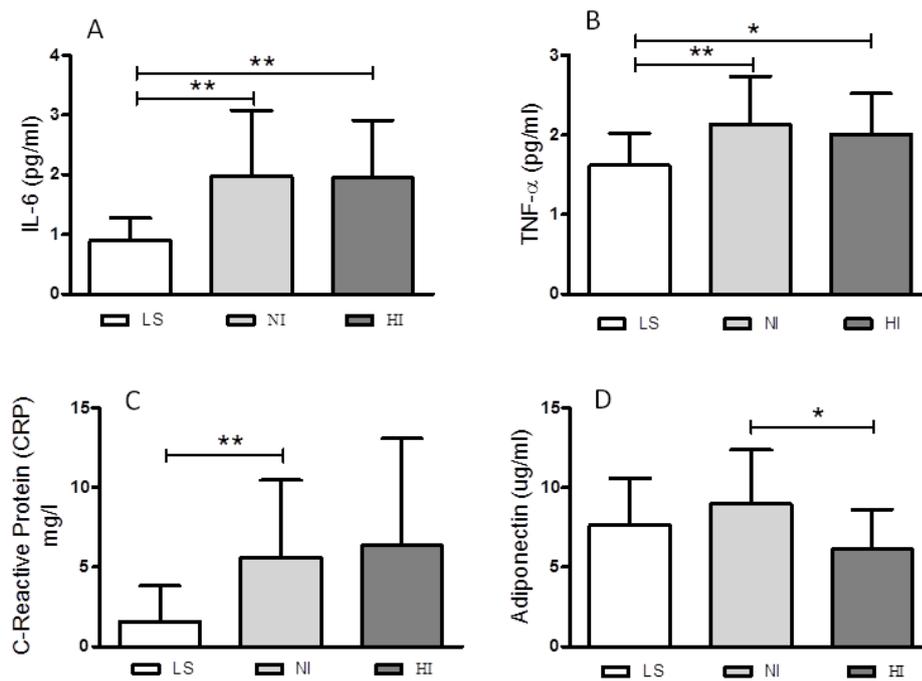


Figure 4

Figure 5. Bar graph of Urinary flow (panel B), Creatinine clearance (C_{Cr}) (panel A), fractional sodium excretion (FENa) (panel C), proximal (FEPNa) (panel E) and post-proximal (FEPPNa) (panel D) and fractional potassium excretion (FEK) (panel F) in LS and NI and HI obese subjects before and after oral glucose load (OG). See Results for statistical analysis details. The data are reported as the means \pm SD. * $P \leq 0.05$ vs. NP (non-parametric analysis by Kruskal-Wallis test). * $P \leq 0.05$ versus LS, NI and HI subgroups.

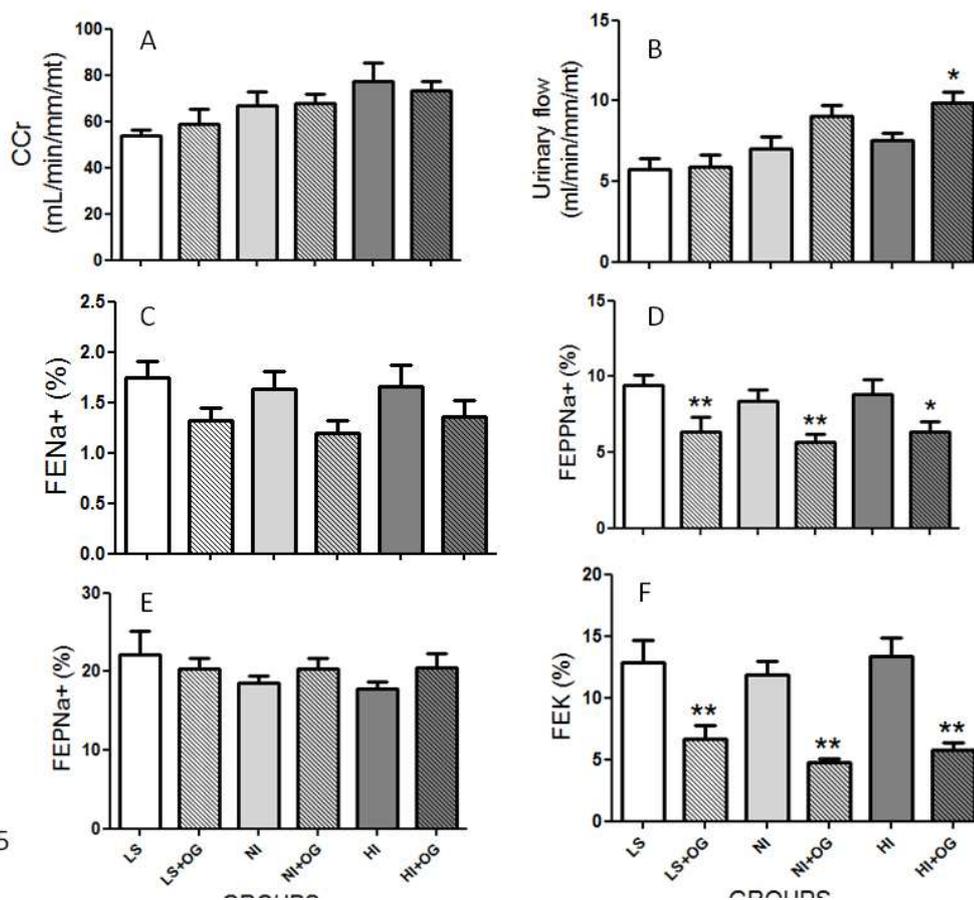


Figure 5

Figure 6. Graphic representation depicts whole lean and obese subject's data interaction between independent factors related to whole systolic blood pressure, body constitution and estimating HOMA-IR index values with multiple linear regression analysis.

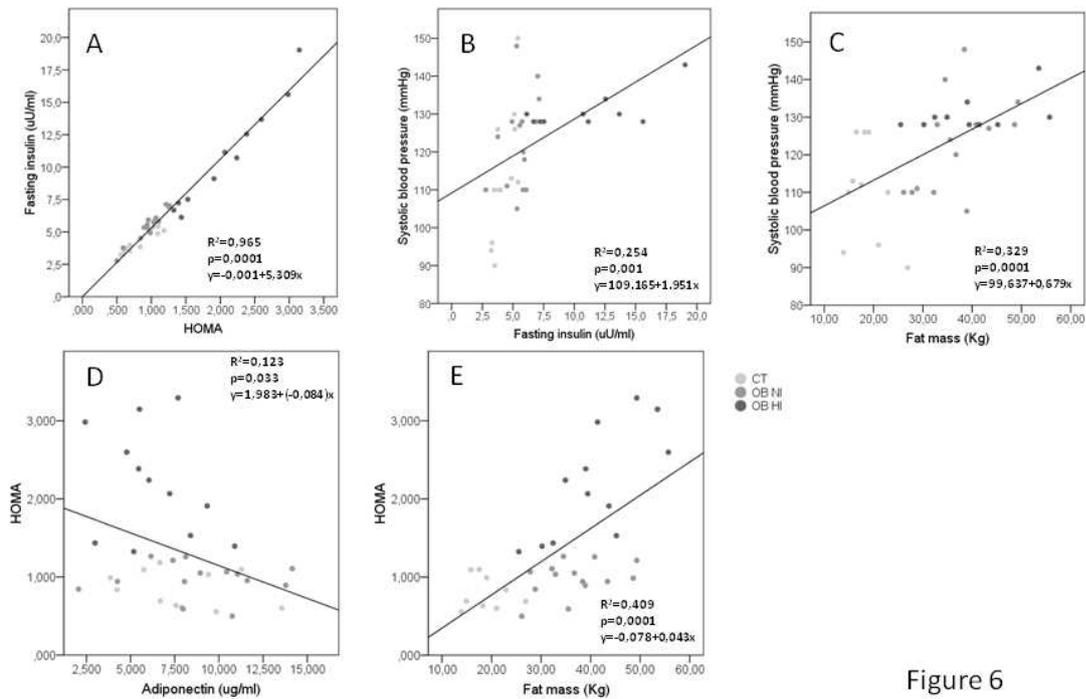


Figure 6