



DANIELA SOARES RAZOLLI

**TLR4 EM CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA É UM
MEDIADOR DA RESISTÊNCIA À INSULINA ASSOCIADA À
OBESIDADE**

**TLR4 IN BONE MARROW-DERIVED CELLS IS A MEDIATOR OF
OBESITY-RELATED INSULIN RESISTANCE**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIELA SOARES RAZOLLI

**TLR4 EM CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA É UM MEDIADOR DA
RESISTÊNCIA À INSULINA ASSOCIADA À OBESIDADE**

**TLR4 IN BONE MARROW-DERIVED CELLS IS A MEDIATOR OF OBESITY-
RELATED INSULIN RESISTANCE**

Orientador: Licio Augusto Velloso

Tutor: Licio Augusto Velloso

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*.

Doctoral Thesis presented to the Physiopathology Pos-Graduation Program of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP to obtain the title of Doctor in Science.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELA SOARES RAZOLLI
E ORIENTADA PELO PROF.DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

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

R219t Razolli, Daniela Soares, 1984-
TLR4 em células derivadas da medula óssea é um
mediador da resistência à insulina associada à
obesidade / Daniela Soares Razolli. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2014.

Orientador : Licio Augusto Velloso.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Resistência à
insulina. 4. Receptor 4 Toll-Like. I. Velloso, Licio
Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: TLR4 in bone marrow-derived cells is a mediator of obesity-related insulin resistance

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Inflammation

Insulin resistance

Toll-like receptor 4

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Licio Augusto Velloso [Orientador]

Alicia Juliana Kowaltowski

Jean Pierre Schatzmann Peron

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Gabriel Forato Anhe

Data de defesa: 15-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

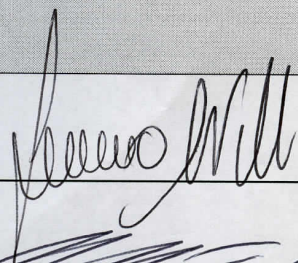
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DANIELA SOARES RAZOLLI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS:

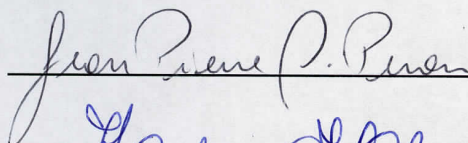
1. PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO



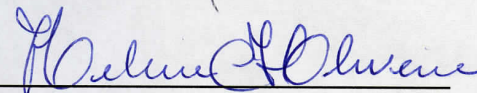
2. PROF(A). DR(A). ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI



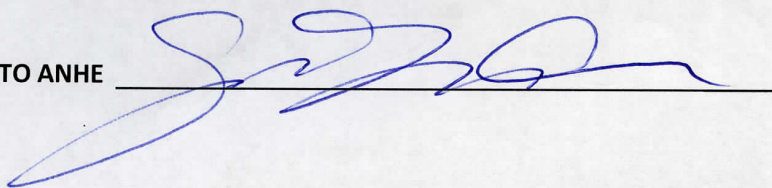
3. PROF(A). DR(A). JEAN PIERRE SCHATZMANN PERON



4. PROF(A).DR(A). HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA



5. PROF(A).DR(A). GABRIEL FORATO ANHE



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

Data: 15 de julho de 2014

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Lício, pela oportunidade e orientação em todas as etapas da realização deste trabalho. Pelo belo exemplo que nos proporciona, nos motivando e inspirando a cada dia.

Aos meus familiares, que me apoiam em todos os momentos de minha vida. Pela segurança que me oferecem ao saber que tenho sempre com quem contar.

Ao Eduardo, meu parceiro de vida, em todos os momentos.

Aos amigos próximos e distantes, aos amigos e colegas de laboratório, pela convivência que faz ser tão prazeroso o dia-a-dia.

Aos meus colaboradores, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Sinalização Celular, pelo suporte técnico.

À Universidade Estadual de Campinas, pela infraestrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento.

A todos vocês, meu muito obrigado!

RESUMO

Razolli, D.S. – TLR4 em células derivadas da medula óssea é um mediador da resistência à insulina associada à obesidade. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2014.

A ativação de TLR4 por ácidos graxos saturados presentes na dieta é um dos mais importantes mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina. Entretanto, não está claro se este efeito decorre da ativação de TLR4 em células derivadas da medula óssea, em células de tecidos insulino-sensíveis, ou em ambos. O objetivo de nosso estudo foi investigar se a ausência ou presença de TLR4 exclusivamente em células derivadas da medula óssea (BM) é suficiente para modular a ação da insulina no fígado e no tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida por dieta. Camundongos mutantes (TLR4^{-/-}) ou selvagens (WT) para TLR4 foram irradiados em fonte de cobalto 60 e submetidos ao transplante de medula óssea (BMT). TLR4^{-/-} receberam medula óssea de camundongos WT e vice-versa. Após a recuperação, os animais foram alimentados com dieta rica em gordura saturada ou dieta padrão para roedores por oito semanas. Foram avaliados ganho de peso, ingestão alimentar, gasto energético e marcadores de termogênese no tecido adiposo marrom (BAT). A sensibilidade à insulina foi analisada por ITT e pela fosforilação de AKT no fígado e tecido adiposo. O metabolismo de glicose foi avaliado por GTT e pela expressão relativa de PEPCK e G6PASE no fígado. Ainda, marcadores de inflamação foram avaliados no fígado e tecido adiposo por PCR em tempo real, e o acúmulo de gordura hepática foi analisado pela marcação por OilRed. Nossos resultados revelaram que em camundongos WT recebendo BM de doadores TLR4^{-/-} ocorreu proteção contra o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina induzida por dieta. Em camundongos TLR4^{-/-} recebendo BM de doadores WT houve perda da proteção contra a obesidade e resistência à insulina induzida por dieta. A transferência de fenótipo relativo a

massa corporal foi acompanhada de modificação na eficiência energética e na expressão de UCP1 em tecido adiposo marrom. A transferência de fenótipo relativo a resistência à insulina foi acompanhada da modificação do padrão de ativação de transdução do sinal da insulina por meio de AKT em fígado e tecido adiposo. Particularmente no fígado, a presença de TLR4 funcional em células derivadas da BM foi fator determinante no desenvolvimento da esteatose. Por fim, a presença de TLR4 funcional em células derivadas da BM foi acompanhada da expressão de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e nível reduzido de pelo menos uma citocina anti-inflamatória em fígado e tecido adiposo, sendo que a ausência de TLR4 nas células derivadas da BM resultou em fenótipo inverso. Desta forma, conclui-se que a presença ou ausência de TLR4 em células derivadas da BM tem papel determinante, sendo simultaneamente necessário e suficiente para o desenvolvimento do fenótipo de obesidade e resistência à insulina induzida por dieta.

Palavras-chave: obesidade, inflamação, resistência à insulina, TLR4.

ABSTRACT

Razolli, D.S. – TLR4 in bone marrow-derived cells is a mediator of obesity-related insulin resistance. PhD Thesis - Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, 2014.

Saturated fatty acid-induced activation of TLR4 is one of the most important mechanisms involved in the development of insulin resistance. However, it is not clear if this effect is due to activation of TLR4 present in bone marrow (BM)-derived cells, in cells present in tissues that are targets for insulin action, or in both. The aim of the present study was to investigate if a defective TLR4 signaling in bone-marrow (BM) derived cells is sufficient to modulate the whole-body insulin action. TLR4-mutant (TLR4^{-/-}) and wild-type (WT) mice were irradiated in a cobalt 60 source and submitted to bone marrow transplantation (BMT). TLR4^{-/-} received BM from WT and vice-versa. After recovery, mice were fed on a high fat diet (HFD) or standard chow for eight weeks. We evaluated body mass gain, food intake, energy expenditure and markers of thermogenesis in brown adipose tissue (BAT). Insulin sensitivity was analyzed by GTT, ITT and AKT phosphorylation in liver and adipose tissue. In addition, markers of inflammation were evaluated in both tissues by real-time PCR. WT submitted to BMT from TLR4^{-/-} donors were protected from HFD-induced obesity and insulin resistance. In TLR4^{-/-} submitted to BMT from WT donors this effect was blunted and mice gained weight and became insulin resistant. Phenotype transfer regarding body mass was accompanied by change in energy efficiency and expression of UCP1 in brown adipose tissue. Phenotype transfer regarding insulin resistance was accompanied by changes in insulin signal transduction through AKT in liver and adipose tissue. Particularly, in the liver, the presence of a functional TLR4 in BM-derived cells was a determinant factor for the development of steatosis. Finally, the presence of a functional TLR4 in BM-derived cells was accompanied by the increased expression of inflammatory cytokines and reduced expression of at least one anti-inflammatory cytokine in the liver and adipose tissue.

Thus, we conclude that the presence or absence of TLR4 in BM-derived cells is both sufficient and necessary for the induction of obesity and insulin resistance induced by diet.

Keywords: Obesity, inflammation, insulin resistance, TLR4.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGLs – Ácidos Graxos Livres

AgRP – Peptídeo Relacionado ao Gene Agouti

AKT – Proteína Quinase B

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

ATM – Macrófagos do Tecido Adiposo

BAT – Tecido Adiposo Marrom

BM – Medula Óssea

BMT – Transplante de Medula Óssea

CART - Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina

CCK – Colecistocinina

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

G6PASE – Glicose 6-Fosfatase

GIP – Polipeptídeo Inibitório Gástrico

GLP-1 – Peptídeo *Glucagon-Like 1*

GLP-2 – Peptídeo *Glucagon-Like 2*

GTT – Teste de Tolerância à Glicose

HFD – Dieta Hiperlipídica

IL10 – Interleucina 10

IL1 β – Interleucina 1 β

IL6 – Interleucina 6

ILR1s – Receptores de Interleucina 1

ITT – Teste de Tolerância à Insulina

LPS – Lipopolissacarídeo

MCH – Hormônio Concentrador de Melanina

MCP1 – Proteína Quimiotática Monocítica 1

MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide 88

NAFLD – Doença Não-Alcólica do Fígado Gorduroso

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEPCK – Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase

POMC – Pró-Ópio Melanocortina

PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrão

PYY – Peptídeo YY

RNA_m – Ácido Ribonucléico Mensageiro

SNC – Sistema Nervosa Central

TIR – Domínio de Homologia Toll/IL-1R

TIRAP – Proteína Adaptadora Contendo o Domínio TIR

TLR3 – Receptor *Toll-Like 3*

TLR4 – Receptor *Toll-Like 4*

TLRs – Receptores *Toll-like*

TNF α – Fator de Necrose Tumoral- α

IMC - Índice de Massa Corpórea

TRAM – Molécula Adaptadora Relacionada à TRIF

TRH – Hormônio Liberador de Tirotrófina

TRIF – Proteína Adaptadora Contendo o Domínio TIR

UCP1 – Proteína Desacopladora 1

WT – Tipo Selvagem

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Objetivos	28
3. Artigo.....	29
4. Resumo dos resultados.....	53
5. Conclusão.....	54
6. Referências.....	55
7. Apêndice.....	60
7.1 Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp).....	60
7.2 Materiais e Métodos.....	61
7.3 Resultados adicionais.....	69

1. INTRODUÇÃO

Em vertebrados, a resposta imune pode ser didaticamente categorizada em resposta imune inata e resposta imune adaptativa (ou adquirida). A resposta imune adaptativa é mediada por populações de linfócitos T e B expandidos clonalmente. Estes linfócitos expressam uma grande variedade de receptores para antígenos, gerados através de rearranjo de DNA, sendo capazes de reconhecer uma ampla gama de antígenos. A resposta imune adaptativa é caracterizada por especificidade e memória, sendo capaz de distinguir entre patógenos e antígenos próprios ou não-próprios. É ainda influenciada pela geração de subpopulações de linfócitos T *helper* (T_H), com consequente produção de citocinas efetoras (Akira 2001 e 2004).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Inicialmente, acreditava-se que a resposta imune inata era caracterizada apenas pela fagocitose, digestão de microorganismos e substâncias não-próprias e apresentação de antígenos para células envolvidas com a resposta adaptativa (Akira 2001, 2003 e 2006). Esses eventos são mediados por macrófagos, leucócitos e células dendríticas, que coordenam ainda a produção de mediadores inflamatórios e citocinas. Por fim, a resposta imune inata é um pré-requisito para o desencadeamento da resposta imune adaptativa (Medzhitov e Janeway, 1998).

O desafio enfrentado pela resposta imune inata é discriminar entre o próprio e o grande número de potenciais patógenos, partindo de um número restrito de receptores. Esse problema se agrava com a tendência de mutação dos patógenos, porém, é vencido a partir da evolução de uma série de receptores que reconhecem regiões conservadas essenciais dos patógenos, mas que não são presentes nos eucariotos filogeneticamente mais derivados (Aderem e Erel, 2000). Esses receptores são denominados Receptores de Reconhecimento de Patógenos (PRRs) e reconhecem Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs).

Diferentes tipos de PRRs reconhecem PAMPs específicos, apresentando padrões distintos de expressão, capazes de mediar a fagocitose ou ativar vias de sinalização específicas

que culminam em diferentes respostas antipatogênicas (Akira 2006). O reconhecimento de PAMPs pode ativar diretamente mecanismos efetores da resposta imune inata, como a fagocitose, indução da síntese de óxido nítrico em macrófagos, de peptídeos antimicrobianos ou a expressão de sinais inflamatórios endógenos capazes de ativar a expressão de citocinas e quimiocinas efectoras. Esses sinais controlam o recrutamento de leucócitos para os sítios de infecção e regulam a ativação de mecanismos efetores apropriados. Ainda, induzem a expressão de moléculas co-estimulatórias nas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) (Medzhitov e Janeway, 1998)

Dentre os PRRs da resposta imune inata pode-se destacar o receptor *toll-like 4* (TLR4) o qual reconhece PAMPs da endotoxina bacteriana LPS (lipopolissacarídeo), presente na parede celular de bactérias Gram-negativas (Aderem e Ulevitch, 2000). O reconhecimento inicial dessa endotoxina é mediado pelos receptores *Toll-like* expressos nas APCs. Receptores *Toll* são proteínas transmembrana do tipo I, conservadas evolutivamente entre insetos e mamíferos. Foram inicialmente identificados como uma molécula essencial para o estabelecimento da polaridade dorsoventral durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophilla* e, posteriormente, por ter um papel importante na resposta imune antifúngica desses insetos. Posteriormente, uma família de receptores homólogos ao *Toll* de *Drosophilla* foi identificada em mamíferos e, atualmente, contam com 11 membros em humanos e 13 em camundongos. São os chamados receptores *Toll-like* (TLRs) (Lemaitre 1996, Medzhitov 1997, Akira 2004 e 2006, Konner e Bruning 2011, Jialal 2014).

Com base na considerável homologia da porção citoplasmática, esses receptores são membros da superfamília de receptores de interleucina 1 (IL1Rs). Tanto os TLRs quanto os IL1Rs contam com uma região citoplasmática conservada de aproximadamente 200 aminoácidos, conhecida como domínio TIR (Toll/IL-1R). Dentro desse domínio, existem 3 regiões de similaridade, que variam entre 20 e 30% da sequência de aminoácidos, essenciais para a transdução do sinal. No entanto, a porção extracelular desses receptores é diferente,

sendo que os IL1Rs apresentam 3 domínios semelhantes às imunoglobulinas e os TLRs possuem entre 19 a 25 repetições *in tandem* ricas em leucina (Akira 2001 e 2004). O primeiro homólogo humano do gene *Toll* de *Drosophilla* a ser identificado foi o TLR4, inicialmente chamado *Toll* humano. A descoberta do TLR4 sugeriu uma conexão provável entre detecção de patógenos e ativação da resposta imune adaptativa, por estimular a expressão de moléculas co-estimulatórias necessárias para a ativação de linfócitos T *naïve* durante a apresentação de antígenos via APCs (Medzhitov 1997).

A descoberta do envolvimento do gene *Toll* no desenvolvimento embrionário de *Drosophilla* rendeu à Christiane Nüsslein-Volhard o prêmio Nobel de medicina em 1995. Em 1996 Hoffmann e colaboradores descobriram que *Drosophilla* com mutação no gene *Toll* morriam por serem incapazes de montar uma defesa imunológica contra microorganismos patogênicos, como bactérias e fungos, sugerindo que a ativação de *Toll* era necessária para uma defesa apropriada contra esses microorganismos. Em 1998 Beutler e colaboradores, investigando possíveis ligantes para LPS, descreveram duas linhagens de camundongos resistentes a essa endotoxina. Esses camundongos apresentavam uma mutação no gene TLR4 semelhante à observada em moscas. Essa mutação impedia a transdução do sinal de LPS, tornando-os mais susceptíveis às infecções por bactérias gram-negativas e desenvolvimento sepse. Por suas descobertas, Hoffmann e Beutler dividiram em 2011 o prêmio Nobel de medicina (Nüsslein-Volhard 1985, Hoffmann 1996, Beutler 1998).

Por meio da identificação dessas duas linhagens de camundongos com mutação no gene TLR4, foi demonstrado que este receptor reconhece a endotoxina bacteriana LPS. Camundongos da linhagem C3H/HeJ possuem uma mutação com perda de sentido, resultante da substituição do aminoácido prolina por histidina no resíduo 712 do terceiro exon do gene TLR4. Essa mutação resulta em baixa ou não responsividade ao LPS. Outra linhagem, a C57BL/10ScCr, é resistente ao LPS devido a uma mutação nula recessiva (Poltorak 1998). Os animais C3H/HeJ apresentam o alelo co-dominante *Lpsd* e, quando a mutação é introduzida em

animais tipo selvagem, o receptor é convertido em um mutante dominante negativo, inibindo a resposta ao LPS (Aderem e Ulevitch 2000).

A cascata de sinalização decorrente da ativação de TLR4 em resposta aos seus ligantes envolve uma série de proteínas adaptadoras contendo o domínio TIR. Entre eles, estão o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), o adaptador induzido por interferons contendo domínio TIR (TRIF) e moléculas adaptadoras relacionadas ao TRIF (TRAM). A via dependente de MyD88 ocorre em resposta à ativação da maioria dos TLRs. No entanto, TLR3 e TLR4 podem atuar tanto pela via dependente de MyD88 quanto pela via dependente de TRIF (independente de MyD88). A ativação dessas vias envolve uma cascata de sinalização que culmina na indução da expressão de interferons do tipo I e ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), com consequente produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (Konner e Bruning 2011; Kurt 2013).

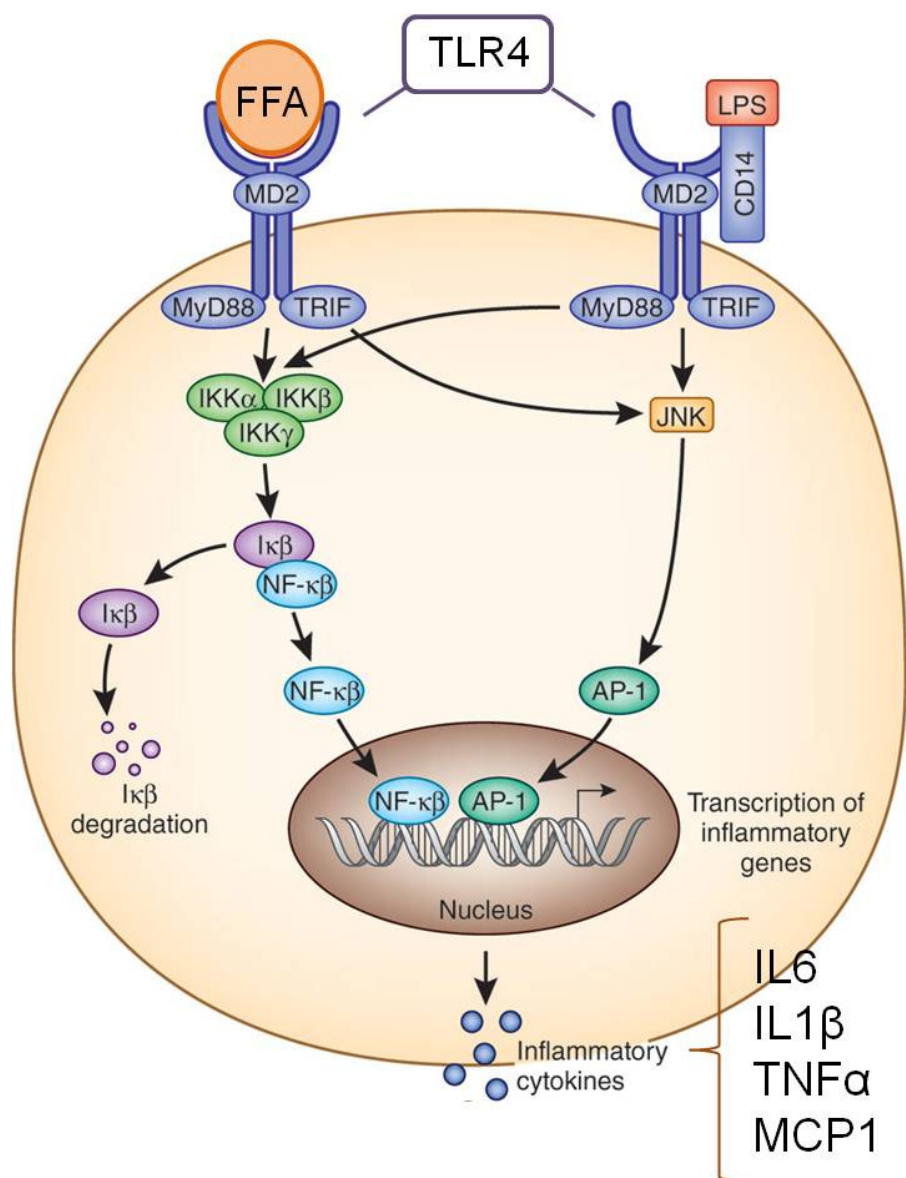


Figura 1. Via de sinalização de TLR4. Adaptado de Olefsky 2012.

Estudos mostraram que o ácido láurico (ácido graxo de cadeia média, presente no LPS) é suficiente para desencadear a ativação da sinalização pela via do TLR4 em macrófagos. Ainda, foi visto que ácidos graxos saturados, mas não os insaturados, ativam essa via de sinalização em adipócitos e macrófagos. De modo complementar, na ausência de TLR4, a sinalização inflamatória decorrente dos ácidos graxos saturados é suprimida (Konner e Bruning 2011). Frente ao intrigante fato de que o TLR4 pode ser ativado pelo ácido graxo presente no

LPS, e que uma série de estudos caracterizam o papel fisiopatológico dos ácidos graxos livres (AGLs) na inflamação e resistência à insulina, nos últimos anos o papel deste receptor vem sendo estudado em doenças associadas ao acúmulo de AGLs, como a obesidade e comorbidades associadas (Shi 2006, Konner e Bruning 2011). Indivíduos com obesidade ou sobrepeso, portadores ou não de diabetes tipo 2 apresentam um aumento de TLR4 no sangue periférico e tecido adiposo, de maneira correlacionada ao aumento da expressão de TNF α (Rasheed 2012). Tal dado sugere que a ausência do receptor TLR4, além de proteger do ganho de peso, também pode prevenir contra a inflamação decorrente da obesidade induzida por dieta.

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo branco, em proporções suficientes para causar prejuízos à saúde do indivíduo. Os mecanismos pelos quais indivíduos tornam-se obesos ainda não foram completamente esclarecidos, mas sabe-se que a obesidade decorre da associação entre fatores genéticos e ambientais. Esses últimos estão relacionados ao aumento da ingestão de uma dieta rica em calorias, principalmente gorduras e carboidratos, e à diminuição da prática de atividades físicas regulares (Olefsky 2010, Velloso 2011, Thaler 2012).

Na prática clínica cotidiana, a obesidade é diagnosticada através do cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC), onde o peso do indivíduo é dividido pelo quadrado de sua altura (kg/m^2). Indivíduos com IMC entre 18 e 25 são considerados saudáveis, entre 25 e 30 apresentam sobrepeso e, acima de 30 são obesos. Por acometer uma grande e crescente parcela da população mundial e também por levar a gastos elevados com saúde pública, a obesidade é um dos maiores fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade (Stein 2004, Velloso 2011).

O último levantamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelou que existem cerca de 500 milhões de indivíduos com IMC maior que 30 no mundo. Ainda, se nenhuma medida for adotada para tratar e prevenir o avanço desta doença, projeções para 2025 apontam

que 25% da população brasileira e 50% da população norte-americana será obesa. O estabelecimento da obesidade vem acompanhado do desenvolvimento de um quadro de inflamação subclínica, além de predispor o indivíduo ao desenvolvimento de resistência à insulina, doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemias e alguns tipos de câncer, impactando na qualidade de vida e nas taxas de mortalidade da população (Kopelman 2000, Flier 2004, Hotamisligil 2006, Baskin 2008).

O hipotálamo é a região do Sistema Nervoso Central (SNC) que integra e coordena os sinais periféricos acerca do estado nutricional e metabólico. Após a ingestão alimentar, os nutrientes da dieta são processados e absorvidos, gerando sinais de saciedade e adiposidade. Nesse processo, ocorre distensão mecânica do trato gastrointestinal e liberação de hormônios entéricos no plasma, os quais incluem GLP-1, GLP-2, CCK, PYY, GIP, insulina e leptina. Tanto a insulina (produzida pelas células β -pancreáticas) quanto a leptina (produzida pelos adipócitos) são secretadas em quantidades proporcionais aos sinais de adiposidade. Atravessam a barreira hematoencefálica utilizando um sistema saturável de transporte mediado por receptores e se ligam a receptores específicos em núcleos hipotalâmicos especializados no controle da homeostase energética (Figura 2) (Zhang 1994, Friedman 1998, McMinn 2000, Morton 2006, Varela 2012).

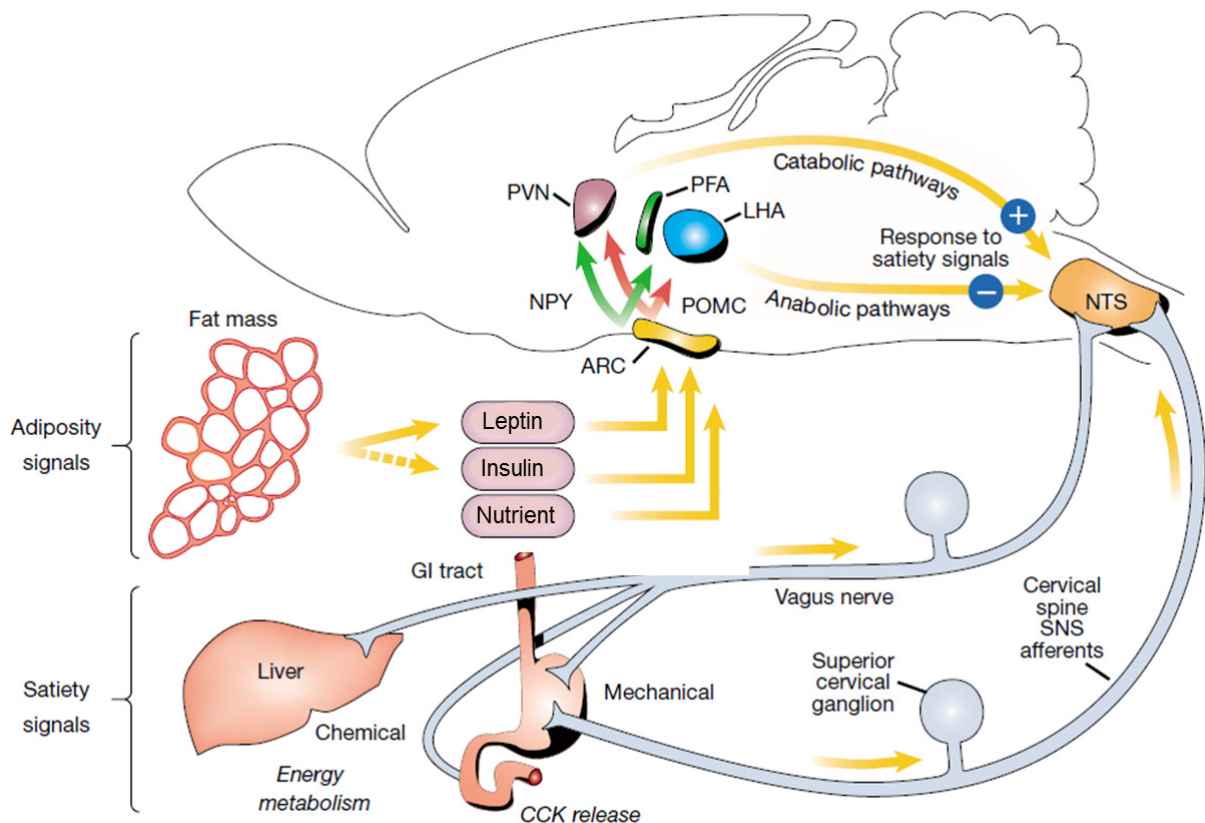


Figura 2. Sinais de adiposidade e saciedade interagem com o sistema nervoso central controlando a ingestão alimentar. Adaptado de Schwartz 2000.

No hipotálamo as três principais regiões controladoras da ingestão alimentar e do gasto energético são: núcleo arqueado, hipotálamo lateral e núcleo paraventricular. Pelo menos dois grupos distintos de neurônios de primeira ordem estão presentes no núcleo arqueado, ambos possuindo receptores para leptina e insulina: neurônios produtores dos neurotransmissores orexigênicos NPY e AgRP (NPY/AgRPérgicos), e neurônios produtores dos neurotransmissores anorexigênicos POMC e CART (POMC/CARTérgicos) (Tritos 1998, Tritos 2001, Schwartz 2000, Krashes 2011, Dietrich 2013).

Esses neurônios sinalizam para outras duas subpopulações de neurônios orexigênicos e anorexigênicos de segunda ordem, localizados no hipotálamo lateral e no núcleo

paraventricular, respectivamente. No hipotálamo lateral, conhecido como centro da fome, ocorre a produção dos neuropeptídeos orexigênicos e anti-termogênicos orexina e MCH. Já no núcleo paraventricular, conhecido como centro da saciedade, ocorre a produção dos neuropeptídeos anorexigênicos e pro-termogênicos CRH e TRH (Tritos 1998, Tritos 2001, Schwartz 2000).

Durante um período de jejum prolongado ou em indivíduos com baixo percentual de gordura corporal, as concentrações séricas de leptina e insulina estão predominantemente baixas e a maior parte dos receptores de insulina e leptina no núcleo arqueado está desocupada. Nesta situação, predominam os sinais e conexões excitatórios para os neurônios NPY/AgRPérgicos e os sinais e conexões inibitórios para os neurônios POMC/CARTérgicos. Como resultado, há aumento da expressão de orexina e MCH no hipotálamo lateral, acompanhado da redução da expressão de TRH e CRH no núcleo paraventricular, com consequente aumento da sensação de fome e diminuição da termogênese (Schwartz 2000, Spiegelman 2001, van den Pol 2012, Krashes 2013, Dietrich 2013).

De modo contrário, após uma refeição ou quando ocorre um ganho de massa de tecido adiposo (mesmo que discreto), os níveis de insulina e leptina se elevam. Nesta situação, os sinais e conexões inibitórias para os neurônios NPY/AgRPérgicos e sinais e conexões excitatórios para neurônios POMC/CARTérgicos predominam, resultando em uma redução da expressão de orexina e MCH no hipotálamo lateral e aumento da expressão de TRH e CRH no núcleo paraventricular, seguida de diminuição da sensação de fome e aumento da termogênese (Schwartz 2000, Spiegelman 2001, van den Pol 2012, Dietrich 2013).

O acúmulo excessivo de tecido adiposo promove a resistência hipotalâmica aos hormônios leptina e insulina e perda da homeostase energética. Dessa forma, o equilíbrio na sinalização dos neurônios hipotalâmicos orexigênicos e anorexigênicos é perdido, bem como o fino controle da ingestão alimentar, com consequente estabelecimento da obesidade. No estado obeso o tecido adiposo está sobre constante estresse metabólico, o que promove a ativação de uma resposta inflamatória, com recrutamento e acúmulo de macrófagos. Os

adipócitos liberam citocinas, adipocinas e ácidos graxos que podem atuar por meio de uma sinalização autócrina e parácrina, amplificando o sinal inflamatório e levando a um estado de resistência à insulina inicialmente local e, posteriormente, atingindo tecidos como músculo e fígado. Os macrófagos do tecido adiposo (ATM) são a maior fonte de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais recrutam macrófagos circulantes para o tecido. O tecido adiposo atua como um órgão endócrino e a propagação do sinal inflamatório resulta em um quadro de resistência à insulina sistêmica (Kopelman 2000, de Luca 2006, Olefsky 2010, Velloso 2011).

No fígado, a resistência à insulina durante a obesidade é associada com o aumento da expressão de mediadores inflamatórios e com o acúmulo intracelular de lipídeos. Esse acúmulo hepático de gordura, ou esteatose hepática, pode progredir para a Doença Não-Alcólica do Fígado Gorduroso (NAFLD) ou ainda, em estados avançados, para fibrose ou cirrose hepática. As células de Kupffer são os macrófagos originários da medula óssea residentes nos capilares sinusóides do fígado que, durante o estado obeso, contribuem com a produção de mediadores inflamatórios e resistência à insulina hepática (Kopelman 2000, de Luca 2006, Olefsky 2010).

O acúmulo de gordura no tecido adiposo leva a um aumento na taxa de lipólise, com maior liberação de ácidos graxos livres. O tecido adiposo atua como um órgão endócrino, sinalizando para outros tecidos, como o fígado e o músculo. No fígado, esse acúmulo de ácidos graxos prejudica a captação de insulina e aumenta a gliconeogênese. Já no músculo, ocorre um prejuízo na captação de glicose, prevalecendo um estado de hiperglicemia. Inicialmente o pâncreas compensa esse processo por meio do aumento na produção de insulina. No entanto, eventualmente as células β -pancreáticas podem entrar em falência resultando em hiperglicemia, resistência à insulina e desenvolvimento do diabetes melitus tipo 2 (Kopelman 2000, de Luca 2006, Olefsky 2010).

Sabe-se que ácidos graxos de cadeia longa, provenientes principalmente da dieta, prejudicam o controle da ingestão alimentar e o metabolismo de glicose. Ainda, o consumo de dieta rica em gordura saturada ativa respostas proinflamatórias em diferentes tecidos,

aumentando a expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e ativando vias de sinalização celulares envolvidas com resposta a sinais inflamatórios e atividade de proteínas serina-quinases, perpetuando a resistência à insulina e inflamação sistêmica (De Souza 2005, Konner 2011, Velloso 2011).

A resistência à ação dos hormônios leptina e insulina (inicialmente hipotalâmica e, posteriormente, sistêmica) é influenciada por fatores genéticos, idade, sedentarismo, hábitos alimentares, estresse e infecções. Inegavelmente, o consumo de dietas ricas em lipídeos é o que apresenta maior relevância epidemiológica (Moussavi 2008, Goris 2008). A superalimentação vem sendo facilitada ao longo dos anos por um aumento considerável na produção, industrialização e distribuição de alimentos hipercalóricos, principalmente daqueles ricos em ácidos graxos saturados e carboidratos. Sabe-se hoje que existem receptores por meio dos quais os ácidos graxos se ligam e desencadeiam a ativação de vias de sinalização inflamatórias (Olefsky 2010, Velloso 2011, Thaler 2013).

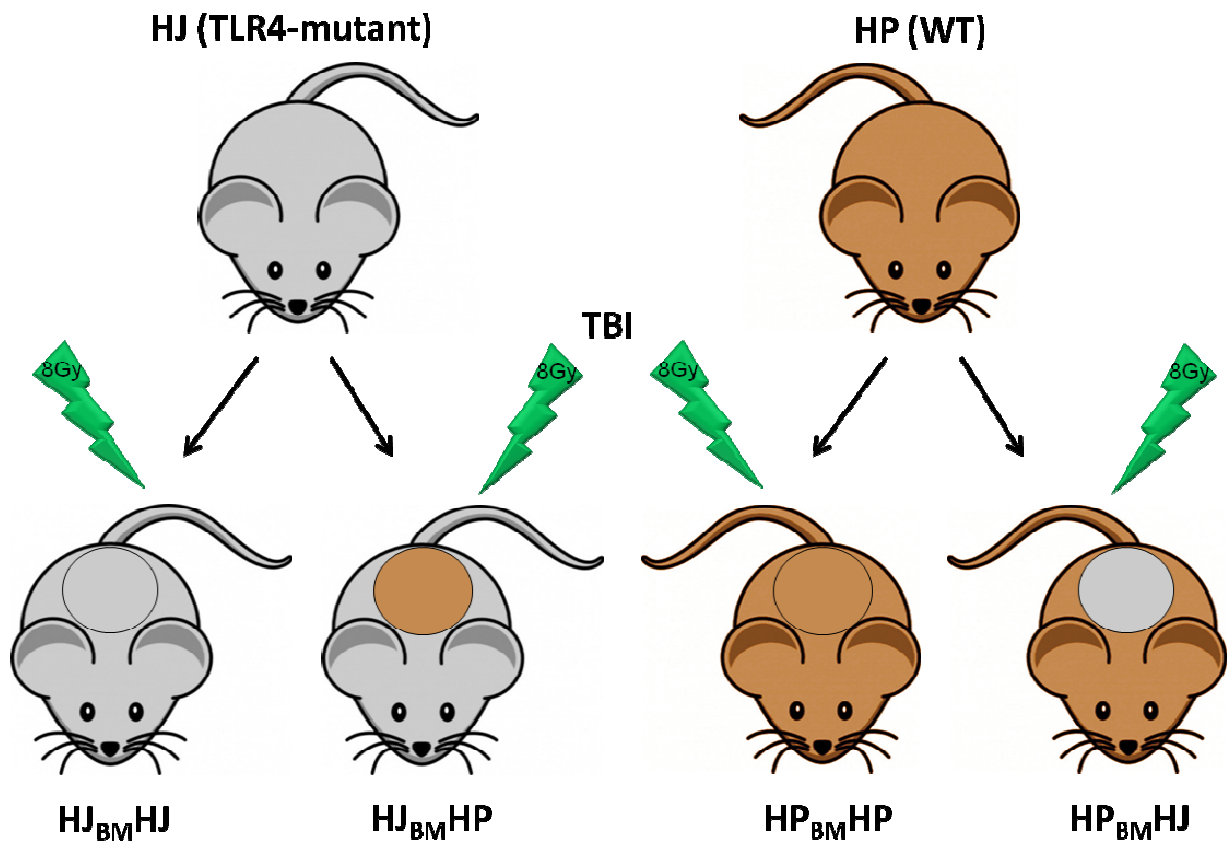
Nosso grupo observou que a administração central de ácidos graxos saturados ativa vias inflamatórias e induz o estresse de retículo endoplasmático de maneira dependente de TLR4 central, enquanto a inibição farmacológica desse receptor protege contra a obesidade induzida por dieta. A ativação da via de sinalização de TLR4 controla significativamente a resistência central à insulina e leptina em animais com obesidade induzida por dieta (Milanski 2009). A persistência da resposta inflamatória ativa vias de sinalização apoptóticas, levando à perda de neurônios anorexigênicos do tipo POMC, envolvidos com o controle da ingestão alimentar (Moraes 2009). Dessa maneira, o consumo prolongado de uma dieta rica em ácidos graxos saturados perpetua o estado inflamatório, atingindo proporções sistêmicas.

Estudos utilizando animais *knockout* ou mutantes para o TLR4 mostraram que a ausência deste receptor protege contra a obesidade induzida por dieta rica em ácidos graxos saturados e altera a resposta inflamatória em tecido adiposo (Davis 2008). Animais sem TLR4 tratados com o ácido graxo saturado palmitato são protegidos de resistência à insulina e

apresentam menor expressão de genes inflamatórios no fígado e tecido adiposo (Shi 2006). Camundongos C3H/HeJ (mutantes com perda de função para TLR4) submetidos à dieta rica em gordura apresentam menor adiposidade, maior consumo de oxigênio, melhora na sensibilidade e na sinalização da insulina em tecido adiposo, músculo e fígado (Tsukumo 2007). Camundongos tipo selvagem, transplantados com a medula óssea de um doador mutante para TLR4, quando alimentados com dieta rica em gordura desenvolvem obesidade, mas não se tornam hiperinsulinêmicos e apresentam melhora na sensibilidade à insulina no fígado e tecido adiposo, além de um número reduzido de alguns marcadores inflamatórios (Saberri 2009).

Embora estudos anteriores tenham caracterizado aspectos inflamatórios relacionados a participação do TLR4 na indução da resistência à insulina, não está claro, se o TLR4 envolvido no desenvolvimento deste fenótipo é aquele expresso somente em células derivada da medula óssea, somente aquele expresso em células não derivadas da medula óssea, particularmente em tecidos insulino-sensíveis, ou ainda, ambas. Para tentar esclarecer essa questão, avaliamos parâmetros clínicos, metabólicos e moleculares em fígado e tecido adiposo branco e marrom de camundongos com obesidade induzida por dieta das linhagens C3H/HeJ (mutantes, com perda de função para o receptor TLR4) e seus respectivo controle C3H/HePas (com TLR4 funcional). Os animais foram submetidos à radioimunoablação de medula e reconstituídos com a medula óssea de um animal doador, mutante ou tipo selvagem (Esquema 1).

Bone Marrow Transplantation



Esquema 1. Transplante de medula óssea. Os animais que receberam a medula óssea foram radioimunoablados com fonte de cobalto 60 na dose de 8gy. As células da medula óssea foram coletadas a partir do fêmur de animais doadores e injetadas nos receptores pela veia caudal. Após o transplante, os animais receptores passaram a expressar o fenótipo dos animais doadores, conforme os grupos ilustrados acima.

Após radioimunoablação e transplante de medula óssea entre os grupos, os camundongos receberam dieta rica em gordura saturada ou dieta padrão para roedores por um período de 8 semanas. Terminado o período da dieta foram avaliados parâmetros clínicos, metabólicos e moleculares, por meio das seguintes análises: Avaliação do ganho de peso e ingestão alimentar média; teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina; medidas

de consumo de O₂ e produção de CO₂; análise de marcadores de termogênese no tecido adiposo marrom; análise da fosforilação da AKT, proteína da via da insulina; análise de esteatose hepática e enzimas gliconeogênicas no fígado e análise de citocinas e quimiocinas no fígado e tecido adiposo branco.

Nós observamos que a expressão de TLR4 apenas em células derivadas da medula óssea é um fator determinante na promoção da resistência à insulina induzida por dieta, fenômeno acompanhado pelo aumento da expressão de enzimas gliconeogênicas e esteatose hepática no fígado, bem como pelo aumento da expressão de marcadores inflamatórios tanto em fígado quanto em tecido adiposo branco de camundongos com obesidade induzida por dieta. Assim, a expressão de TLR4 em células derivadas da medula óssea apenas, e não em células de origem não-hematopoética, é um mediador da resistência à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta.

1. OBJETIVOS

Geral

Avaliar o impacto da presença ou ausência do TLR4 em células derivadas da medula óssea na indução da inflamação e resistência à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta.

Específicos

Avaliar, por meio de radioimunoablação e transplante de medula óssea, parâmetros clínicos, metabólicos e moleculares de camundongos mutantes ou selvagens para TLR4 submetidos a troca de medula óssea entre si. Para tal, foram realizadas as seguintes análises:

- Medidas de ganho de peso e ingestão alimentar média, teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT), medidas de consumo de O₂ e produção de CO₂ e atividade locomotora espontânea;
- *Immunoblotting* para avaliar a fosforilação de AKT em fígado e tecido adiposo branco;
- PCR em tempo real para avaliar a expressão relativa do RNA mensageiro de citocinas e quimiocinas inflamatórias no fígado e tecido adiposo branco, enzimas gliconeogênicas no fígado e genes envolvidos com termogênese no tecido adiposo marrom;
- Marcação por OilRed no fígado para verificar esteatose hepática.

3. ARTIGO

Original Article

TLR4 expression in bone marrow-derived cells is both necessary and sufficient to produce the insulin resistance phenotype in diet-induced obesity

Daniela S. Razolli ¹	danirazolli@yahoo.com.br
Juliana C. Moraes ¹	julianacontin@hotmail.com
Joseane Morari ¹	morarij@gmail.com
Rodrigo F. Moura ¹	mourafit@yahoo.com.br
Marco A. Vinolo ²	mvinolo@unicamp.br
Licio A. Velloso ¹	lavelloso.unicamp@gmail.com

¹Laboratory of Cell Signaling and ²Department of Genetics, University of Campinas, Brazil

Address correspondence to: LAV, Laboratory of Cell Signaling, Faculty of Medical Sciences – University of Campinas, 13084-970 Campinas-SP, Brazil

Manuscript word count: 3,932

Abstract word count: 241

Abstract

Aims/hypothesis. The anomalous activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by dietary fats is one of the most important mechanisms linking obesity to insulin resistance. TLR4 is expressed in most tissues of the body, but its activity in cells of the immune system is expected to underlie its most important roles of inducing inflammation and insulin resistance. Here, we explore the hypothesis that TLR4 expression in bone marrow-derived cells mediates most of the actions of this receptor as an inducer of insulin resistance.

Methods. Wild-type and TLR4-mutant mice were employed in bone marrow transplant experiments producing chimeras that harbored the functional receptor in all cells of the body except bone marrow-derived cells or only in bone marrow-derived cells. Transplanted mice were fed chow or a high-fat diet, and glucose homeostasis was evaluated by glucose and insulin tolerance tests. Insulin signal transduction and the expression of markers of inflammation were evaluated in the liver and white adipose tissue. In addition, we performed liver histology and evaluated the expression of gluconeogenic enzymes.

Results. The expression of TLR4 in bone marrow-derived cells only, but not in non-bone-marrow-derived tissues only, was a determining factor in the induction of diet-induced insulin resistance, which was accompanied by increased expression of inflammatory markers in both white adipose tissue and liver as well as increased liver steatosis and increased expression of gluconeogenic enzymes.

Conclusion/interpretation. TLR4 expressed in bone marrow-derived cells is an important mediator of obesity-associated insulin resistance in mice.

Introduction

Insulin resistance is an important determinant of most of the medical conditions associated with obesity, such as type 2 diabetes mellitus (T2D), atherosclerosis, fatty liver disease (FLD) and hypertension [1, 2]. The increased consumption of dietary fats is regarded as the main environmental factor leading to the development of insulin resistance [2, 3]. Studies performed over the last 20 years have shown that saturated fats can trigger a low-grade inflammation in many tissues of the body, which ultimately leads to the activation of intracellular serine/threonine kinases that target the insulin receptor and its main substrates, rendering them unresponsive to insulin [4, 5].

Diet-induced activation of toll-like receptor-4 (TLR4) signaling is regarded as one of the most important mechanisms linking the consumption of dietary fats to insulin resistance [6-8]. Upon activation, TLR4 acts through IKK and JNK, leading to at least two important outcomes: first, it directly targets the insulin receptor and its main substrates IRS1 and IRS2, inducing their phosphorylation in serine residues and thus impairing insulin signal transduction [6, 7]; second, it leads to inflammatory gene transcription resulting in the expression of cytokines such as, TNF α , IL1 α and IL6, which boosts inflammation and further impairs insulin action [6, 7, 9]. Recently, an additional mechanism linking TLR4 activation and insulin resistance was described. Upon prolonged activation, TLR4 signaling induces endoplasmic reticulum stress due to chaperone insufficiency [10]. Thus, TLR4 activation in obesity can act simultaneously through different mechanisms that can either induce or potentiate insulin resistance.

Despite the fact that TLR4 is a classical receptor of the innate immune system, its expression is not restricted to immune cells. In fact, TLR4 is expressed in most cells of the body [11-14]. This phenomenon raises an intriguing question regarding the role of TLR4 as an inducer of insulin resistance: are the metabolic effects of TLR4 due to its activation in classical insulin-sensitive tissues or in immune cells? Or simultaneously in both? Part of this question began to be

explored in a study employing bone marrow transplantation (BMT) in which TLR4-deficient mice were donors and wild-type mice were recipients [15]. The approach resulted in the protection against diet-induced insulin resistance, suggesting that at least part of the phenomenon depends on bone marrow-derived immune cells. Here, we expanded these studies to further understand the role of TLR4 expression in non-bone-marrow-derived cells. We show that the presence or absence of TLR4 in bone marrow-derived cells is the determining factor that induces or protects animals from insulin resistance, respectively. In addition, we show that expression (or not) of TLR4 in cells other than the bone marrow-derived ones plays a minor role in this process.

Materials and methods

Experimental animals. The experiments involving mice were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee at the University of Campinas. Male C3H/HeJ (HJ) (harboring a loss-of-function mutation for the TLR4 gene) or C3H/HePas (HP) (wild-type control) mice were originally obtained from the Jackson Laboratory and are currently maintained as a colony at the University of Campinas breeding facility. All mice were fed on standard rodent chow up to six weeks of age, when BMT was performed. Thereafter, mice were randomly assigned to either a high-fat diet (HFD) (Table 1) or chow for 8 weeks. During the experimental period, the mice had access to their respective diets and to water *ad libitum* and were housed at 22°C under a 12 h light/dark cycle.

Irradiation and BMT. Six-week-old male HJ or HP mice were exposed to a single 8.0-gray total-body irradiation using a cobalt-60 source (Theratron-780 model, MDS Nordion, Ottawa, ON, Canada). Within 24 h after irradiation, the animals were injected via a tail vein with at least 5.0×10^6 bone marrow (BM) cells freshly collected from donor mice. The cells were aseptically harvested by flushing donor femurs with Dulbecco's PBS containing 2% fetal bovine serum

(DPBS-FBS). The samples were combined, filtered through a 40 μ m nylon mesh and centrifuged at room temperature for 10 minutes at 1,000 rpm. Cells were resuspended in DPBS at a concentration of 5.0×10^6 viable nucleated cells in 200 μ l for each mouse. Irradiated mice transplanted with this suspension were housed in autoclaved cages and treated with antibiotics (0.2 mg trimethoprim and 1.0 mg sulfamethoxazole/ml) in the drinking water given for four days before and seven days after irradiation. The following BMT chimeras were obtained: HJ_{BM}HJ, HJ_{BM}HP, HP_{BM}HP and HP_{BM}HJ mice.

Transplant efficiency. To test transplant efficiency, RNA was extracted from white blood cells and reverse-transcribed into cDNA. Amplification was obtained by PCR using the following primers: forward primer 5'CAATCATCAGTGTGTCAGTGG3' (TA 57°C) and reverse primer 5'ATGATGTTGGCAGCAATGGC3' (TA 59°C). The products were submitted to BstO1 digestion and separated by electrophoresis in agarose gel. Mutant TLR4 resulted in a fragment of 294 bp, whereas wild-type TLR4 resulted in a fragment of 267 bp.

Insulin and glucose tolerance tests. Were adapted from methods previously described [16].

Primary culture of macrophages. Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were prepared using the tibia and femur from 8- to 12-week-old mice (HJ or HP) using a protocol previously described [17]. Briefly, bone marrow cells were obtained by flushing bones with 5 ml of sterile RPMI. Cells were then counted and their concentration adjusted to 2.0×10^6 cells/ml in RPMI supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum and 30% of L929-conditioned medium. Cells (15 ml) were then plated in 75 cm³ bottles and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ for 7 days. Every 2-3 days, cells were washed twice with PBS and fresh medium was added. BMDMs were harvested from the bottle by incubating them with trypsin solution (0.25%) for 15 minutes and then by using a scraper. Cells were washed; resuspended in RPMI supplemented with 10% FBS, counted and plated at 1.0×10^6 cells/ml in 24-well plates. After 24 hours, cells were washed twice with PBS and fresh medium was added. The stimulus (Vehicle,

Palmitate 500 μ M or LPS 1 μ g/ μ L) was added to the cells, and supernatants were collected 24 hours later for TNF α determination using a commercially available kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol.

Immunoblotting. Liver and adipose tissue specimens were excised and immediately homogenized in solubilization buffer for evaluation of protein expression as previously described, with minor modifications [16]. Specific bands were detected by chemiluminescence and quantified by optical densitometry (Scion Image, Frederick, MD).

Real-time PCR. The relative mRNA expression of IL1 β , IL10, IL6, TNF β , MCP1 (liver and adipose tissue), PEPCK and G6Pase (liver), UCP1 and CitS (brown adipose tissue) were measured in samples obtained from mice submitted to BMT and fed a standard or high-fat diet. Intron-skipping primers were obtained from Applied Biosystems. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) was used as control. The endogenous control for normalization of GAPD was hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase. No significant change in GAPD expression was detected in the different experimental conditions. Real-time PCR analysis was performed using an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentrations of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through seven-point, two-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 40 ng of reverse-transcribed RNA and was performed according to the manufacturer's recommendation using the TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems). Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

Indirect calorimetry and spontaneous locomotor activity. Oxygen consumption/carbon dioxide production and spontaneous locomotor activity were measured in fed animals through a computer-controlled, open circuit calorimeter system LE405 Gas Analyzer (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Mice were singly housed in clear respiratory chambers, and room air was passed through chambers at a flow rate of 10 times the body weight of each

animal. The airflow within each chamber was monitored by a sensor Air Supply & Switching (Panlab – Harvard Apparatus). Gas sensors were calibrated prior to the onset of experiments with primary gas standards containing known concentrations of O₂, CO₂ and N₂ (Air Liquid, Sao Paulo, Brazil). The analyses were performed over a 24 h period. Outdoor air reference values were sampled after every four measurements. Sample air was sequentially passed through O₂ and CO₂ sensors for determination of O₂ and CO₂ content, from which measures of oxygen consumption (VO₂) and carbon dioxide production (VCO₂) were estimated. The VO₂ and VCO₂ were calculated by Metabolism 2.2v software based on the Withers equation and are expressed in ml·h⁻¹·g⁻¹. The RQ was calculated as VCO₂/VO₂.

Liver and adipose tissue histology. Hydrated 15 µm cryosections of liver were stained by Oil Red O for evaluation of fat content.

Statistical analysis. The results are presented as means ± SE. The Levene test for the homogeneity of variances was initially used to check the fit of data to the assumptions for parametric ANOVA. All results were analyzed by one-way ANOVA. When necessary, these analyses were complemented by the Tukey or Bonferroni test to determine the significance of individual differences. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Production of TLR4 chimeras. The protocol employed to generate the chimeras is illustrated in Figure 1A. The success in obtaining viable chimeras was approximately 85%. Mice successfully transplanted were randomly submitted to either chow or a high-fat diet (HFD) (Figure 1B). The presence of wild-type or mutated TLR4 gene was evaluated by PCR (Fig. 1C) and by the determination of the responsiveness of bone marrow-derived macrophages to LPS (Fig. 1D).

TLR4 expression in bone marrow-derived cells is a determining factor for body mass gain in diet-induced obesity. In chow-fed mice, the presence or absence of a functional TLR4 in either bone

marrow-derived or non-bone marrow-derived cells resulted in no significant change in a number of parameters related to energy consumption and expenditure (Fig. 2A–2I). However, upon high-fat feeding, the expression of the mutant form of TLR4 in bone marrow-derived cells protected mice from diet-induced obesity (Fig. 2A) by a mechanism independent of caloric intake (Fig. 2B) but dependent on energy expenditure (Fig. 2C–2F). The role of increased energy expenditure in the obesity-protection phenotype was reinforced by the increased expression of UCP1 in brown adipose tissue of chimeras expressing the mutant form of TLR4 in bone marrow-derived cells (Fig. 2H), which was accompanied by no significant change in the expression of citrate synthase (Fig. 2I). In addition, the chimeras presented no significant difference in spontaneous activity (Fig. 2G).

TLR4 expression in bone marrow-derived cells is a determining factor for whole-body insulin responsiveness. Because chimeras presented no significant difference in body mass regulation, energy expenditure or glucose regulation when fed chow, glucose and insulin tolerance tests were performed only in mice fed the high-fat diet. Only mice expressing a functional TLR4 in both bone marrow-derived and non-bone-marrow-derived cells presented an anomalous regulation of whole-body glucose homeostasis, as shown by increased area under the curve during a glucose tolerance test (Fig. 3A). The expression of the mutant TLR4 in bone marrow-derived cells protected mice from diet-induced insulin resistance, as determined by the constant for glucose decay during the insulin tolerance test (Fig. 3B).

The expression of mutant TLR4 in bone marrow-derived cells rescues mice from diet-induced impairment of insulin-stimulated Akt activation. HJ mice were protected from diet-induced impairment of insulin-signal transduction [Fig. 4A–4C, and [7]]. HJ chimeras expressing wild-type TLR4 in bone marrow-derived cells presented impaired insulin-induced activation of Akt in liver and white adipose tissue (Fig. 4A–4C). Conversely, HP chimeras expressing mutant TLR4 in

bone marrow-derived cells were protected from diet-induced impairment of insulin-induced activation of Akt in liver and white adipose tissue (Fig. 4A–4C).

Reduced expression of gluconeogenic enzymes and reduced liver steatosis in mice expressing mutant TLR4 in bone marrow-derived cells. The expression of mutant TLR4 in bone marrow-derived cells protected mice from a diet-induced increase in the hepatic expression of the gluconeogenic enzymes PEPCK (Fig. 5A) and G6Pase (Fig. 5B). In addition, mutant TLR4 in bone marrow-derived cells partially protected mice from diet-induced liver steatosis (Fig. 5C).

Reduced expression of inflammatory makers in white adipose tissue and liver of mice expressing mutant TLR4 in bone marrow-derived cells. The expression of mutant TLR4 in bone marrow-derived cells protected mice from a diet-induced increase in the expression of the inflammatory markers TNF α , IL1 α , IL6 and MCP1 in white adipose tissue (Fig. 6A) and liver (Fig. 6B); conversely, the expression of the anti-inflammatory cytokine IL10 was increased in both white adipose tissue (Fig. 6A) and liver (Fig. 6B).

Discussion

The objective of this study was to evaluate the roles of TLR4 expressed either in bone marrow-derived cells or in non-bone-marrow-derived cells as a mediator of diet-induced insulin resistance. To pursue our objective, chimeric mice were produced that expressed either the mutant TLR4 in bone marrow-derived cells of wild-type mice or wild-type TLR4 in the bone marrow-derived cells of TLR4-mutant mice. To exclude any possible interference from the BMT procedure, the controls used in the study were always submitted to syngeneic BMT. The transplant method used in the work was adapted from previous studies, and the rate of success was similar [18, 19].

Dietary fats can act through at least three distinct mechanisms to trigger insulin resistance, i.e., induction of endoplasmic reticulum (ER) stress, activation of TLR4 signaling [6, 7] and activation

of PKC [20]. In the case of ER stress, the prolonged exposure of cells to a lipid overload induces functional changes in the ER aimed at adapting protein synthesis to a potential damaging effect of the nutrient excess. As an outcome of this process, intracellular inflammatory signaling is activated through JNK and IKK, which can target and inhibit proteins of the insulin signaling pathway [3, 4]. Progressive accumulation of intracellular lipids can also induce the production of diacylglycerides, which in turn activate PKC, resulting in the serine phosphorylation and inhibition of IRSs [21]. In addition, increased circulating free fatty acids can trigger TLR4 signaling, leading to the activation of IKK and JNK and thus to the inhibitory serine phosphorylation of the insulin receptor and some of its substrates [6, 7]. Interestingly, at least two of these mechanisms, TLR4 signaling and ER stress, can influence each other, resulting in the potentiation of the intracellular signals that lead to insulin resistance [10].

Recent studies have identified changes in gut microbiota as yet another mechanism that can play an early role in the connection between increased consumption of dietary fats and insulin resistance [22, 23]. In both experimental animals and humans, changes in gut microbiota have been associated with lifestyle, including food preferences, and body mass [23, 24]. In obesity, there is an increase in gut *Firmicutes* species accompanied by a reduction in *Bacteroidetes* species, resulting in increased energy harvesting from the diet and increased LPS in the blood [25, 26]. Increased harvesting of fatty acids accompanied by increased blood LPS can act through the same three mechanisms described above to induce insulin resistance. Thus, if the gut microbiota hypothesis is proven correct, changes in gut microbiota could be one of the earliest phenomena connecting increased consumption of dietary fats to insulin resistance.

An important aspect of the mechanisms leading to insulin resistance is the fact that, except for the activation of PKC, the other three mechanisms, changes in gut microbiota, activation of TLR4 and induction of ER stress, are interconnected. In fact, approaches aimed at inhibiting any one of these mechanisms can, to a certain degree, also beneficially modulate the other two [6,

7, 9, 10, 25]. Thus, developing drugs that intervene in one of these mechanisms can have a broad impact on the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes.

TLR4 is expressed in most cells of the body [11-14]. However, its most remarkable immunological functions are exerted in cells of the innate immune system [27]. So far, only one study has evaluated the role of TLR4 expressed in bone marrow-derived cells to induce insulin resistance [15]. For that, C57BL/6 mice were transplanted with the bone marrow of TLR4-LPS-Del mice, leading to the production of chimeras devoid of TLR4 in cells derived from the bone marrow. Whole-body insulin action and adipose tissue and liver molecular action of insulin were similar between lean control mice and chimeras fed a high-fat diet [15]. This was accompanied by reduced recruitment of inflammatory cells to the adipose tissue. Thus, it was concluded that the presence of TLR4 in bone marrow-derived cells was necessary for the development of diet-induced insulin resistance. However, that study did not explore the important question regarding the sufficiency of TLR4 expressed in bone marrow-derived cells to fully produce the phenotype of insulin resistance. To explore this question, we produced two types of chimeras: one expressing wild-type TLR4 in bone marrow-derived cells and mutant TLR4 in non-bone marrow-derived cells, and vice-versa. Importantly, we employed the TLR4 spontaneous mutant, C3H/HeJ, which displays some phenotypic differences compared to the TLR4-LPS-Del mice [6, 7].

As a whole, our study shows that the presence of wild-type TLR4 in bone marrow-derived cells is necessary and sufficient for the complete phenotypic expression of diet-induced insulin resistance. Interestingly, the presence of the mutant TLR4 in bone marrow-derived cells rescued mice from diet-induced obesity, which is different from the effect observed when the TLR4-LPS-Del mice were employed. This phenomenon has been previously described, though an explanation for it remains elusive [6, 7].

Another important outcome resulting from the absence of a functional TLR4 in bone marrow-derived cells and not reported in the study with TLR4-LPS-Del mice was the considerable protection against diet-induced liver steatosis. We have previously shown that IL10 expression in the liver is capable of reducing steatosis [28]. Here we show that the expression of pro-inflammatory cytokines is reduced while IL10 is increased in the liver (as well as in adipose tissue) of mice expressing the mutant TLR4 in bone marrow-derived cells. This reinforces the role of diet-associated local inflammation as an important factor linking insulin resistance to hepatic dysfunction.

In summary, our study used a different and expanded approach to show that most of the effect of TLR4 activation in diet-induced insulin resistance depends on the receptor expressed in cells originating from the bone marrow. As TLR4 plays an important role in the activation of an innate immune response against Gram-negative bacteria, long-term targeting of TLR4 in bone marrow-derived cells as an approach to treat type 2 diabetes must be considered with caution.

Acknowledgments. We thank Erika Roman, Gerson Ferraz and Marcio Cruz, from the University of Campinas, for technical assistance. The funding for the study was provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The laboratory of Cell Signaling belongs to the Obesity and Comorbidities Research Center and the National Institute of Science and Technology – Diabetes and Obesity.

References

- [1] Rask-Madsen C, Kahn CR (2012) Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32: 2052-2059
- [2] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444: 840-846
- [3] Hotamisligil GS, Erbay E (2008) Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature reviews Immunology* 8: 923-934

- [4] Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology* 29: 415-445
- [5] Glass CK, Olefsky JM (2012) Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell metabolism* 15: 635-645
- [6] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116: 3015-3025
- [7] Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, et al. (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986-1998
- [8] Jialal I, Kaur H, Devaraj S (2014) Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99: 39-48
- [9] Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 359-370
- [10] Coope A, Milanski M, Arruda AP, et al. (2012) Chaperone insufficiency links TLR4 protein signaling to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* 287: 15580-15589
- [11] Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE (2000) The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 275: 24255-24263
- [12] Matsumura T, Ito A, Takii T, Hayashi H, Onozaki K (2000) Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 20: 915-921
- [13] Frantz S, Kobzik L, Kim YD, et al. (1999) Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of clinical investigation* 104: 271-280
- [14] Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK (2000) Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *Journal of immunology* 164: 966-972
- [15] Saberi M, Woods NB, de Luca C, et al. (2009) Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell metabolism* 10: 419-429
- [16] Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, et al. (2012) Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PloS one* 7: e30571
- [17] Weischenfeldt J, Porse B (2008) Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* 2008: pdb prot5080
- [18] Simard AR, Rivest S (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 998-1000

- [19] Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49: 489-502
- [20] Jornayvaz FR, Shulman GI (2012) Diacylglycerol activation of protein kinase Cepsilon and hepatic insulin resistance. *Cell metabolism* 15: 574-584
- [21] Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148: 852-871
- [22] Backhed F, Ding H, Wang T, et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15718-15723
- [23] Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, et al. (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500: 585-588
- [24] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341: 1241214
- [25] Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, et al. (2011) Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology* 9: e1001212
- [26] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481
- [27] Tan Y, Kagan JC (2014) A Cross-Disciplinary Perspective on the Innate Immune Responses to Bacterial Lipopolysaccharide. *Molecular cell* 54: 212-223
- [28] Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, et al. (2008) Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of hepatology* 48: 628-637

Table

Table 1. Nutrient composition of diets.

Ingredients	CT	HF
Corn Starch	427.5	115.5
Casein	200	200
Sucrose	132	132
Dextrinated Starch	100	100
Soybean Oil	40	40
Lard	0	312
Flax Seed Oil	0	0
Olive Oil	0	0
Cellulose	50	50
Mineral Mix	35	35
Vitamin Mix	10	10
L-Cysteine	3	3
Choline	2.5	2.5
Total	1000	1000

CT, chow; HF, high-fat diet.

Legends for the figures

Figure 1. Production of chimeric mice. A, Cartoon depicting all the combinations obtained with bone marrow transplants: C3H/Hepas (HP) syngeneic transplant ($HP_{BM}HP$), HP donating to C3H/HeJ (HJ) ($HJ_{BM}HP$), HJ donating to HP ($HP_{BM}HJ$) and HJ syngeneic transplant ($HJ_{BM}HJ$). B, Cartoon depicting the whole experimental procedure: antibiotics (ATB) were given for ten days beginning four days before radiotherapy (RXT); transplant (TXT) occurred one day after RTX; three weeks after TXT, successfully transplanted mice were randomly placed on chow (CT) or high-fat diet (HF) for eight weeks; experiments were performed during the last week of the protocol. C, Success of the TXT was tested in peripheral white blood cells by PCR employing primers that amplified the mutated region of the TLR4 transcripts. The amplified fragments were BstO1-digested, and the products were separated by electrophoresis in agarose gel. Wild-type cDNA resulted in a 267 bp fragment, whereas mutated cDNA resulted in a 294 bp fragment. D, Bone marrow-derived macrophages were plated at 1.0×10^6 cells/ml in 24-wells plates. After 24 hours, cells were treated with either vehicle (CT), palmitate (500 μ M, PALM) or LPS (1 μ g/ μ L), and supernatants were collected 24 hours latter for TNF α determination by ELISA. In D, n=6, *p<0.05 vs. respective CT.

Figure 2. Metabolic characterization of transplanted mice. Chimeric and syngeneic transplanted mice were evaluated for body mass variation (A), mean caloric intake (B), O₂ consumption (C) [upper graph shows 24 h O₂ consumption for mice fed chow (CT); middle graph shows 24 h O₂ consumption for mice fed high-fat diet (HF); lower graph shows the means for the period], CO₂ production (D) [upper graph shows 24 h CO₂ consumption for mice fed chow (CT); middle graph shows 24 h CO₂ consumption for mice fed high-fat diet (HF); lower graph shows the means for the period], respiratory quotient (E), energy efficiency (F), and spontaneous activity (G). At the end of the experimental period, brown adipose tissue was dissected, and a fragment was obtained for preparation of RNA, which was reverse-transcribed into cDNA and

employed in real-time PCR for uncoupling protein 1 (UCP1) (H) and citrate synthase (CitS) (I). In all experiments $n = 6$; $*p < 0.05$ vs. respective control on chow. In bar graphs, white bars: mice fed chow; black bars: mice fed high-fat diet. C3H/Hepas (HP) syngeneic transplant ($HP_{BM}HP$), HP donating to C3H/HeJ (HJ) ($HJ_{BM}HP$), HJ donating to HP ($HP_{BM}HJ$) and HJ syngeneic transplant ($HJ_{BM}HJ$).

Figure 3. Glucose homeostasis in transplanted mice. Chimeric and syngeneic transplanted mice fed a high fat diet (HF) were submitted to an intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) (A). Blood glucose during the test is shown in the upper graph, whereas the area under the glucose curves is shown in the lower graph. B, Intraperitoneal insulin tolerance test (ITT). Blood glucose during the test is shown in the upper graph, whereas the constant for glucose decay (kITT) during the test is shown in the lower graph. In all experiments, $n=6$; in A, $*p < 0.05$ vs. $HP_{BM}HJ$; in B, $*p < 0.05$ vs. $HJ_{BM}HP$ and $\#p < 0.05$ vs. $HP_{BM}HP$. C3H/Hepas (HP) syngeneic transplant ($HP_{BM}HP$), HP donating to C3H/HeJ (HJ) ($HJ_{BM}HP$), HJ donating to HP ($HP_{BM}HJ$) and HJ syngeneic transplant ($HJ_{BM}HJ$).

Figure 4. Insulin signal transduction through Akt in the liver and adipose tissue. Chimeric and syngeneic transplanted mice fed chow (CT) or a high-fat diet (HF) were acutely treated with saline (-) or an intravenous insulin injection (+). After five minutes, fragments of the liver and periepididymal white adipose tissue were obtained and prepared for separation by SDS-PAGE. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blotted with an anti-phospho-Akt (pAKT) antibody. A, Typical blots obtained in the experiments. B and C, Quantitative analyses of the specific bands present in the blots for liver and adipose tissue, respectively. All blots were stripped and reblotted with beta-actin for evaluation of protein loading. In all experiments, $n=6$; in B and C, $*p < 0.05$ vs. $HJ_{BM}HJ$ (HF, +). C3H/Hepas (HP) donating to C3H/HeJ (HJ) ($HJ_{BM}HP$), HJ donating to HP ($HP_{BM}HJ$) and HJ syngeneic transplant ($HJ_{BM}HJ$). White bars, CT; black bars, HF.

Figure 5. Liver enzyme expression and steatosis. Fragments of the liver of chimeric and syngeneic transplanted mice fed chow (CT) or a high-fat diet (HF) were obtained at the end of the experimental period for preparation of RNA, which was reverse-transcribed into cDNA and employed in real-time PCR for phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (A) and glucose-6 phosphatase (G6Pase) (B). In addition, liver was employed in histological preparations stained with Oil Red O (C). In all experiments, n=6; in A and B, *p<0.05 vs. respective CT. C3H/Hepas (HP) syngeneic transplant (HP_{BM}HP), HP donating to C3H/HeJ (HJ) (HJ_{BM}HP), HJ donating to HP (HP_{BM}HJ) and HJ syngeneic transplant (HJ_{BM}HJ).

Figure 6. Inflammatory and anti-inflammatory gene expression in adipose tissue and liver. Fragments of the periepididymal adipose tissue (A) and liver (B) of chimeric and syngeneic transplanted mice fed chow (white bars) or a high-fat diet (black bars) were obtained at the end of the experimental period for preparation of RNA, which was reverse-transcribed into cDNA and employed in real-time PCR for tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin-1 beta (IL1 β), interleukin-6 (IL6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP1) and interleukin-10 (IL10). In all experiments, n=6; *p<0.05 vs. respective CT. C3H/Hepas (HP) syngeneic transplant (HP_{BM}HP), HP donating to C3H/HeJ (HJ) (HJ_{BM}HP), HJ donating to HP (HP_{BM}HJ) and HJ syngeneic transplant (HJ_{BM}HJ).

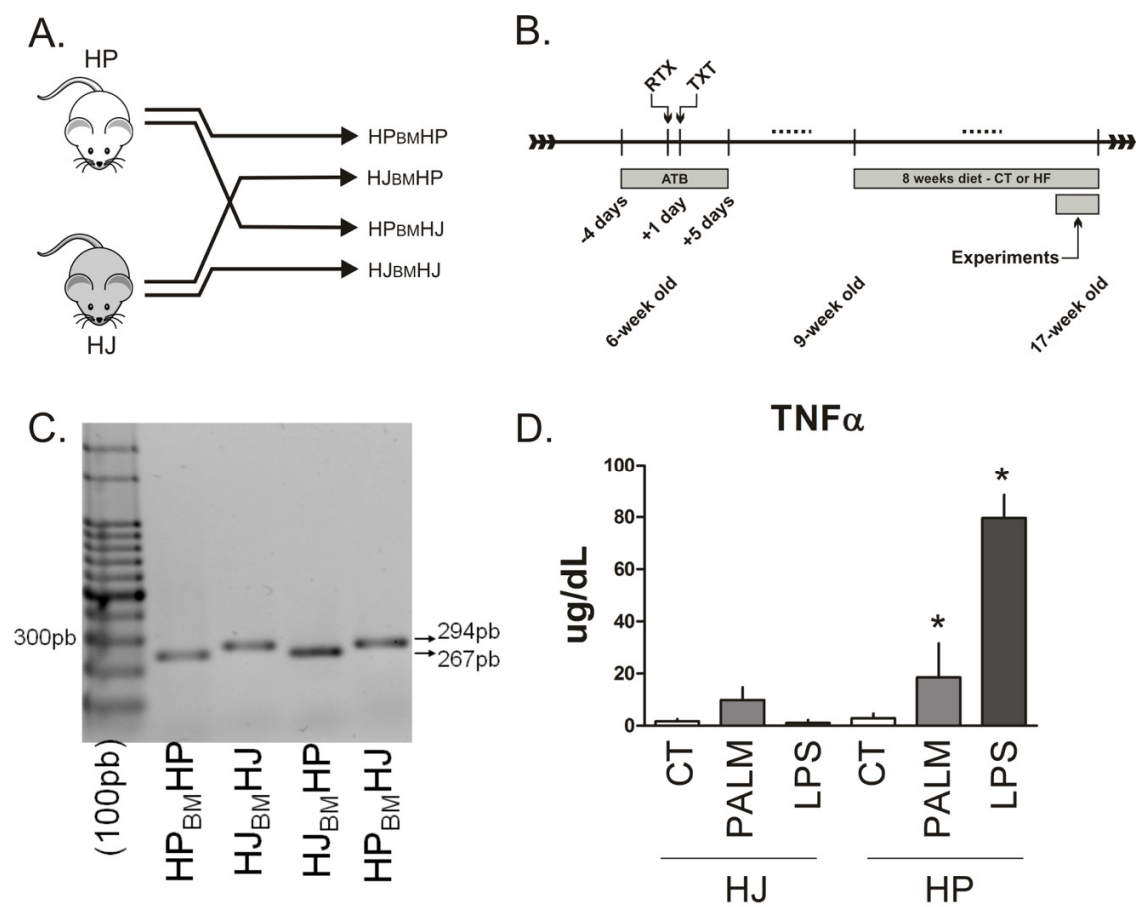


Figure 1 – Razolli et. al.

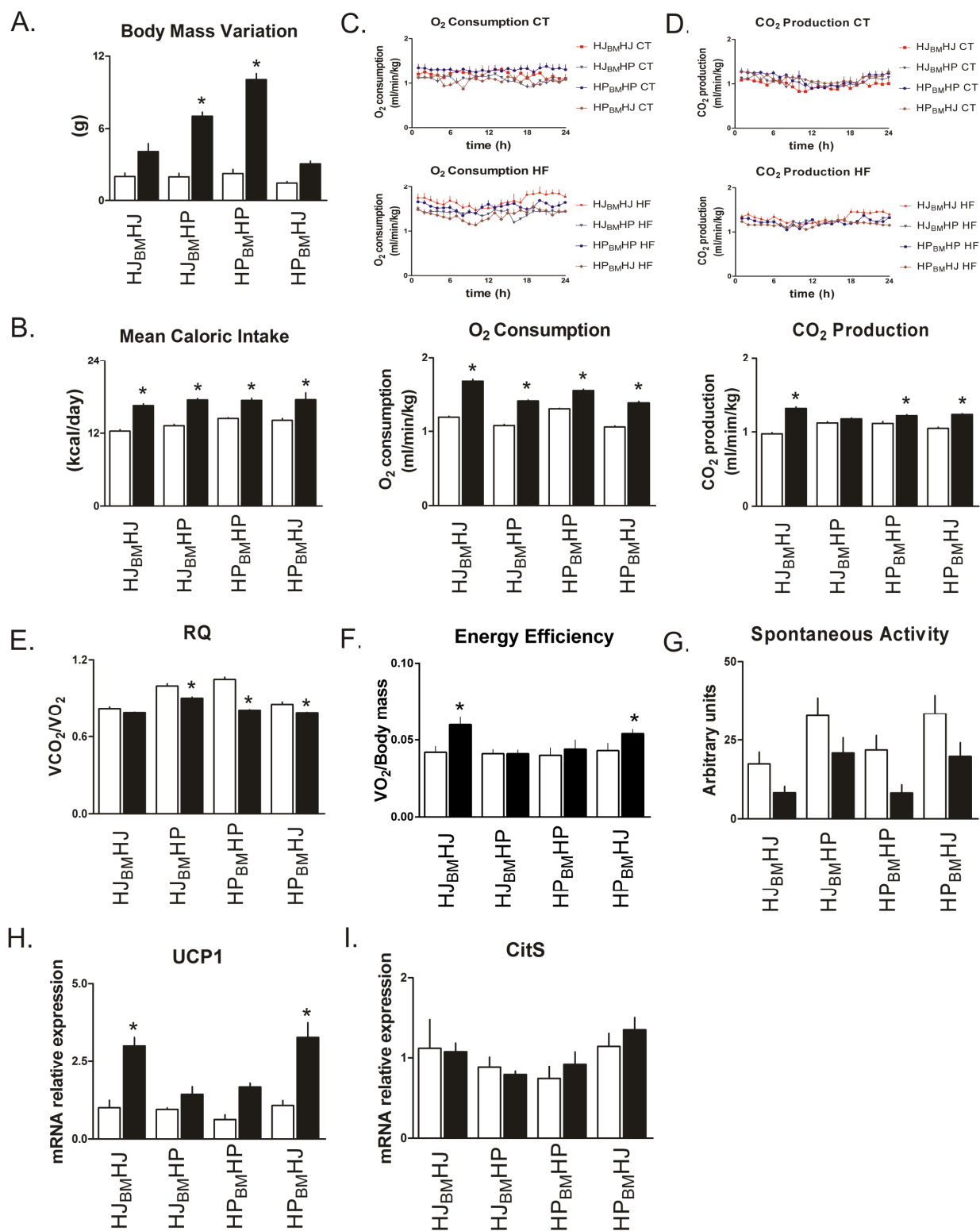


Figure 2 – Razolli et. al.

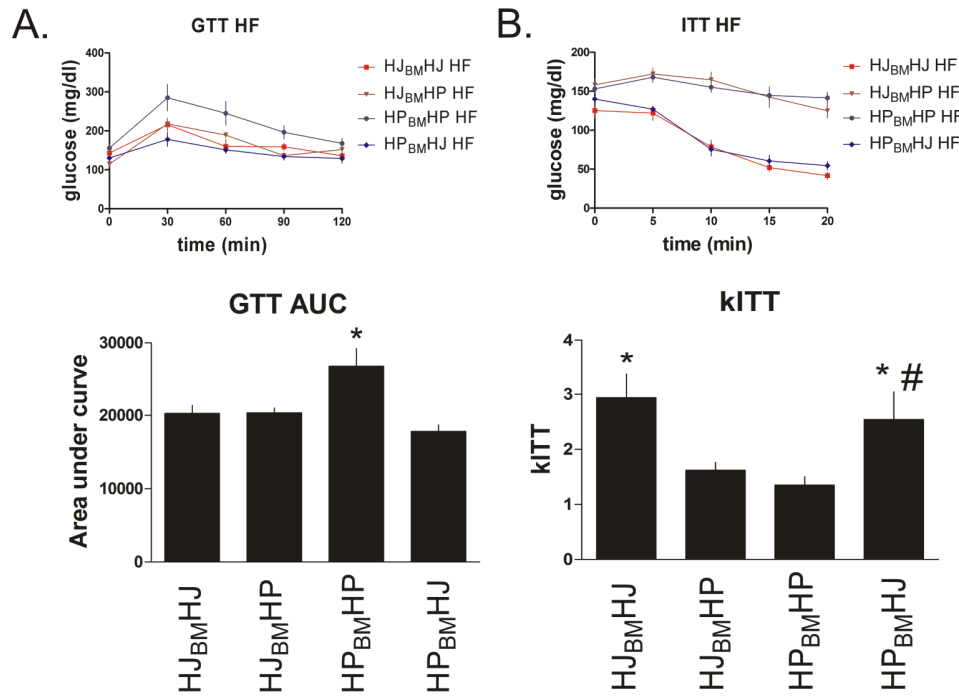
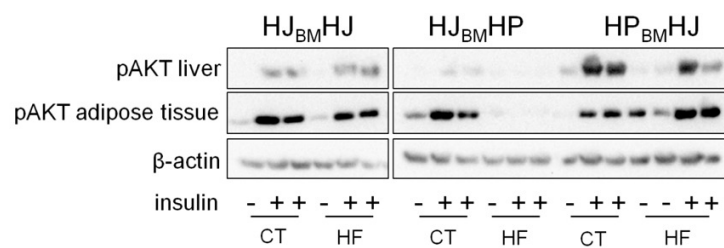
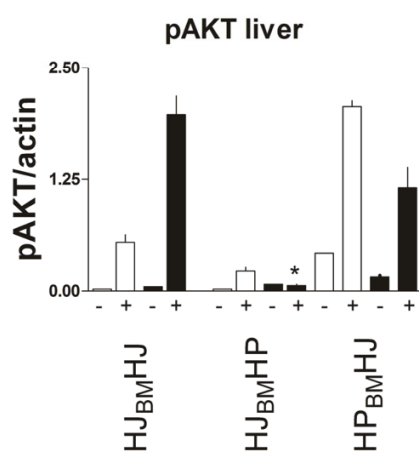


Figure 3 – Razolli et. al.

A.



B.



C.

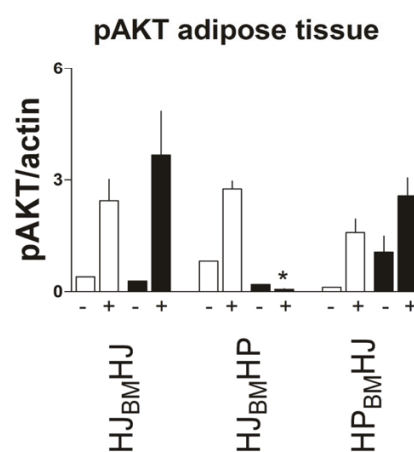


Figure 4 – Razolli et. al.

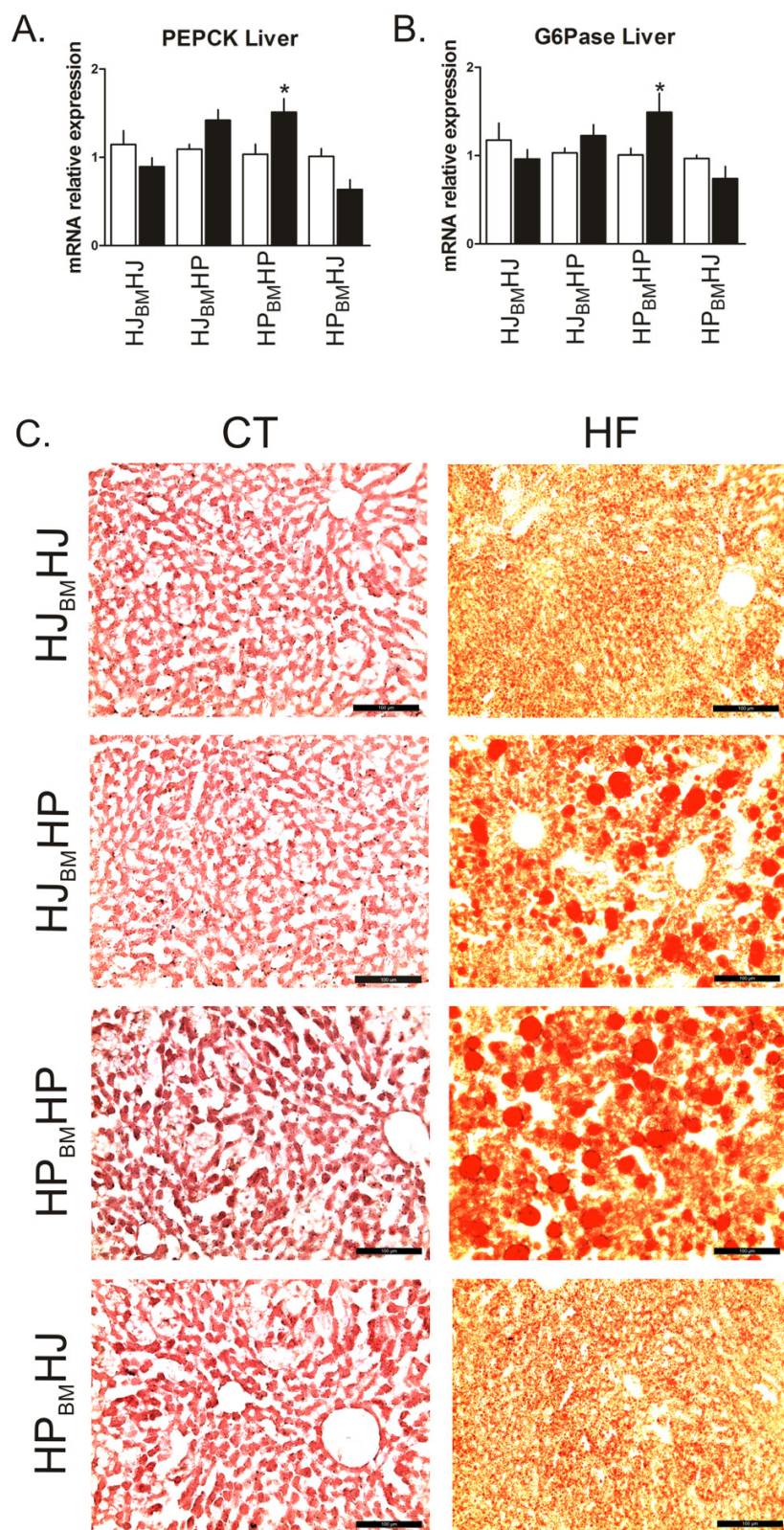


Figure 5 – Razolli et. al.

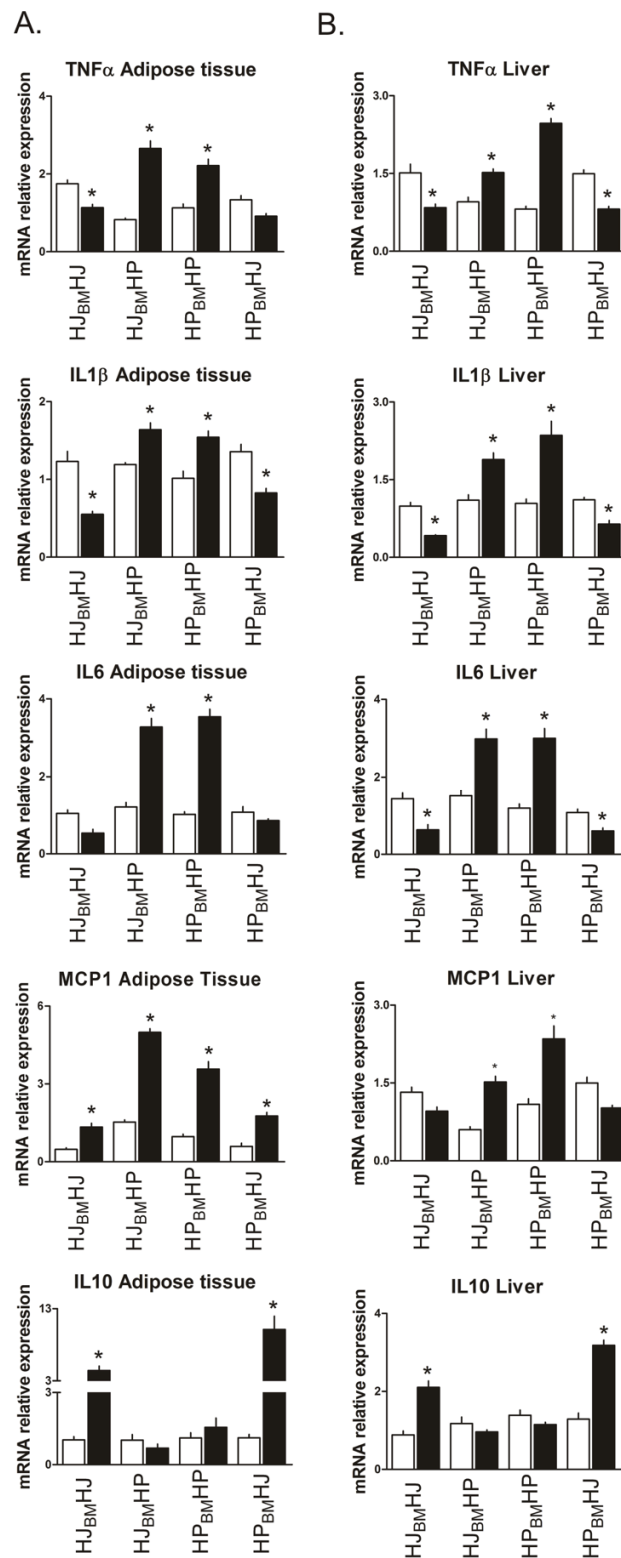


Figure 6 – Razolli et. al.

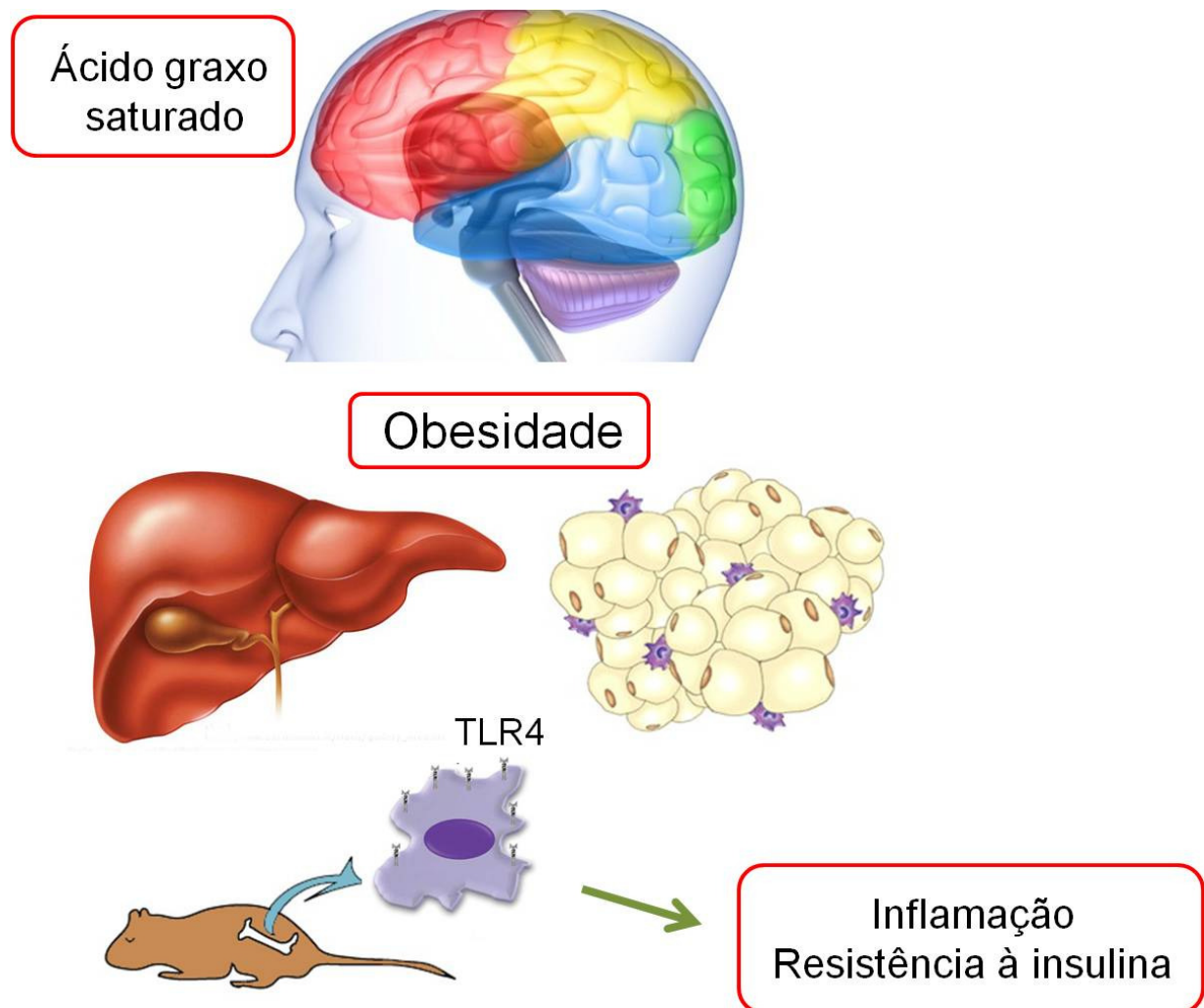
4. RESUMO DOS RESULTADOS

Nossos resultados revelaram que camundongos com ausência de TLR4 em células derivadas da medula óssea, em HFD, apresentam:

- Proteção contra o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta.
- Maior gasto energético.
- Melhora no perfil inflamatório no fígado e tecido adiposo.
- Proteção contra o acúmulo de gordura hepática.
- Melhora na tolerância a glicose e sensibilidade a insulina.
- Preservação da via da insulina no fígado e tecido adiposo.

5. CONCLUSÃO

A expressão de TLR4 em células derivadas da medula óssea é um mediador da resistência à insulina associada à obesidade induzida por dieta em camundongos. Sua presença nestas células é ao mesmo tempo suficiente e necessária para o desenvolvimento dos fenótipos de obesidade e resistência à insulina induzidas por dieta.



Esquema final. TLR4 em células da medula óssea mediando a inflamação e resistência à insulina na obesidade induzida pelo consumo de dieta rica em ácido graxo saturado.

6. REFERÊNCIAS

- 1) Aderem A and Ulevitch RJ. *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):782-7.
- 2) Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of Toll gene product. Cell. 1985 Oct;42(3):779-89.
- 1) Akira S, Takeda K and Kaisho T. *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol. 2001 Aug;2(8):675-80.
- 2) Akira S and Takeda K. *Toll-like receptor signaling*. Nat Rev Immunol. 2004 Jul;4(7):499-511.
- 3) Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. *Pathogen Recognition and Innate Immunity*. Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- 4) Baskin ML, Ard J, Franklin F, et al. *Prevalence of obesity in the United States*. Obes Rev. 2005 Feb;6(1):5-7.
- 5) Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, et al. *TLR-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat*. Obesity (Silver Spring). 2008 Jun;16(6):1248-55
- 6) de Luca C, Olefsky JM. *Stressed out about obesity and insulin resistance*. Nat Med. 2006 Jan;12(1):41-2; discussion 42.
- 7) De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. *Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus*. Endocrinology. 2005 Oct;146(10):4192-9.
- 8) Flier JS. *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic*. Cell. 2004 Jan 23;116(2):337-50.

- 9) Friedman JM, Halaas JL. *Leptin and the regulation of body weight in mammals.* Nature. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
- 10) Goris AH, Westerterp KR. *Physical activity, fat intake and body fat.* Physiol Behav. 2008 May 23;94(2):164-8.
- 11) Hotamisligil GS. *Inflammation and metabolic disorders.* Nature. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.
- 12) Ishwarlal Jialal, Harmeet Kaur, and Sridevi Devaraj. *Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective.* J Clin Endocrinol Metab. 2014 Jan;99(1):39-48.
- 13) Jan Heinrichsdorff and Jerrold Olefsky. *Fetuin-A: the missing link in lipid-induced inflammation.* Nature Medicine. 2012 (18) 1182-1183.
- 14) Jeb S. Orr, Michael J. Puglisi, Kate L.J. Ellacott, *et.al.* *Toll-like Receptor 4 Deficiency Promotes the Alternative Activation of Adipose Tissue Macrophages.* Diabetes. 2012 Nov;61(11):2718-27.
- 15) Joel D. Schilling, Heather M. Machkovech, Li He, *et.al.* *TLR4 Activation Under Lipotoxic Conditions Leads to Synergistic Macrophage Cell Death through a TRIF-Dependent Pathway.* J Immunol. 2013 Feb 1;190(3):1285-96.
- 16) Konner AC and Bruning JC. *Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism.* Trends in Endocrinology and Metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2011 Jan;22(1):16-23.
- 17) Kopelman PG. *Obesity as a medical problem.* Nature. 2000 Apr 6;404(6778):635-43.
- 18) Krashes MF, Koda S, Ye CP, *et al.* *Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice.* J Clin Invest. 2011 Apr;121(4):1424-8.
- 19) Kurt Lucas & Michael Maes. *Role of the Toll Like Receptor (TLR) Radical Cycle in Chronic Inflammation: Possible Treatments Targeting the TLR4 Pathway.* Mol Neurobiol. 2013 Aug;48(1):190-204.

- 20) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, *et al.* *The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spatzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults.* Cell. 1996 Sep 20;86(6):973-83.
- 21) McMinin JE, Baskin DG, Schwartz MW. *Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight.* Obes Rev. 2000 May;1(1):37-46.
- 22) Medzhitov R, Hurlburt PP, Janeway Jr CA. *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- 23) Medzhitov R and Janeway Jr CA. *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses.* Semin Immunol. 1998 Oct;10(5):351-3.
- 24) Milanski M, Degasperi G, Coope A, *et al.* *Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity.* J Neurosci. 2009 Jan 14;29(2):359-70.
- 25) Moraes JC, Coope A, Morari J, *et al.* *High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons.* PLoS One. 2009;4(4):e5045.
- 26) Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, *et al.* *Central nervous system control of food intake and body weight.* Nature. 2006 Sep 21;443(7109):289-95.
- 27) Moussavi N, Gavino V, Receveur O. *Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity?* Obesity (Silver Spring). 2008 Jan;16(1):7-15.
- 28) Olefsky JM, Glass CK. *Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance.* Annu Rev Physiol. 2010;72:219-46.
- 29) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, *et al.* *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene.* Science. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.

- 30) Rasheed Ahmad, Anfal Al-Mass, Valerie Atizado, *et al.* *Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation.* J Inflamm (Lond). 2012 Nov 28;9(1):48
- 31) Saberi M, Woods NB, Luca C, *et al.* *Hematopoietic Cell-Specific Deletion of Toll-like Receptor 4 Ameliorates Hepatic and Adipose Tissue Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice.* Cell Metab. 2009 Nov;10(5):419-29.
- 32) Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, *et al.* *Central nervous system control of food intake.* Nature. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.
- 33) Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, *et al.* *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* J Clin Invest. 2006 Nov;116(11):3015-25.
- 34) Spiegelman BM, Flier JS. *Obesity and the regulation of energy balance.* Cell. 2001 Feb 23;104(4):531-43.
- 35) Stein CJ, Colditz GA. *The epidemic of obesity.* J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2522-5.
- 36) Thaler JP, Yi CX, Schur EA *et al.* *Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans.* J Clin Invest. 2012 Jan 3;122(1):153-62.
- 37) Tritos NA, Vicent D, Gillette J, *et al.* *Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus.* Diabetes. 1998 Nov;47(11):1687-92.
- 38) Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, *et al.* *Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus.* Brain Res. 2001 Mar 23;895(1-2):160-6.
- 39) Tomoki Abe, Katsuya Hirasaka, Sachiko Kagawa *et al.* *Cbl-b Is a Critical Regulator of Macrophage Activation Associated with Obesity-Induced Insulin Resistance in Mice.* Diabetes. 2013 Jun;62(6):1957-69.

- 40) Tsukumo DML, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JBC, *et al.* *Resistance Loss-of-Function Mutation in Toll-Like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin.* Diabetes. 2007 Aug;56(8):1986-98. Epub 2007 May 22.
- 41) van den Pol A. *Neuropeptide Transmission in Brain Circuits.* Neuron. 2012 Oct 4;76(1):98-115.
- 42) Dietrich MO and Horvath TL. *Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity.* Trends Neurosci. 2013 Feb;36(2):65-73.
- 43) Varela L and Horvath TL. *Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis.* EMBO Rep. 2012 Dec;13(12):1079-86.
- 44) Velloso LA and Schwartz MW. *Altered hypothalamic function in diet-induced obesity.* International. Int J Obes (Lond). 2011 Dec;35(12):1455-65.
- 45) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et.al.* *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature. 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
- 46) Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. CSH Protoc. 2008 Dec 1;2008:pdb.prot5080.

7. APÊNDICE

7.1 Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp)



CEUA/Unicamp

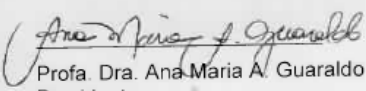
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

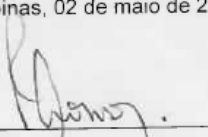
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "O papel dos receptores Toll-like 4 em vias metabólicas periféricas de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas com obesidade induzida por dieta" (protocolo nº 2397-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Licio Augusto Velloso / Daniela Soares Razolli, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de maio de 2011.

Campinas, 02 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais. Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram provenientes da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT) serão da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85 0,2µm) da *Schleicher & Schuell*. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA), *Cell Signaling* (Danvers, MA, USA), *Wako Chemicals Inc.* (Richmond, VA, USA) ou *Imuny* (Campinas, Brasil).

Modelo animal. Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C3H/HeJ (HJ mutantes, com perda de função do receptor TLR4) e seu respectivo controle C3H/HePas (HP tipo selvagem, sem perda de função do receptor TLR4), provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com aprovação do comitê de ética para uso de animais (CEUA 2397-1). Os animais com 4 semanas de vida foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por gaiola. Foram mantidos em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo artificial de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas). Os animais sofreram ablação de medula e foram transplantados com a medula de um doador específico, conforme os 4 grupos descritos abaixo:

- 1) C3H/ HeJ que recebeu medula de C3H/HeJ - (HJ_{BM}HJ)
- 2) C3H/HeJ que recebeu medula de C3H/HePas - (HJ_{BM}HP)
- 3) C3H/HePas que recebeu medula de C3H/HePas - (HP_{BM}HP)
- 4) C3H/HePas que recebeu medula de C3H/HeJ - (HP_{BM}HJ)

Após a ablação da medula e transplante, os animais foram mantidos em mini-isoladores para recuperação. Posteriormente, os animais foram alimentados por 8 semanas com ração comercial ou dieta hiperlipídica (Tabela 1) e água “*ad libitum*”.

Tabela 1 – Composição das dietas

Ingredientes	Controle American Institute of Nutrition (1kg)	Hiperlipídica rica em saturados (1kg)
Amido	467,5g	115,5g
Caseína	200,0g	200,0g
Amido de Milho dextrinizado	132,0g	132,0g
Sacarose	100,0g	100,0g
Óleo de soja	40,0g	40,0g
Banha de porco	-	312,0g
Celulose microfibrilada (fibra)	50,0g	50,0g
Mistura de minerais	35,0g	35,0g
Mistura de vitaminas	10,0g	10,0g
L-cistina	1,8g	1,8g
Bitartarato de colina	2,5g	2,5g
Total	1000,0g	1000,0g

Cultura primária de macrófagos. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram preparados a partir de tíbia e fêmur de camundongos C3H/HeJ (HJ) ou C3H/HePas (HP) entre 8 e 12 semanas de vida, utilizando o protocolo previamente descrito por Weischenfeld e Porse (2008). As células obtidas foram rapidamente lavadas com 5 mL de meio RPMI estéril. As células foram contadas e ajustadas para $1-2 \times 10^6$ cells/mL em meio RPMI suplementado com 20% de FBS e 30% de meio condicionado L929. Foram plaqueadas (15 mL) em garrafas de 75 cm³ e incubadas a 37°C em estufa 5% de CO₂ humidificada por 7 dias. A cada 2-3 dias, as células foram lavadas duas vezes com PBS e um meio novo foi adicionado. BMDM foram removidas da garrafa pela adição de tripsina 0,25% por 15 minutos. As células foram lavadas,

homogeneizadas em RPMI com 10% de FBS e plaqueadas 1×10^6 cells/mL em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS e um meio novo foi adicionado. As células foram estimuladas com veículo, palmitato 500 μ M ou LPS 1 μ g/ μ L. O sobrenadante foi coletado após 24 horas para a análise de TNF α usando kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

Eficiência do transplante. A eficiência do transplante foi testada por meio da expressão de TLR4 amplificado a partir da PCR (primer sense 5'CAATCATCAGTGTGTCAGTGG3' TA 57°C e primer antisense 5'ATGATGTTGGCAGCAATGGC3' TA 59°C) seguida de digestão enzimática com BstO1 e separação por eletroforese em gel de agarose. O cDNA de HJ_{BM}HJ e HP_{BM}HJ cDNA resulta em um fragmento de 294pb enquanto HJ_{BM}HP e HP_{BM}HP resulta em um fragmento de 267pb.

Sequência do fragmento de 294pb:

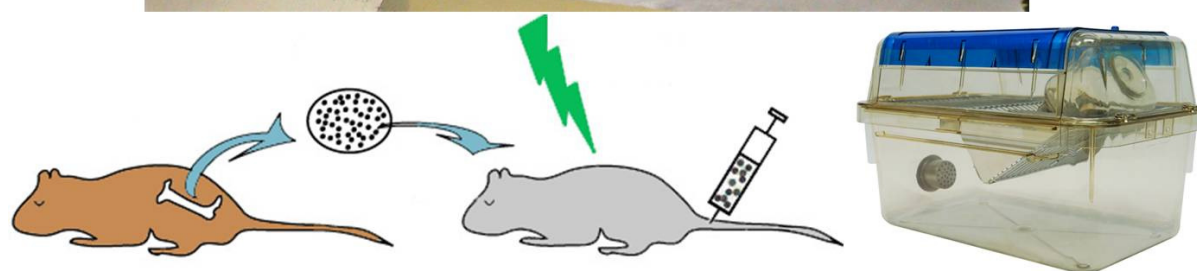
TACCTGTTATATGTACAAGACAATCATCAGTGTGTCAGTGGTCAGTGTGATTGTGGTATCCA
CTGTAGCATTCTGATATACCACTTCTATTTTCACCTGATACTTATTGCTGGCTGTAAAAAGT
ACAGCAGAGGAGAAAGCATCTATGATGCATTTGTGATCTACTCGAGTCAGAATGAGGACTG
GGTGAGAAATGAGCTGGTAAAGAATTTAGAAGAAGGAGTGCCCCGCTTTCACCTCTGCCTT
CACTACAGAGACTTTATTCTGCTGTAGCCATTGCTGCCAACATCAT.

Sequência do fragment de 267pb:

TACCTGTTATATGTACAAGACAATCATCAGTGTGTCAGTGGTCAGTGTGATTGTGGTATCCA
CTGTAGCATTCTGATATACCACTTCTATTTTCACCTGATACTTATTGCTGGCTGTAAAAAGT
ACAGCAGAGGAGAAAGCATCTATGATGCATTTGTGATCTACTCGAGTCAGAATGAGGACTG
GGTGAGAAATGAGCTGGTAAAGAATTTAGAAGAAGGAGTGCCCCGCTTTCACCTCTGCCTT
CACTACAGAGACTTTATTCC.

Ablação de medula. Camundongos C3H/HeJ (mutantes para TLR4) ou C3H/HePas (tipo selvagem) foram expostos à uma dose semi-letal de irradiação (8 *gray*), utilizando fonte de cobalto 60 em todo o corpo. Após 24 horas, receberam pela veia caudal uma quantidade de $5,0 \times 10^6$ células de medula óssea recém-coletadas de animais selvagens ou mutantes (conforme grupos descritos acima). Estas células foram coletadas assepticamente dos fêmures dos camundongos, através de lavagem com PBS + 2% de soro fetal bovino. As amostras foram

combinadas, filtradas em filtro de 40 μm e centrifugadas por 10 minutos a 1,000 rpm. As células foram homogeneizadas em DPBS e injetadas pela veia caudal dos animais receptores. Os animais irradiados e transplantados foram mantidos em mini-isoladores e tratados com antibiótico (0.2 mg trimetoprima e 1 mg sulfametoxazol/ml) diluído em água 4 dias antes e 7 dias após o transplante. Foram realizados os seguintes grupos experimentais: $\text{HJ}_{\text{BM}}\text{HJ}$, $\text{HJ}_{\text{BM}}\text{HP}$, $\text{HP}_{\text{BM}}\text{HP}$ e $\text{HP}_{\text{BM}}\text{HJ}$. O esquema abaixo mostra a fonte de cobalto 60, a representação da técnica e o mini-isolador onde são mantidos os animais transplantados.



Ingestão alimentar. Durante as 8 semanas de dieta (padrão e hiperlipídica), 2x/semana foram avaliados o ganho de peso individual e a ingestão alimentar média dos animais. Para análise de ingestão alimentar, o consumo foi calculado pela diferença entre a quantidade restante de dieta em relação à ofertada, dividido pela quantidade de animais em cada caixa.

Teste de Tolerância à Glicose. Para o teste de tolerância à glicose, os animais foram pesados e passaram por um jejum de 6 horas. Foi coletada uma amostra de sangue antes do início do experimento (tempo 0). Uma solução contendo 25% de glicose foi administrada intraperitonealmente na quantidade de 1g/kg de peso corpóreo e amostras de sangue foram coletadas pela cauda para avaliar a concentração plasmática de glicose nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a aplicação de glicose. Os resultados foram expressos como área sob a curva.

Teste de Tolerância à Insulina. Para o teste de tolerância à insulina, após jejum de 6 horas os animais foram tratados, intraperitonealmente, com insulina a 1,5 IU/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para verificar a glicemia antes do início do teste (tempo 0), e a cada 5 minutos após a injeção com insulina, por 30 minutos. A taxa constante de decaimento da glicose plasmática (Kitt) foi calculada pela fórmula $0.693/t_{1/2}$. O tempo de meia-vida da glicose plasmática foi calculado durante a fase linear de declínio da concentração de glicose plasmática.

Análise de proteínas por immunoblotting. Os tecidos extraídos foram homogeneizados a 4°C em tampão de extração de proteínas totais [1% Triton-X 100, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2 mmol/L PMSF e 0.2 mg/mL aprotinina] com *Politron PTA 20S generator* (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Os fragmentos celulares foram centrifugados para remoção da fração insolúvel a 11.000 rpm por 40 minutos a 4°C. A quantificação de proteínas totais do sobrenadante foi realizada pelo método de Bradford. Foi adicionado tampão de Laemmli + 100 mmol/L de DTT e, após 5 minutos à 95°C, alíquotas contendo 0,05-0,2 mg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi pré-incubada por 2 horas com tampão de bloqueio (5% de leite em pó

desnatado, 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02% de Tween 20) para minimizar a ligação do anticorpo à proteínas inespecíficas. Posteriormente, foi incubada por 16-18 horas com o anticorpo primário específico, diluído em tampão de bloqueio (3% de leite em pó desnatado, 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02% de Tween 20) . Após 3 lavagens de 15 minutos com solução tampão (10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02% de Tween 20), a membrana foi incubada por 1:30h com anticorpos secundários conjugados à peroxidase. As bandas das proteínas foram detectadas por quimioluminescência, após exposição a filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Os cassetes foram mantidos à temperatura ambiente por períodos de tempo variáveis e a quantificação das bandas proteicas foi realizada por meio de densitometria óptica. Para análises de proteínas da via da insulina, foi utilizado o anticorpo primário anti-pAKT (sc-7985-R, Santa Cruz Biotechnology) e β -actin (ab8227, Abcam).

PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (*Applied Biosystems*), que é constituído por um par de oligonucleotídeos e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizadas as seguintes análises:

- | | | |
|-------------|-------------|---------------|
| - Gene IL6 | - Gene MCP1 | - Gene CitS |
| - Gene IL10 | - Gene IL1b | - Gene PEPCK |
| - Gene TNFa | - Gene UCP1 | - Gene G6PASE |

O gene *GAPD* (TaqManTM - *Applied Biosystems*) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPD* estava marcada com o fluoróforo VIC. Antes de iniciar o experimento de quantificação relativa da expressão dos genes acima foi feita a validação do sistema para os mesmos e para o controle endógeno (*GAPD*), para verificar se as eficiências de amplificação foram semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A

validação consiste na amplificação dos cDNAs das triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 3 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente, tanto com os oligonucleotídeos do gene de interesse quanto do controle endógeno. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação dos genes foram feitas triplicatas da amostra de cDNA de hipotálamo referentes aos tratamentos citados acima em 7 concentrações diferentes. Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir a amplitude de concentrações para as quais o sistema será eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores e a equação de reta na qual foi possível verificar o valor da inclinação desta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiveram mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações). Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 5µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 0,5µL da solução de oligonucleotídeo e sonda, 0,5µL de água e 4,0µL de cDNA. Os ciclos utilizados no termociclador foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram

obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software (Applied Biosystems)*.

Consumo de O₂ e produção de CO₂. O consumo de O₂, produção de CO₂ e Quociente Respiratório (RQ) foram determinados através do analisador de gases *LE405 Gas Analyser (Panlab – Harvard Apparatus)*. Os animais foram manipulados e adaptados nas câmaras do analisador de gases uma 3 dias antes das mensurações, durante um período de 30 minutos por dia. Para análise do consumo de O₂ e produção de CO₂ o ar foi direcionado a uma coluna contendo ascarite e gel sílica para remoção do CO₂ e da água, respectivamente, antes de chegar a um distribuidor com múltiplas saídas, o qual divide o fluxo total em quatro canais (um para cada animal). O fluxo de ar de cada respirômetro é periodicamente checado por um fluxímetro modelo *Air Supply & Switching (Panlab – Harvard Apparatus)* para detecção de oscilações menores que 1% durante as medições. Cada um dos 4 canais de fluxo alimenta um respirômetro, sendo que um deles faz tomadas do ar ambiente, como referência basal. Os dados coletados são analisados através do *software Metabolism 2.2v*. Antes do início do experimento, os animais foram estabilizados nas câmaras durante 30 minutos. As análises foram realizadas em um período de 24 horas, com fluxo de ar de 0,6L/min (para camundongos de aproximadamente 30g). Os VO₂ e VCO₂ são calculados pelo programa *Metabolism 2.2v* baseados na equação de Withers e são expressos como mL.h⁻¹.g⁻¹. O quociente respiratório (QR) será calculado como VCO₂/VO₂.

Histologia de fígado. Cortes histológicos de 5 µm fixados em parafina foram hidratados e corados por meio das técnicas de Hematoxilina-Eosina e OilRed. As imagens foram capturadas em microscópio LEICA DM4500B utilizando o software LAS 3.6V.

Análise estatística. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Quando comparados dois grupos, foi utilizado teste *t de Student* para dados não pareados. Quando necessário, foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido de teste *pos-hoc de Tukey* para comparação múltipla de médias. Foi adotado o nível de significância P<0,05.

7.3 RESULTADOS ADICIONAIS

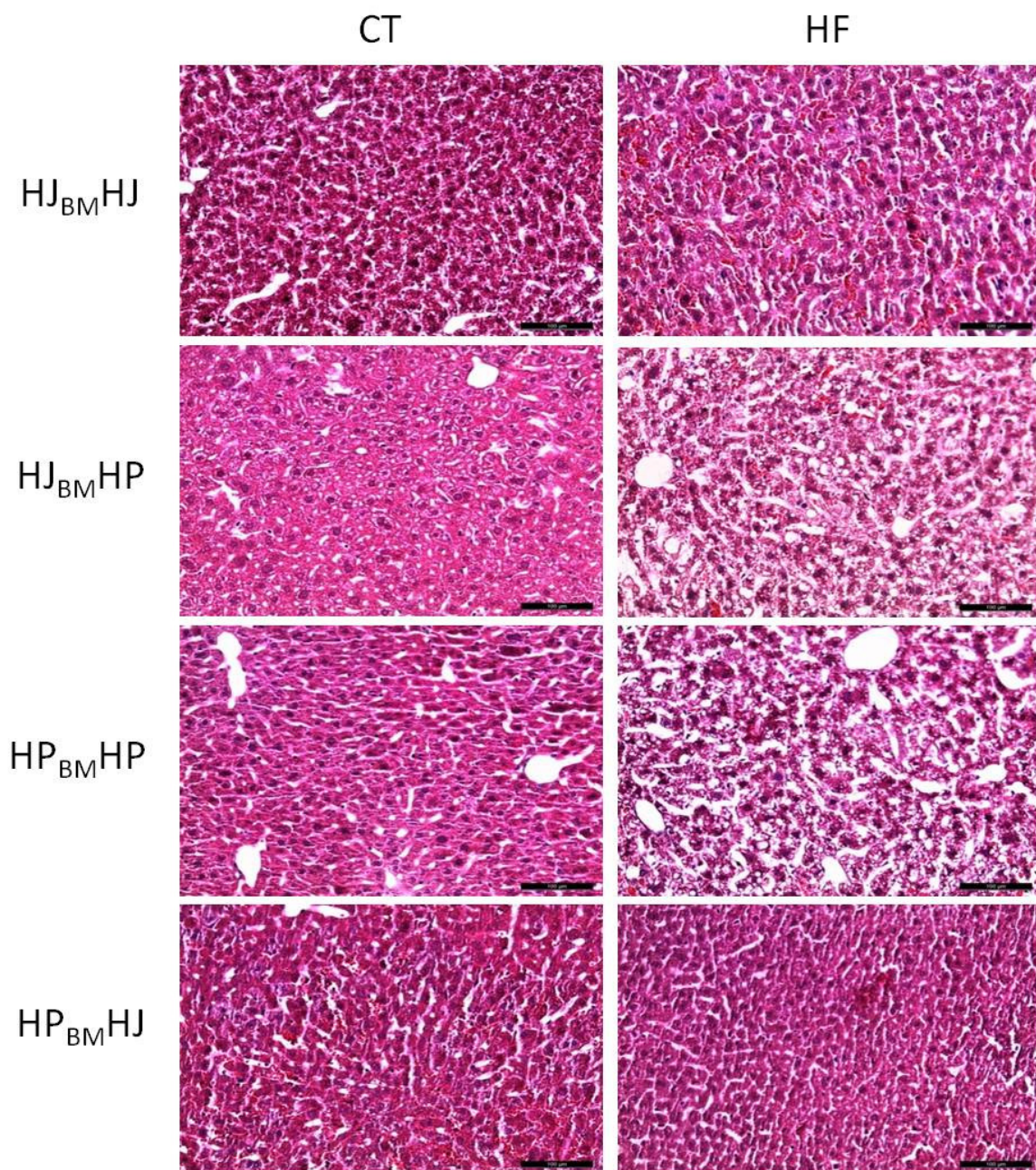


Figura 1: Hematoxilina-Eosina (HE) em fígado. Coloração por hematoxilina-eosina no fígado dos grupos de animais transplantados. HJ_{BM}HJ: autotransplante mutante; HJ_{BM}HP animais mutantes que receberam medula selvagem; HP_{BM}HP: autotransplante selvagem; HP_{BM}HJ animais selvagens que receberam medula mutante; CT: dieta controle; HF: dieta hiperlipídica. Aumento de 200X.

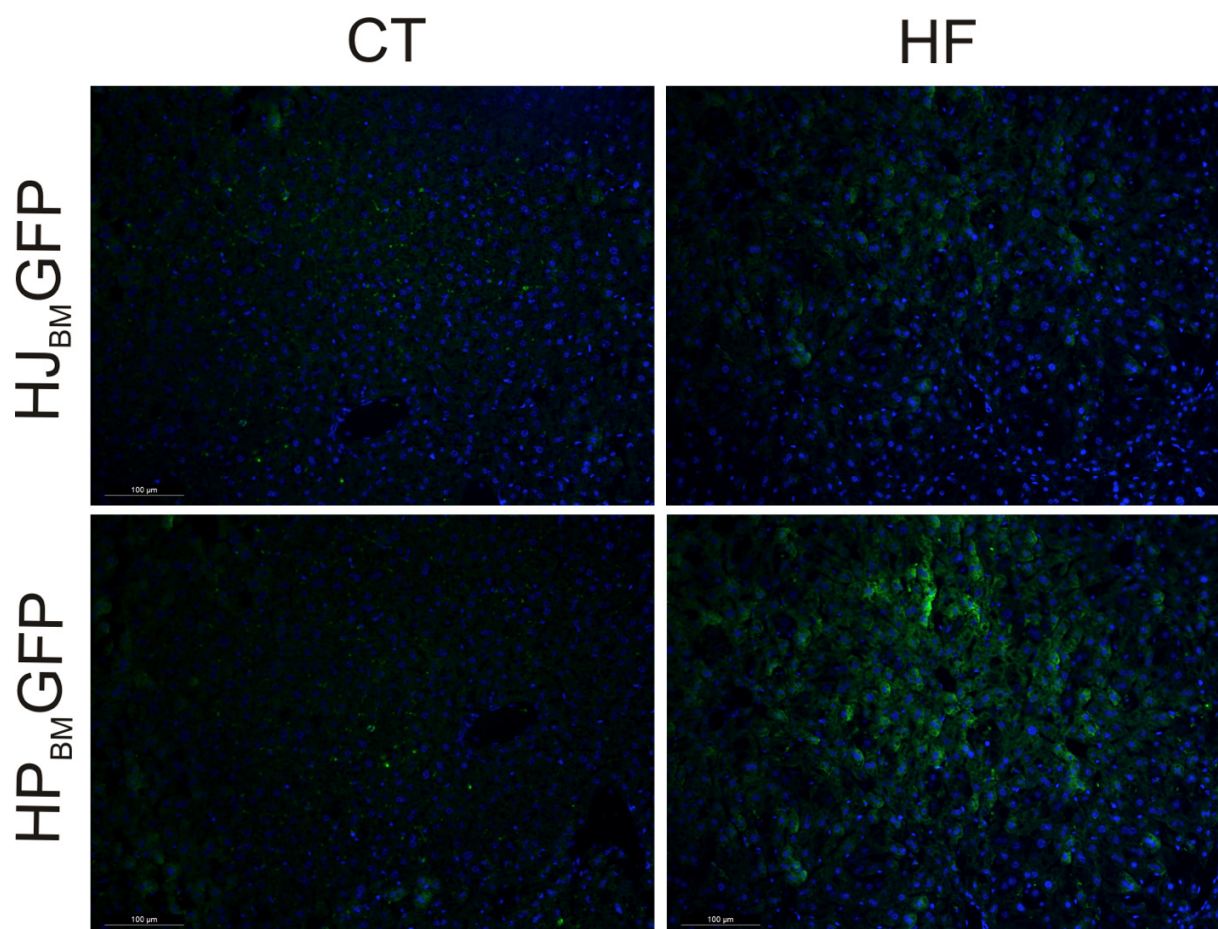


Figura 2: Migração de células GFP para o fígado. Os animais HJ ou HP foram radioimunoablados com fonte de cobalto 60 na dose de 8gy. A fonte de cobalto foi direcionada somente para o corpo, protegendo o SNC. As células da medula óssea foram coletadas a partir do fêmur de animais doadores GFP e injetadas nos receptores pela veia caudal. Após o transplante, os animais receptores passaram a expressar o fenótipo dos animais doadores, conforme os grupos ilustrados acima. Em azul o marcador nuclear DAPI; em verde as células GFP positivas que migraram para o fígado, confirmando a eficiência do transplante e a infiltração de células provenientes da medula óssea dos animais doadores.

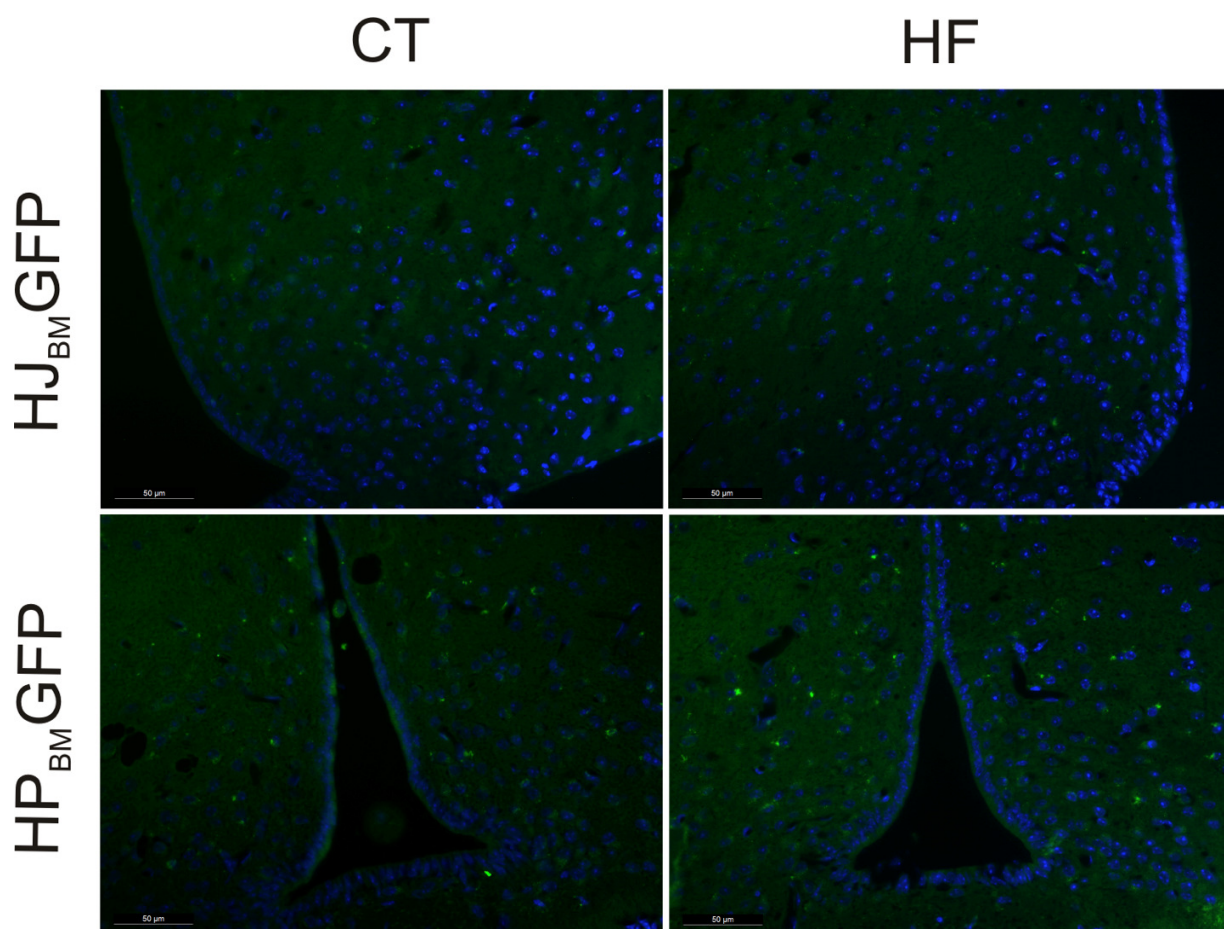


Figura 3: Migração de células GFP para o hipotálamo. Os animais HJ ou HP foram radioimunoablados com fonte de cobalto 60 na dose de 8gy. A fonte de cobalto foi direcionada somente para o corpo, protegendo o SNC. As células da medula óssea foram coletadas a partir do fêmur de animais doadores GFP e injetadas nos receptores pela veia caudal. Após o transplante, os animais receptores passaram a expressar o fenótipo dos animais doadores, conforme os grupos ilustrados acima. Em azul o marcador nuclear DAPI; em verde as células GFP positivas que migraram para o hipotálamo. Este experimento confirma que as células provenientes da medula óssea migram através da barreira hematoencefálica, uma vez que a fonte de cobalto foi direcionada somente para o corpo, protegendo o SNC da irradiação e excluindo a possibilidade de migração de células provenientes da medula óssea de doadores devido à perda da integridade da barreira hematoencefálica.

HP_{BM}HP - DXA Results Summary

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)	
Global	13,245±0,318	1,385±0,063	0,105±0,002	
Region	Fat Mass (g)	Lean+BMC (g)	Total Mass (g)	% Fat
Global	14±0,282	21,9±1,979	35,85±1,626	39,1±2,687

HJ_{BM}HP - DXA Results Summary

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)	
Global	12,6±0,410	1,375±0,049	0,109±0,000	
Region	Fat Mass (g)	Lean+BMC (g)	Total Mass (g)	% Fat
Global	14,8±0,989	20,5±1,272	35,3±0,282	41,95±3,181

Figura 4: Análise de gordura corporal por densitometria óssea. Os animais HP ou HJ foram radioimunoablados com fonte de cobalto 60 na dose de 8gy. As células da medula óssea foram coletadas a partir do fêmur de animais doadores e injetadas nos receptores pela veia caudal. Após 8 semanas de dieta hiperlipídica os animais passaram pelo exame de densitometria óssea com o aparelho modelo Discovery Wi (S/N 83901). Os dados de densitometria óssea corroboram os resultados observados de ganho de peso para os grupos HP_{BM}HP e HJ_{BM}HP após 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica.