



CARLA EVELYN COIMBRA NUÑEZ

*DEFECTIVE REGULATION OF ADIPOSE TISSUE
AUTOPHAGY IN OBESITY*

REGULAÇÃO ANÔMALA DA AUTOFAGIA EM TECIDO
ADIPOSO NA OBESIDADE

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

CARLA EVELYN COIMBRA NUÑEZ

**DEFECTIVE REGULATION OF ADIPOSE TISSUE
AUTOPHAGY IN OBESITY**

Orientador (a) / Supervisor: Prof^ª. Dr^ª. Eliana Pereira de Araújo

Co-Orientador/Co-Supervisor: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

**REGULAÇÃO ANÔMALA DA AUTOFAGIA EM TECIDO
ADIPOSO NA OBESIDADE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

*Doctoral Thesis presented to the Internal Medicine
Posgraduate Program of the Faculty of Medical Sciences, State
University of Campinas, for obtainment of the Ph.D. degree in Medical
Sciences, specialization in Internal Medicine.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO/ TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA CARLA EVELYN COIMBRA NUÑEZ E
ORIENTADO PELA PROF^ª. DR^ª. ELIANA PEREIRA
DE ARAÚJO.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

N922r Nuñez, Carla Evelyn Coimbra, 1979-
Regulação anômala da autofagia em tecido adiposo
na obesidade / Carla Evelyn Coimbra Nuñez. --
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Eliana Pereira de Araújo.
Coorientador : Lício Augusto Velloso.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estresse do retículo endoplasmático. 2.
Resistência à insulina. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Perda de
peso. 5. Autofagia. I. Araújo, Eliana Pereira de, 1965-. II.
Velloso, Lício Augusto, 1963-. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity.

Palavras-chave em inglês:

Endoplasmic reticulum stress

Insulin resistance

Diet, High-fat

Weight Loss

Autophagy

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Eliana Pereira de Araújo (Orientadora)

Everardo Magalhães Carneiro

Dennys Esper Corrêa Cintra

Tânia Cristina Pithon Curi

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Data da defesa: 28-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

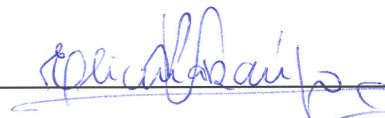
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CARLA EVELYN COIMBRA NUÑEZ

Orientadora PROFA. DRA. ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO

MEMBROS:

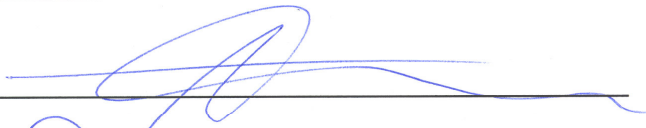
1. PROFA. DRA. ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO



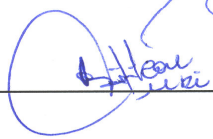
2. PROF. DR. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO



3. PROF. DR. DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA



4. PROFA. DRA. TÂNIA CRISTINA PITHON CURTI



5. PROFA. DRA. CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO



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

Data: 28 de fevereiro de 2013

*Dedico este trabalho a minha amada mãe, Yara, cujos ensinamentos
carinho e apoio tornaram este feito possível e àquele de quem guardo
minhas mais ternas lembranças e que me ensinou a valorizar o
conhecimento, meu avô Gerson (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Eliana Pereira de Araújo e co-orientador Lício Augusto Velloso pelas oportunidades, ensinamentos e pelos resultados de sua orientação em minha formação.

À Viviane Rodrigues pelas ricas e frutíferas discussões, dias e noites de trabalho no laboratório, mas também pelas conversas jogadas fora, pela amizade verdadeira e apoio em todos os momentos mais difíceis.

À Daniele Vitorino, Erika Anne Robles Roman, Fabiana Gomes e Rafael Pedro, pelo trabalho, pelas divertidas conversas e produtivas discussões e amizade.

À Bruna Bombassaro, Gerson Ferraz, Márcio Cruz, Rodrigo Moura e Sheila Victório pela colaboração e apoio.

À prof^a Mary Anne Heidi Dolder, pelo apoio fundamental na padronização da técnica de fixação do tecido adiposo para microscopia eletrônica.

A todos os voluntários, em especial aos colegas: Carina e Carolina Solon, Joseane Morari, Simone Van der Lee, Márcio Cruz, Lucas, Gabriela Souza, Dani, Adriana Torsoni, Ana Paula, Mara, José Maria, Lorena, Fabiana e André Protzek.

Aos colegas que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento, me tornando mais forte para minha caminhada.

Agradeço especialmente à minha amada família, meu eterno “Porto seguro”: Yara Lúcia, Marcos, Gerson e Celma (*in memoriam*), Selma, Márcio, Yara Helena, Déborah, Beatriz, Heitor, Brunna e Jhade.

Àqueles que me ofereceram um lar em Campinas: Cris, Vicente, Felipe e Carol, minha eterna gratidão.

Àqueles que mesmo não citados contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Unicamp pelo apoio e ao ensino público gratuito que tornaram possível minha formação acadêmica.

Ao **CNPq** e **Fapesp**, pelo apoio financeiro.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos”
Marcel Proust*

RESUMO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no organismo, podendo resultar em dano à saúde. Mudanças socioeconômicas, ocorridas nos últimos cinquenta anos têm contribuído para o aumento da prevalência da obesidade, a qual é hoje considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo. O acúmulo progressivo de ácidos graxos no tecido adiposo, e eventualmente, em outros sítios anatômicos não especializados na estocagem de energia sob a forma de gordura como, por exemplo, o fígado e o músculo, é associado à ativação de uma resposta inflamatória subclínica que desempenha papel importante na indução da resistência à insulina. Esta, por sua vez, é considerada o mecanismo fisiopatogênico unificador de uma série de doenças comumente associadas à obesidade, tais como o *diabetes mellitus*, a aterosclerose, a esteatohepatite não-alcoólica, entre outros. A inflamação subclínica desempenha um papel central na indução da resistência à insulina em obesos. Atualmente o estresse de retículo endoplasmático e a ativação da sinalização do TLR4 vêm sendo identificados como potenciais mecanismos ativadores da inflamação sub-clínica associada à obesidade. No ambiente intracelular a ativação dos sinais inflamatórios disparados por ambos, estresse de retículo endoplasmático ou TLR4, podem associar-se, modulando ou sendo modulado por outros eventos. Um desses eventos é a autofagia que se caracteriza como um processo celular finamente regulado e desempenha um papel importante no controle de várias funções da célula, tais como, reciclagem de organelas, disponibilidade de nutrientes e diferenciação celular. Um estudo recente demonstrou a existência de aumento na atividade autofágica em tecido adiposo de pessoas obesas e propôs a associação causal entre autofagia e resistência à insulina. A redução

da adiposidade é o mecanismo mais eficiente para reduzir a resistência à insulina em pessoas obesas. Entretanto, o impacto da redução de adiposidade sobre a regulação da autofagia no tecido adiposo não é conhecido. Neste estudo, a regulação da autofagia no tecido adiposo durante o emagrecimento foi observada em duas etapas distintas. Inicialmente, um modelo animal de obesidade induzida por dieta, submetido posteriormente, a restrição calórica de 40% durante quinze dias. Animais obesos alimentados *ad libitum*, apresentaram aumento dos marcadores de autofagia no tecido adiposo, o que foi revertido na restrição calórica. De forma diversa, a restrição ocasionou o aumento da autofagia nos animais magros. A reintrodução de alimentação *ad libitum* foi suficiente para reduzir a autofagia nos animais magros, mas não nos obesos, cuja supra-regulação da autofagia foi mais uma vez observada. Na segunda parte do estudo, autofagia foi avaliada em fragmentos de tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos selecionados para cirurgia bariátrica colhidos no ato da cirurgia e após um ano, aproximadamente. Foram incluídos no estudo nove pacientes obesos não-diabéticos e seis pacientes obesos diabéticos. Assim como no modelo animal, obesidade em humanos foi associada a um aumento dos marcadores de autofagia no tecido adiposo os quais foram reduzidos após a perda de peso. Assim, na vigência da obesidade ocorre uma regulação anômala da autofagia, estando aumentada durante alimentação *ad libitum* e reduzindo-se com a restrição alimentar.

ABSTRACT



Obesity, defined as abnormal or excessive fat accumulation that may impair life quality, is one of the major public health problems in modern world. It results from an imbalance between food intake and energy expenditure leading to the progressive accumulation of fatty acids in the adipose tissue and in some tissues that are not specialized in energy storage, such as liver and muscle. Insulin resistance is one of the main outcomes of obesity and is regarded as the main mechanism connecting diseases that are commonly associated with obesity, such as, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, non-alcoholic steatohepatitis, among others. Subclinical inflammation plays a major role in the induction of insulin resistance in obesity. Recently, endoplasmic reticulum stress and the activation of TLR4 signaling have been identified as potential triggering mechanisms for obesity-associated subclinical inflammation. At the intracellular environment activation of inflammatory signaling triggered by either endoplasmic reticulum stress or TLR4 signaling can integrate and modulate or be modulated by other cellular events. One such event is autophagy which is a highly regulated process that plays an important role in the control of a wide range of cellular functions such as organelle recycling, nutrient availability and tissue differentiation. A recent study has shown an increased autophagic activity in the adipose tissue of obese subjects, and a role for autophagy in obesity-associated insulin resistance was proposed. Body mass reduction is the most efficient approach to tackle insulin resistance in over-weight subjects; however, the impact of weight loss in adipose tissue autophagy is unknown. In this study we used a two-step approach to evaluate adipose tissue autophagy during body mass reduction. First, a mouse model of diet-induced obesity and diabetes was submitted to a fifteen-day, 40% caloric restriction. At base-line, markers of

autophagy were increased in obese mice as compared to lean controls. Upon caloric restriction, autophagy increased in the lean mice, while decreasing in the obese mice. The reintroduction of *ad libitum* feeding was sufficient to rapidly reduce autophagy in the lean mice and increase autophagy in the obese mice. In the second part of the study, autophagy was evaluated in the subcutaneous adipose tissue of nine obese-non-diabetic and six obese-diabetic subjects undergoing bariatric surgery for body mass reduction. Specimens were collected during the surgery, and approximately one year later. As in the mouse model, human obesity was associated with increased autophagy and body mass reduction led to an attenuation of autophagy in the adipose tissue. Thus, while caloric restriction leads to increased autophagy in the adipose tissue in lean subjects, in obesity, autophagy is defectively regulated, being increased during *ad libitum* feeding and reduced upon caloric restriction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1. Resposta a proteínas não-moldadas (UPR) 33

Figura 2. Etapas da formação da vesícula autofagia 37

Capítulo

Figure 1. Effect of caloric restriction on the expression of beclin in the visceral adipose tissue of mice 62

Figure 2. Effect of caloric restriction on the expression of autophagy and endoplasmic reticulum stress markers in the visceral adipose tissue of mice. 63

Figure 3. Transmission electron microscopy evaluation of autophagosomes in the visceral adipose tissue of mice 64

Figure 4. Effect of caloric re-feeding on the expression of autophagy proteins in the visceral adipose tissue of mice 65

Figure 5. Regulation of markers of endoplasmic reticulum stress during body mass reduction in subcutaneous adipose tissue of humans. 66

Figure 6. Regulation of markers of autophagy during body mass reduction in subcutaneous adipose tissue of humans 67

Table 1. Macronutrient composition of diets. 68

Table 2. Clinical and metabolic data of patients and controls. 69

Figura 3. Regulação do processo autofágico no Tecido adiposo 75

LISTA DE ABREVIATURAS

APG5 – Gene autofágico 5 “Autophagy gene 5”

APG12 – Gene autofágico 12 “Autophagy gene 12”

ATF-6 – Fator 6 ativador da transcrição “Activating transcription factor- 6”

ATF3 – Fator 3 ativador da transcrição “Activating transcription factor- 3”

ATF4 – Fator 4 ativador da transcrição “Activating transcription factor- 4”

Beclin-1 – “coiled-coil, myosin-like BCL2- interacting protein”

BMI – Índice de Massa Corporal “Body mass index”

bZIP – Zíper de leucina básica “Basic leucine zipper”

CHOP/GADD153 – Proteína homóloga ao C/EBP “C/ EBP homologous protein”/ Transcrito 3 induzido pelo dano ao DNA “DNA damage inducible transcript 3 - Ddit3”

CREBH – “cyclic AMP-responsive element binding protein hepatocyte”

CREB3 – “cyclic AMP-responsive element binding protein-3”

CREB3L1 – “cyclic AMP-responsive element binding protein-3 like 1”

dL- decilitros

DM2 – *Diabetes mellitus* tipo 2

EIF2 α – Subunidade alfa do fator 2 de iniciação da tradução em eucariotos “Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha”

ERSE-I – Elemento responsivo ao estresse de RE I “ER stress-response element I”

ERSE-II – Elemento responsivo ao estresse de RE II “ER stress-response element II”

ERE – Estresse do Retículo endoplasmático

ERAD – Degradação associada ao RE “ER-associated protein degradation”

FOXO – “forkhead box O”

g – grama

GADD34 – Proteína induzida por dano ao DNA e parada de crescimento
“Growth arrest and DNA damage-inducible protein”

GRP78/BIP – Glucose-regulated protein of 78/ Binding immunoglobulin protein

IKK – inhibitory I κ B kinase

I κ B- I kappa B kinase

IMC – Índice de massa corporal

IR- receptor de insulina “ Insulin receptor”

IRS1 – Substrato 1 do receptor de insulina “ Insulin receptor substrate 1”

IRE1 α – Enzima 1 sequestradora de Inositol “Inositol requiring enzyme-1”

JNK – c-Jun NH2-terminal Kinase

kg- quilograma

kJ- quilojoule

LC3 – “Microtubule-associated protein 1(MAP1) light chain 3”

m- metro

m² - metro quadrado

mL – mililitro

mTOR – “mammalian target of rapamycin”

NF κ B – Fator nuclear kappa B “Nuclear factor kappa B”

ng – nanogramas

PERK – PKR-like ER protein kinase

PERK – PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase

pg – picogramas

RE – Retículo Endoplasmático

RIDD – regulated IRE1-dependent decay

TFEB- “transcription factor EB”

TLR4 – Receptor 4 semelhante ao “Toll” “Toll like receptor 4”

TNF- α – Fator de necrose tumoral α “Tumor necrosis factor α ”

TRB3 – “Tribbles homolog 3”

TRAF2 – Fator 2 associado ao fator de necrose tumoral “Tumor necrosis associated factor 2”

UPR – Resposta a proteínas não dobradas “Unfolded Protein Response”

UPRE – “UPR element”

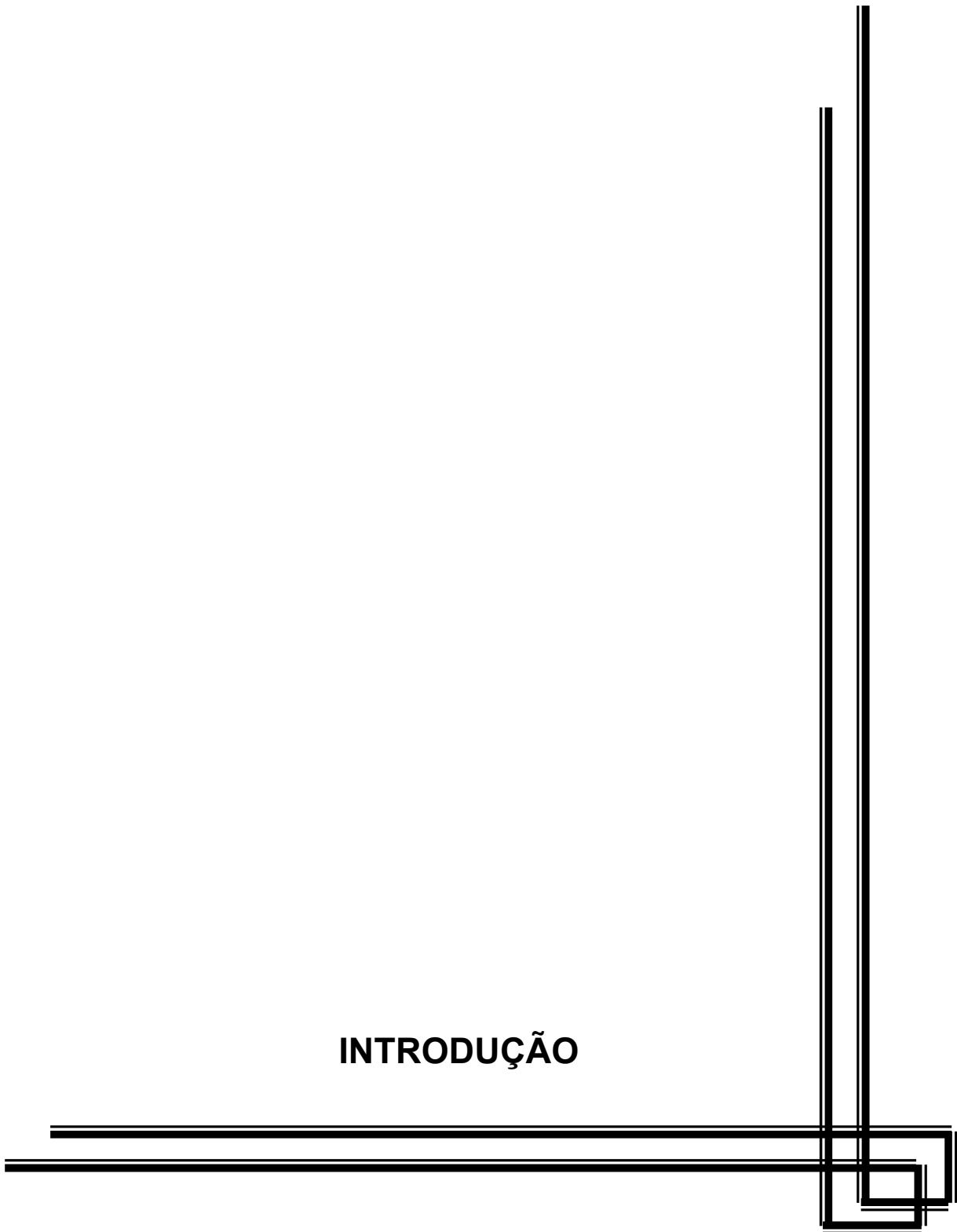
XBP1u – Proteína 1 ligante do domínio X “unspliced X-box binding protein-1”

XBP1s – “spliced X-box binding protein-1”

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT | xi |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... | xv |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xvi |
| INTRODUÇÃO | 20 |
| A obesidade e a Resistência à Insulina | 25 |
| O estresse de retículo endoplasmático..... | 28 |
| O estresse de retículo e a resistência à insulina..... | 34 |
| Autofagia..... | 35 |
| A autofagia e sua participação no controle metabólico da célula..... | 38 |
| A regulação da autofagia em tecido adiposo..... | 41 |
| HIPÓTESE..... | 41 |
| OBJETIVOS | 42 |
| CAPÍTULO | 44 |
| Artigo: “Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity.” | |
| DISCUSSÃO GERAL..... | 70 |
| REFERÊNCIAS | 76 |
| OBRAS CONSULTADAS..... | 85 |
| ANEXOS..... | 88 |
| ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido | 89 |
| ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM/Unicamp..... | 91 |
| ANEXO 3 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - | 92 |
| INSTITUTO DE BIOLOGIA/ UNICAMP..... | |
| ANEXO 4 – Autorização para reimpressão do artigo | 93 |

INTRODUÇÃO



Ao aumento da massa corporal acima de valores de corte previamente estabelecidos classifica-se o que, hoje, é considerado sobrepeso e obesidade (1)¹. Apesar desta limitada classificação antropométrica, a obesidade constitui-se, e é mantida por um emaranhado de alterações de ordem comportamental (2, 3), social e econômica (4) que resultam em um “ambiente obesogênico”² e pela susceptibilidade individual a este ambiente determinada por fatores genéticos (5).

A obesidade, que é determinada pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura, é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública no mundo. De acordo com a OMS, em 2008 mais de 200 milhões de homens e aproximadamente 300 milhões de mulheres eram obesos (6). Se compararmos aos dados de 1980, o aumento na prevalência foi de mais de duas vezes (7).

Não obstante, os números para prevalência de sobrepeso são ainda mais alarmantes, chegando à cerca de 1,5 bilhões de adultos em 2008 (6). Há que se considerar que as elevações no IMC, ainda que moderadas, associam-se a um maior risco de morte por qualquer causa, em relação aos indivíduos de peso normal. Nesse sentido observou-se aumento linear do risco a partir do IMC de 25 kg/m², que chegou a mais de três vezes em indivíduos com obesidade grau III (8).

¹ Valores baseados na fórmula: Índice de Massa corporal (IMC) = peso em Kg/altura (m)². Recomendados pela OMS (WHO): sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9) e obesidade: IMC >30. WHO, 1995.

² Do inglês: “*Obesogenic environment*”. Referência 5.

No Brasil, aproximadamente metade da população adulta apresentou excesso de peso em 2009, sendo 12% dos homens e 17% das mulheres obesos (9). Observou-se um aumento da prevalência de excesso de peso de quase três vezes em homens adultos e de quase duas vezes em mulheres adultas, desde 1974. Quanto à obesidade, o aumento foi de 4 e 2 vezes, para os sexos masculino e feminino, respectivamente no mesmo período (9), especialmente nas classes sociais menos favorecidas (10).

Apesar do grande interesse científico observado nas últimas décadas e do avanço no entendimento de seus mecanismos, a obesidade, cujo aumento na prevalência tem alcançado proporções epidêmicas, permanece como um problema a ser resolvido (11)³.

Projeções para os próximos anos indicam que, em 2030 um número próximo a 3,0 bilhões de pessoas, ou 58% da população adulta mundial, apresentará sobrepeso ou obesidade (7).

A obesidade tem crescido freneticamente em todo o mundo. A esse fenômeno de expansão global da obesidade têm-se atribuído o termo “Globesity”. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima o aumento da prevalência de sobrepeso para 74% e 67% e da obesidade para 40% e 22%, em mulheres e homens brasileiros, respectivamente, até 2015 (12)⁴

³ <http://www.cdc.gov/cdctv/ObesityEpidemic/>

⁴ <https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx>

Segundo Aitsi-Selmi et al.(4) o baixo nível socioeconômico e o início precoce do aumento de adiposidade aumentam o risco da perpetuação da obesidade ao longo da vida. Neste estudo, para uma coorte de 9.067 crianças nascidas na cidade de Ribeirão Preto-SP, acompanhadas por um período de 23-25 anos (1978/79 a 2002/2004), observou-se que a condição socioeconômica desfavorável na infância associa-se a maior adiposidade em mulheres na idade adulta e, de modo inverso, a uma menor adiposidade em homens também na idade adulta (4).

Uma série de estudos em famílias, incluindo estudos com gêmeos e crianças adotivas, demonstrou que fatores genéticos também exercem influência significativa sobre a massa corporal (13). Somente uma pequena fração dos casos de obesidade grave ocorre devido a mutações de um único gene. Para a grande maioria da população, a variação da massa adiposa resulta de complexas interações entre um grande número de variantes genéticas e fatores ambientais (13).

O estilo de vida da sociedade contemporânea, no qual predominam o consumo de dietas hipercalóricas ricas em gorduras saturadas e o sedentarismo é apontado como o principal responsável pelo rápido crescimento da prevalência de obesidade (2, 14, 15).

Se a eficiência em acumular energia favoreceu a sobrevivência em períodos de escassez de alimentos, nos dias atuais ocorre o inverso. A partir da revolução industrial, o estilo de vida de grande parte da população mundial vem sofrendo profundas modificações. Os avanços em cuidados sanitários, ciências e saúde pública, possibilitaram um aumento expressivo da expectativa de vida (16). Por outro lado, o maior acesso e o menor custo de alimentos

altamente processados, palatáveis e de grande valor calórico, aliada a um estilo de vida sedentário fizeram com que a prevalência de obesidade aumentasse em proporções alarmantes, ameaçando contrabalançar os ganhos obtidos (17).

No Brasil, essas mudanças gerais no “ecossistema de vida coletiva” (habitação, saneamento e utilização do sistema de saúde, por exemplo) e não melhorias na distribuição de renda são determinantes da transição nutricional. Caracterizada pela redução significativa da desnutrição, aumento progressivo da obesidade e do sobrepeso e permanência das anemias (18).

Por fim, o advento biológico comum a todos os possíveis fatores causais supracitados é o desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto de energia, resultando no acúmulo de gordura. Reduzir a ingestão é aparentemente uma solução simples e intuitiva, considerando alimentar-se como um ato voluntário. Entretanto, o insuficiente sucesso obtido na tentativa de conter o avanço da obesidade pode ser, em parte, explicado por evidências recentes que sugerem que o balanço entre a ingestão e o gasto de energia é de fato controlado por um complexo e poderoso sistema biológico, comandado pelo sistema nervoso central (SNC) (19). Falhas neste sistema podem levar ao surgimento e agravamento da obesidade (20).

Além de impor ao indivíduo um forte estigma social, a obesidade é um fator de risco importante para várias doenças, como *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, aterosclerose, doenças respiratórias, osteoartrose e alguns tipos de câncer, trazendo grande impacto à qualidade de vida e à longevidade da população (2).

A obesidade e a Resistência à Insulina

A resistência à insulina é definida como uma resposta biológica sub-ótima a uma determinada quantidade de insulina (21). O estado de resistência à insulina está ligado a diversas situações fisiológicas, tais como, o envelhecimento, a menopausa, a gestação e a puberdade (22-25). Está também associada a fatores ambientais como a vida sedentária, consumo de dieta hiperlipídica, o tabagismo e o uso de alguns medicamentos. Pode, ainda, surgir em decorrência de uma série de fatores genéticos. Entretanto, a condição que mais frequentemente se associa a resistência à insulina é a obesidade (10).

A resistência à insulina pode se instalar em maior ou menor grau em qualquer tecido. As repercussões de sua instalação são, contudo, melhor estudadas em tecidos diretamente envolvidos no controle metabólico, como o fígado, o tecido adiposo, o músculo esquelético e, mais recentemente, o hipotálamo (26). Uma vez instalada, a resistência à insulina é acompanhada de um estado compensatório de hiperinsulinemia. Dependendo da capacidade de resposta da ilhota pancreática, ocorrerá ou não falência na homeostase da glicose (27). Entretanto, mesmo na ausência do desenvolvimento de DM2, diversas outras doenças estão intimamente associadas à obesidade e à resistência à insulina, sendo as principais, a aterosclerose (28), a síndrome dos ovários policísticos (29), a hipertensão arterial e as dislipidemias (22).

Nos últimos vinte anos, obteve-se grande avanço na compreensão dos mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento da resistência à insulina (29). A ação da insulina depende da integridade molecular e funcional de seu receptor e de uma série de proteínas e moléculas de sinalização

intracelulares, responsáveis pela transdução de seu sinal. O receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) tem atividade tirosina quinase intrínseca, sendo rapidamente autofosforilado após a ligação do hormônio. A seguir, catalisa a fosforilação em tirosina de substratos intracelulares, sendo os substratos 1 e 2 do IR (IRS1 e IRS2) os mais bem caracterizados. Estes, por sua vez atuam como proteínas de conexão entre o receptor e efetores distais da via. Dentre os múltiplos mecanismos capazes de gerar resistência à insulina, identificados até o momento, a indução da fosforilação em serina do receptor de insulina e seus substratos parece ser a mais relevante. Esta fosforilação decorre principalmente, mas não exclusivamente, da ativação de proteínas inflamatórias intracelulares, as quais possuem atividade serina-quinase, sendo a JNK e a IKK as mais bem estudadas (30).

Os primeiros indícios a respeito da ativação de vias inflamatórias como mecanismos indutores da resistência à insulina surgiram há aproximadamente 20 anos quando se demonstrou que a citocina inflamatória TNF- α era capaz de reduzir a captação de glicose induzida por insulina (31, 32). Este efeito decorre da sua capacidade de ativar as serina-quinases relatadas acima (33).

A importância do efeito inibitório do TNF- α sobre a ação da insulina ganhou maior expressão com a descrição do aumento dos níveis desta, e de outras moléculas inflamatórias, na circulação de pacientes obesos (34).

Sabe-se hoje que a obesidade corresponde a uma condição inflamatória crônica subclínica, ou de baixo grau, onde há aumento da produção de fatores pró-inflamatórios pelo tecido adiposo. Tais fatores estão envolvidos na patogênese da resistência à insulina (35).

De fato, macrófagos recrutados para o tecido adiposo hipertrófico orquestram uma resposta inflamatória ainda não completamente caracterizada. Entretanto, tais achados resultaram na elaboração de novas questões, das quais a mais importante: qual mecanismo desencadeia o processo inflamatório presente na obesidade? (33).

De acordo com estudos realizados nos últimos dez anos, dois mecanismos surgem como os potenciais desencadeadores da resposta inflamatória da obesidade: a ativação da transdução de sinalização inflamatória através do receptor TLR4 do sistema imune inato; e, a indução de estresse de retículo endoplasmático (36). Ambos podem ser induzidos pelo principal fator ambiental capaz de levar à obesidade, qual seja, consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados. Além disso, ambos os mecanismos podem levar a ativação de vias inflamatórias intracelulares, inclusive JNK e IKK, que, como dito acima, desempenham importante papel na indução da resistência à insulina (36, 37).

Estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pela síntese de proteínas e lipídios. Estende-se por um volume superior a 50% do volume total na maioria das células eucarióticas e é capaz de expandir sua superfície em situações de estresse. Contudo, uma vez cessado o estímulo, retorna ao seu tamanho inicial por meio da autofagocitose (degradação da área expandida por meio da autofagia) (38).

O processo de dobramento e maturação de proteínas no RE é finamente controlado, contudo está sujeito às alterações em seu equilíbrio homeostático (39). Mudanças na homeostase do RE como depleção de Ca^{2+} , privação de energia, hipóxia e ativação da inflamação, dentre outras condições que culminam no acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE determinam uma condição denominada estresse de retículo endoplasmático (ERE) (40).

A obesidade associa-se ao ERE em humanos, tanto no tecido adiposo quanto no fígado. A perda de peso, por outro lado, resulta no decréscimo do ERE e na melhora da sensibilidade à insulina, sugerindo que este mecanismo esteja envolvido na regulação da ação da insulina em humanos obesos. Portanto, o controle do ERE pode ser um alvo importante para o tratamento das complicações metabólicas da obesidade (41).

Três sensores proximais do ERE foram identificados em mamíferos: Proteína 1 dependente de inositol “*Inositol requiring enzyme-1*” (IRE-1), “*PKR-like ER protein kinase*” (Perk) e “*Activating transcription factor-6*” (ATF6). Estes sensores, presentes na membrana do RE orquestram uma complexa resposta celular de sobrevivência à condição de estresse, denominada “Resposta a

Proteínas não dobradas”, do inglês “UPR-*Unfolded Protein Response*” (42), cujo mecanismo é resumidamente descrito na Figura 1.

A “*PKR-like protein Kinase*” (PERK) ou quinase pancreática da subunidade eIF2 α (PEK), ou ainda, proteína semelhante à proteína quinase ativada por RNA de dupla fita (PKR-like) quinase do retículo endoplasmático (PERK); é uma proteína serina/treonina quinase transmembrana tipo I. Assim, apresenta um domínio quinase, localizado em sua porção citoplasmática, sendo este o responsável pela fosforilação da subunidade alfa do Fator 2 eucariótico de iniciação da transcrição (eIF2 α) (40, 43- 45).

A fosforilação de eIF2 α , em serina 51 inibe a ativação do complexo ternário constituído por eIF2 β , reduz a tradução global (46, 43) e favorece a tradução de proteínas específicas, como o ATF4, um fator de transcrição com domínio bZIP. Este, por sua vez, induz a transcrição de ATF3 (*Activating transcription factor- 3*), TRB3 (*Tribbles homolog 3*) e GADD34 Growth arrest and DNA (*damage-inducible protein*), esta última com função na contra-regulação da fosforilação de eIF2 (39, 40).

Outro sensor do estresse, constituinte das vias canônicas de UPR é a “*Activating transcription factor 6*” (ATF6) (39, 36, 42). Esse fator de transcrição transmembrana zíper de leucina básica (bZIP) tipo II é o representante típico de uma família de proteínas responsivas ao estresse, recentemente identificada, que inclui os fatores de transcrição Luman (CREB3), Oasis (CREB3L1) e CREBH, que responde ao estímulo de citocinas e lipopolissacarídeos (LPS) no fígado, integrando o ERE às proteínas de fase aguda ao estimular a produção de amilóide sérico e proteína-C reativa (45, 47).

Tais proteínas apresenta um domínio transmembrana adjacente à região bZIP. O domínio de ativação de transcrição do ATF6 encontra-se na região N-terminal, voltado para o citoplasma, enquanto o domínio de ligação à chaperona GRP78/BIP, encontra-se na porção carboxi-terminal, no lúmen do retículo endoplasmático.

Não obstante à complexidade da sinalização de outros sensores, a existência de proteínas semelhantes ao ATF6 com distribuição tecidual e ativação distinta, sugere um refinamento maior no mecanismo de regulação da resposta ao estresse em mamíferos, dependente do tipo de tecido e estímulo, bem como da duração do estresse (47).

Em mamíferos, foram identificadas duas isoformas ATF6 α e ATF6 β , ambas sintetizadas como proteínas transmembrana do retículo e ambas ativadas por estresse (48). Apenas a ATF6 α é responsável tanto pela indução de chaperonas, quanto pela indução de componentes do ERAD em fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs), (49, 50).

Em condições não estressantes, a ATF6 permanece ligado à chaperona BIP na membrana do retículo, em sua porção *Golgi localization sequence site 1* (GLS1) (51). Sob o estímulo de ERE o domínio GLS1 luminal da ATF6 é desligado da chaperona BIP, enquanto o domínio GLS2 (*Golgi localization sequence site 2*) torna-se ativo e transloca a ATF6 para o complexo de Golgi por meio de vesículas COPII (52).

No complexo de Golgi a ATF6 é clivada por meio da “*site 1 protease cleavage site*” (S1P) e da “*site 2 protease cleavage site*” (S2P), liberando o fator de transcrição citosólico na membrana do Golgi. O fragmento ativado de

ATF6 migra para o núcleo e induz a transcrição de genes contendo UPRE, ERSE I e II ou elementos de resposta ao ATF/cAMP (CRE). (45, 53).

A ligação do ATF6 a estes elementos, isoladamente ou associada ao XBP-1 ativa um programa de aumento da capacidade de dobramento, controle de qualidade e liberação de proteínas do retículo, que inclui biogênese do ERE, síntese de fosfolípidios, produção de chaperonas e degradação de proteínas associadas ao retículo (ERAD) (40, 36, 47).

Dentre os sensores canônicos de ERE, o mais conservado é a IRE1, uma proteína transmembrana com um domínio serina/treonina-quinase e uma endoribonuclease (RNase) na porção citoplasmática (39, 47).

Em resposta ao ERE, a IRE1 α sofre oligomerização, de forma que os domínios quinase permaneçam justapostos e assim se auto-transfosforilarem, tornando o dímero ou trímero ativo (42).

Estudos recentes sugerem que de forma diversa à IRE1p (homólogo da IRE1 α em fungos) a IRE1 α é ativada pela liberação de sua ligação à chaperona BIP e não por ligação de peptídios não moldados à porção da proteína localizada no lúmen do retículo como ocorre em fungos (39).

Dentre os modelos propostos para explicar a sensibilidade da IRE1 ao ERE o mais aceito é o de competição e se aplica aos demais sensores canônicos (ATF6 e PERK). Neste modelo, baseado na Lei da ação de massas, o domínio luminal do sensor de estresse liga-se ao domínio de ligação ao substrato (SBD) da chaperona "*glucose-regulated protein of 78 kDA*" (GRP78) na ausência do ERE. Sob o estímulo do ERE, as proteínas não moldadas sequestram a GRP78 do sensor, deixando-o exposto à ativação (45).

A atividade endoribonuclease de IRE1 α cliva um segmento de 26 pares de base do RNA da “*X-box binding protein-1*” (XBP1), resultando na tradução da forma mais estável e potente indutora de genes alvo da UPR (54). Como resultado da excisão do íntron há uma substituição da região C-terminal da proteína XBP1 onde o domínio bZIP, liga-se ao domínio ativo. Contudo o mRNA não clivado continua sendo traduzido numa proteína menos estável e repressora dos genes alvo de UPR (55, 42). A forma não transformada da proteína XBP1u (unspliced X-box binding protein-1) atua como um regulador negativo do fator de transcrição ATF6, levando-o à degradação do mesmo no proteossoma (55).

A XBP1 liga-se ao elemento UPR (“*UPR element*” - UPRE) e aos elementos responsivos ao estresse (“*ER stress- response elements*” I e II - ERSE-I e ERSE-II) na região promotora de genes alvo (39). Tais genes são envolvidos na ERAD, biossíntese de lipídios, expansão do RE e da capacidade de dobramento de proteínas, conforme citado anteriormente (40, 36, 47).

Além do mRNA da XBP1 a IRE1 α também cliva uma série de outros mRNAs associados ao retículo num processo denominado RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*) o que lhe confere assim, adicionalmente ao seu papel na transcrição de proteínas do estresse, um caráter regulador da tradução de proteínas (39, 47).

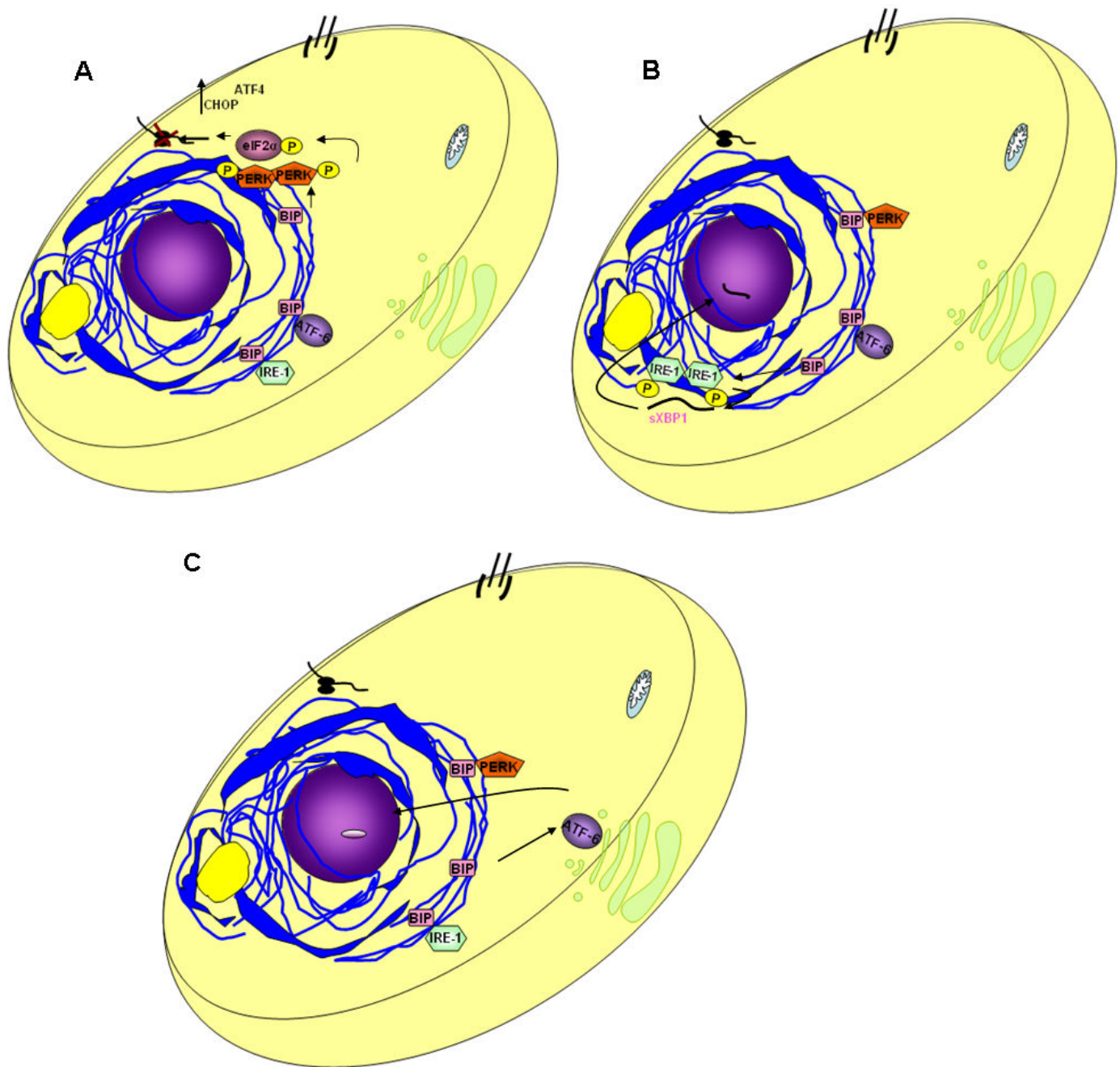


Figura 1. Resposta a proteínas não moldadas (UPR). **A-** PERK é deslocada de BIP, se dimeriza e se transfosforila, resultando na fosforilação de EIF2 α , haverá então a redução da tradução global e favorecimento da tradução de proteínas específicas como CHOP e ATF4. **B-** IRE1- α é deslocada de BIP, se dimeriza ou trimeriza e se transfosforila, promove a excisão do íntron do mRNA da XBP1, que irá então traduzir uma proteína potente indutora de genes alvo da UPR. **C-** A proteína ATF6 é deslocada de BIP e migra para o complexo de golgi, onde será clivada, liberando assim a porção fator de transcrição da proteína. PERK (IRE1PKR-like ER protein kinase); IRE1 α (Inositol requiring enzyme-1 α); XBP-1 (X-box binding protein-1); EIF2 α (eukaryotic translation factor 2 alpha); CHOP(C/ EBP homologous protein); BIP(Binding immunoglobulin protein); ATF-6 (Activating transcription factor- 6); ATF4(Activating transcription factor- 4). Adaptado de Gregor e Hotamilisgil 2007(36); Ron,2007(42); Harding1999(43); Harding,2000(44); Parmar e Schröder,2012(45); Shi,1998(46); Shen 2002(51); Shindler e Schekman, 2009(52); Ye,2002(53); Sidrauski e Walter, 1997(54).

O estresse de retículo e a resistência à insulina

A UPR é um elemento chave na coordenação da resposta metabólica, afeta a liberação de insulina pelas células beta-pancreáticas, deposição de lipídios e liberação de glicose pelo fígado, bem como a liberação de citocinas no tecido adiposo. No hipotálamo, a ativação do ERE pode ocorrer em virtude do aumento dos ácidos graxos e citocinas circulantes. Assim, o ERE e sua pronta resposta, a UPR, permeiam a comunicação entre os diversos órgãos e age como sensor do estado nutricional (47).

Foi demonstrado que o ERE leva à ativação da “*c-Jun NH2-terminal kinase*” (JNK), que por sua vez fosforila o substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) em serina 307 (56) ocasionando a redução da sinalização da insulina em camundongos obesos. Além disso, tanto a quinase IRE1 α quanto a PERK são capazes de ativar o Fator Nuclear Kappa B (NF κ B) e assim levar ao aumento da liberação de fatores inflamatórios, dentre eles o TNF α , que por sua vez levam à redução da fosforilação do receptor de insulina, bem como do IRS1 (31, 57). Esta última quinase, por meio da fosforilação de EIF2 α , reduz a tradução do regulador de NF κ B, I κ B, liberando assim, a transcrição de seus genes alvo no núcleo (36). A IRE1 α , sob o estímulo do ERE, interage com TRAF2 (fator 2 associado ao receptor de TNF- α) e recruta a quinase de I κ B, IKK que irá fosforilar e degradar o I κ B, resultando na ativação do NF κ B (39, 58).

Assim, o ERE emerge como um mecanismo implicado na gênese da resistência à insulina e conseqüentemente do diabetes mellitus tipo 2 que frequentemente se associa ao quadro de obesidade (59).

Autofagia

O termo autofagia é usado genericamente para referir-se à macroautofagia, que pode ser definida como um processo evolutivamente conservado em células eucarióticas, controlado fisiológica- e imunologicamente (60), no qual o conteúdo citoplasmático é capturado em uma vesícula de dupla membrana e conduzido ao lisossomo para degradação (61, 62).

Além deste, foram descritos dois outros tipos de degradação lisossomal a autofagia mediada por chaperona (CMA) e a microautofagia, estes menos estudados que o primeiro e consistem na degradação seletiva de proteínas e simples invaginação da membrana lisossomal, englobando o conteúdo citoplasmático, respectivamente (63).

A macroautofagia (a qual será chamada de autofagia no contexto desta Tese) foi primariamente relacionada à simples eliminação de proteínas de meia vida longa e organelas disfuncionais. Contudo, tem sido demonstrado que este processo apresenta função primordial em prover nutrientes e energia em resposta a estressores diversos além de quando ativada ou inativada de forma anômala, estar implicada no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, câncer, envelhecimento, resposta imune e, mais recentemente, em processos metabólicos associados à obesidade (62, 64-66).

A autofagia pode resultar em efeitos diversos ou mesmo opostos, nos diferentes tipos celulares, por exemplo, em cultura de células a autofagia pode prover nutrientes promovendo a sobrevivência e, paradoxalmente, levar à indução de apoptose (67).

Inicialmente identificado em fungos, o processo autofágico, apresenta-se amplamente conservado em mamíferos pode ser dividido em três etapas: a iniciação ou isolamento, a nucleação e a elongação/fechamento (66).

O processo de iniciação da autofagia, sob privação de nutrientes, é ativado por meio do complexo ULK1/2, ATG3, FIP200 e ATG101 (6466). A ULK1, que em condições de abundância de nutrientes, encontra-se hiperfosforilada por mTOR (68), quando é defosforilada transloca o complexo ou as estruturas a ele ligadas do citosol para o RE, (Figura 2A). Esse evento leva ao recrutamento do complexo de classe III fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI(3)K) que inclui VPS34 ou “*class III phosphatidylinositol-3-OH kinase*” PI3KC3, VPS15, ATG14, Ambra1 e Beclin-1 ATG101 para o RE (69) que são responsáveis pelo processo de nucleação (66), (Figura 2 B),

O complexo PI(3)K libera fosfatidilinositol-3-fosfato de membrana (PtdIns(3)P) que por sua vez, recrutam efetores como as proteínas das famílias “*double FYVE-containing protein 1*” (DFCP1) e “*WD-repeat domain phosphoinositide-interacting*” (WIPI). A primeira é amplamente difundida no RE e no Golgi, e de forma dependente de PtdIns(3)P é translocada para o sítio de formação do autofagossomo gerando estruturas semelhantes à Ω , denominadas omegassomos. A WIPI atua distalmente à DFCP1 promovendo o desenvolvimento dos omegassomas em membranas de isolamento ou autofagossomos (69).

O terceiro passo chamado elongação ou fechamento é dependente de dois sistemas semelhantes à ubiquitina, o primeiro Apg12 (ou Atg12), produzido por meio da ATG7 (*E1-like*) e ATG10 (*E2-like*), onde o complexo Apg5-Apg12 funciona como unidade que se complexa ao ATG16L (70) e é

essencial para o recrutamento da “*microtubule-associated protein 1 (MAP1) light chain 3*”, LC3 (ortólogo da APG8 de fungos) (71). O segundo processo “*ubiquitin-like*” essencial para a elongação é o de conjugação de fosfatiletanolamina à LC3, onde atuam a ATG7 como uma “*E1-like*” e a ATG3 como uma “*E2-like*” (69, 70) (Figura 2 C).

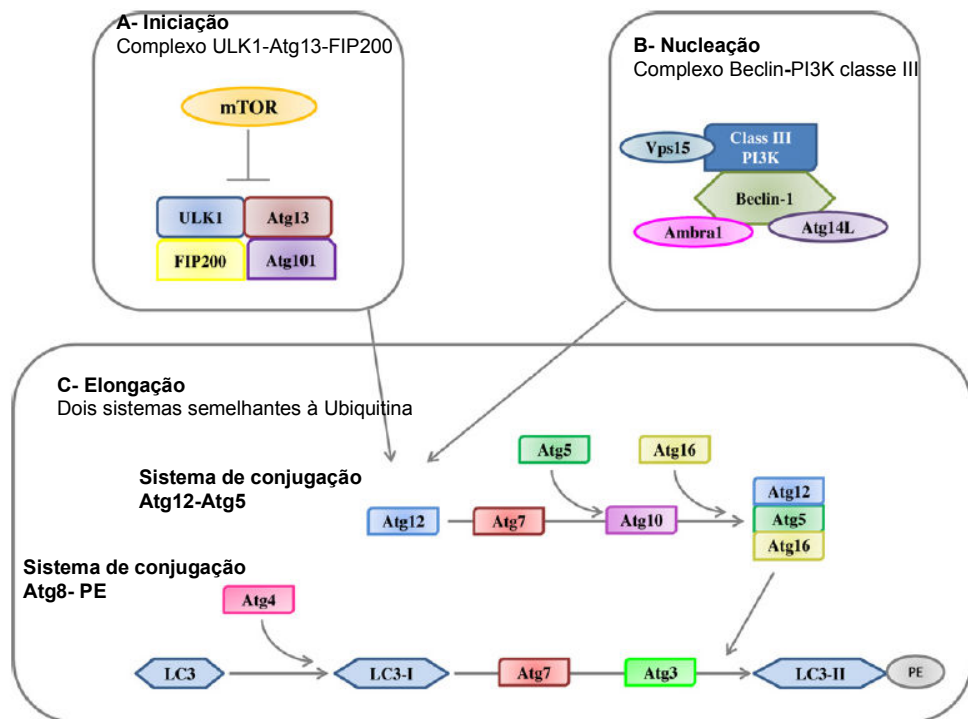


Figura 2. Etapas de formação da vesícula autofagia. A- Iniciação, B- Nucleação e C- Elongamento. Adaptado de Lavallard, 2012 (66).

A autofagia e sua participação no controle metabólico da célula.

Dentre as vias metabólicas que regulam a autofagia a principal é a da insulina-PI3K-PKB-mTOR, cuja ativação regula negativamente esse processo (66). A identificação de novas vias capazes de modular a autofagia vem crescendo rapidamente, dentre elas duas distais à AMPK, a da proteína “*extracelular signal regulated kinase*” ERK e a da P38-MAPK, bem como a proteína supressora de tumor p53 e a quinase induzida por estresse JNK1, atuam na regulação da autofagia em resposta ao “*status*” energético (72).

O processo autofágico é regulado por uma série de eventos em curto e longo prazo, os eventos de curto prazo incluem a liberação de beclin-1 de sua ligação à Bcl2/BclxL (por meio de: I - fosforilação da Bcl2 via JNK1; II - competição de outras proteínas contendo domínio BH3 como a BNIP3 e BAD; e, III - degradação da BCL2). Outros eventos reguladores de curto prazo são a presença de aminoácidos, o estado energético, espécies reativas de oxigênio (ROS), ERE, e estado de acetilação/deacetilação. Os processos implicados na regulação em longo prazo são mediados por FOXO e TFEB (66).

Em tecidos metabolicamente importantes, o decréscimo da autofagia durante o envelhecimento, pode contribuir para o concomitante aumento da incidência de desordens relacionadas à idade (73). Neste contexto, é interessante notar que a autofagia é capaz de regular a esteatose hepática, o desenvolvimento do tecido adiposo, a resistência à insulina, exercer papel protetor em células beta e até mesmo participar do controle da ingestão de alimentos (66).

No fígado, durante a privação de nutrientes, a autofagia é capaz de regular os estoques intracelulares de lipídios. Camundongos em dieta

hiperlipídica mostram redução da associação de vacúolos autofágicos aos estoques de gorduras no fígado em resposta a restrição alimentar. Ademais, a inibição da autofagia aumenta os triglicerídeos e o tamanho dos depósitos de gordura hepáticos *in vitro* e *in vivo* e de forma recíproca, o aumento do conteúdo citoplasmático de gordura pode regular negativamente a autofagia (74). A resistência à insulina hepática, na vigência da obesidade, é associada ao aumento da expressão de mediadores inflamatórios e acúmulo maciço de lipídios nos hepatócitos. Assim, tanto a redução da autofagia no fígado pode levar a uma piora da esteatose hepática quanto à resistência à insulina pode ocasionar a redução da autofagia no mesmo tecido (74).

Foi demonstrado por dois grupos independentes que, no tecido adiposo, a autofagia é capaz de regular a massa e a diferenciação dos adipócitos. A deleção do gene *atg7* especificamente no tecido adiposo promove um perfil de camundongo magro, com aumento da sensibilidade à insulina e resistência à obesidade induzida por dieta. Os adipócitos mutantes apresentam características do tecido adiposo marrom, aumento de beta-oxidação e redução dos índices de lipólise induzida por hormônio (75, 76).

Por outro lado observa-se aumento da autofagia nos adipócitos de pacientes obesos com diabetes tipo 2 (77). Portanto, de forma contrária ao que ocorre no fígado, a redução da autofagia no tecido adiposo parece favorecer um fenótipo de proteção contra a obesidade e de sensibilização à insulina.

A secreção de insulina é um processo dinâmico no qual este hormônio é constantemente produzido e degradado, mesmo que a concentração de glicose sanguínea não seja suficiente para a exocitose dos grânulos na superfície celular (78). Um estudo recente demonstra que a ausência do processo

autofágico leva à perda de função e diminuição da massa de células beta-pancreáticas em camundongos com deleção tecido-específica de atg7, resultando em reduzida secreção de insulina e, portanto, hiperglicemia (79).

Camundongos deficientes em Rab3A apresentam defeito na secreção, concomitante à biossíntese em níveis normais de insulina. O que poderia sugerir acúmulo, porém o conteúdo deste hormônio nas ilhotas é normal, o que se explica pelo fato de haver uma regulação positiva da degradação dos grânulos de insulina via autofagia. Sugerindo assim, que a autofagia tem um papel protetor nas células durante a desconexão entre síntese e a secreção deste hormônio (78).

Por fim, no sistema nervoso central foi observado que dependendo do tipo de célula, a autofagia pode coordenar uma resposta benéfica ou deletéria, com redução ou aumento da ingestão de alimentos, respectivamente. Assim, a redução da autofagia em neurônios POMC leva ao aumento da ingestão ao passo que o aumento da autofagia em neurônios AgRP leva a uma diminuição da ingestão (66).

A regulação da autofagia no tecido adiposo

Pouco se sabe sobre a regulação deste processo no tecido adiposo. A atividade autofágica é supra-regulada em condição de ERE, desencadeando assim, a degradação da adiponectina (80) e do receptor de insulina (81). Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que a supressão da autofagia ocasiona aumento do estresse de retículo e piora da inflamação no tecido adiposo hipertrófico, com aumento da liberação de citocinas pelos adipócitos (82, 83).

Considerando o aumento da autofagia no tecido adiposo do obeso (77) e que a redução do peso ocasiona redução concomitante do ERE (42), avaliar as alterações na expressão de marcadores de estresse de retículo e autofagia neste tecido na obesidade e após a redução do peso pode contribuir para o entendimento de como a autofagia é regulada neste tecido.

Hipótese

A autofagia é regulada de forma defeituosa no tecido adiposo hipertrófico do obeso

OBJETIVOS

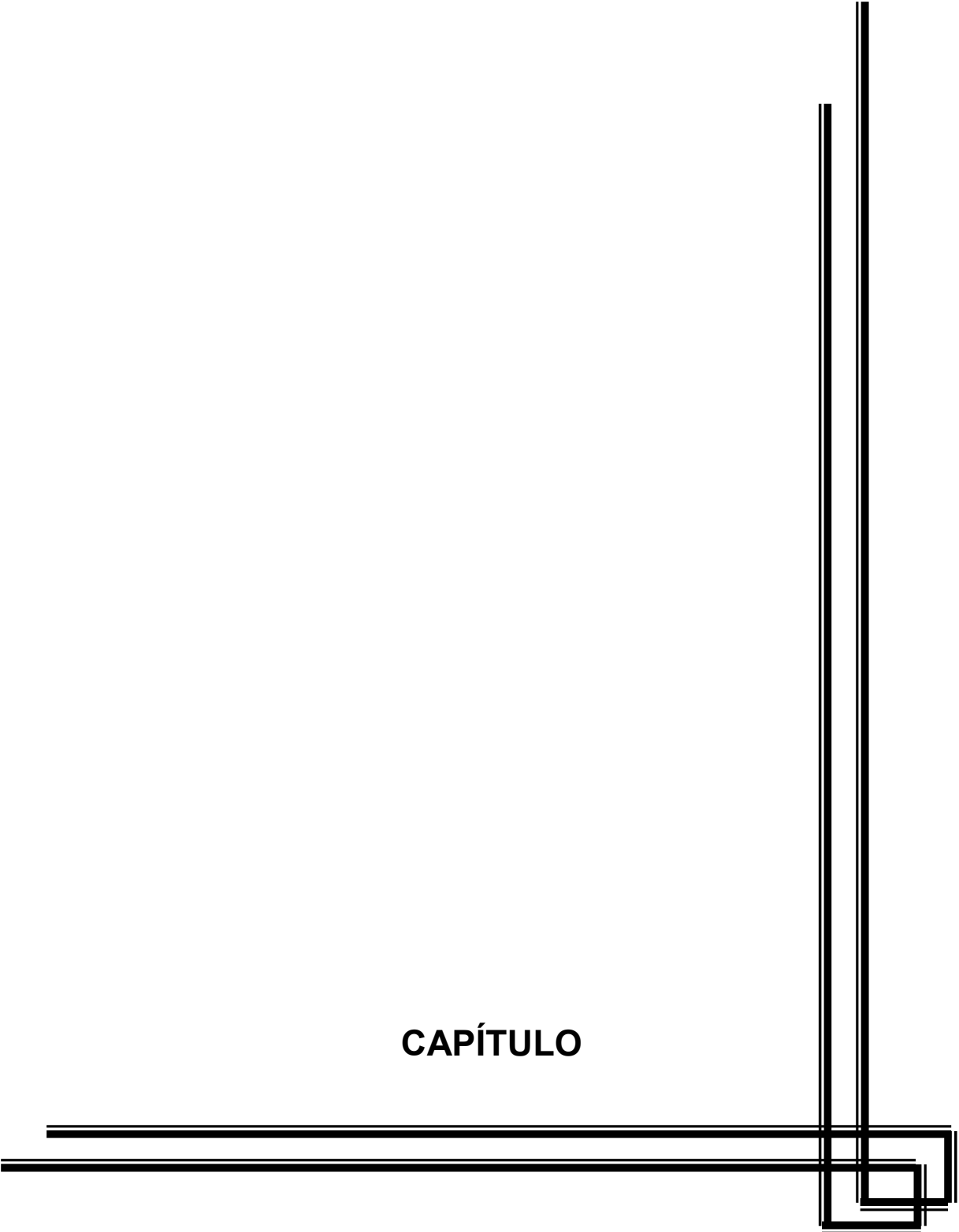
Objetivo Geral

Avaliar a expressão de marcadores de autofagia, ERE no tecido adiposo e inflamação sistêmica na presença de obesidade e após a redução de peso.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica, da restrição dietética assim como da reintrodução da dieta na indução de autofagia e ERE em tecido adiposo de camundongos Swiss.
- Avaliar a expressão de proteínas marcadoras de ERE e autofagia em amostras de tecido adiposo de pacientes obesos portadores de diabetes mellitus tipo 2 ou não, obtidos no momento e após cirurgia bariátrica para redução da massa corpórea.
- Avaliar as concentrações de proteínas marcadoras de inflamação no sangue de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no momento e após a cirurgia.

CAPÍTULO



Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity

Carla E. Nuñez¹, Viviane S. Rodrigues¹, Fabiana S. Gomes^{1,4}, Rodrigo F. de Moura¹, Sheila C. Victorio¹, Bruna Bombassaro¹, Eliton A. Chaim³, Jose C. Pareja³, Bruno Geloneze², Licio A. Velloso¹, Eliana P. Araujo^{1,4}

¹Laboratory of Cell Signaling, ²Laboratory of Investigation on Metabolism and Diabetes, ³Department of Surgery and ⁴Department of Nursing, University of Campinas, Brazil

The authors have no conflict of interest to declare

EPA is the corresponding author: Laboratory of Cell Signaling, University of

Campinas, 13084-761, Campinas SP, Brazil. Email: pa.eliana@gmail.com

International Journal of Obesity 2013 Mar 12 1-8

Received 24 August 2012; revised 19 January 2013; accepted 27 January 2013

DOI: 10.1038/ijo.2013.27

Abstract

Objectives. Autophagy is a highly regulated process that plays an important role in the control of a wide range of cellular functions such as organelle recycling, nutrient availability and tissue differentiation. A recent study has shown an increased autophagic activity in the adipose tissue of obese subjects, and a role for autophagy in obesity-associated insulin resistance was proposed. Body mass reduction is the most efficient approach to tackle insulin resistance in over-weight subjects; however, the impact of weight loss in adipose tissue autophagy is unknown. **Subjects.** Adipose tissue autophagy was evaluated in mice and humans. **Results.** First, a mouse model of diet-induced obesity and diabetes was placed into a fifteen-day, 40% caloric restriction. At base-line, markers of autophagy were increased in obese mice as compared to lean controls. Upon caloric restriction, autophagy increased in the lean mice, while decreasing in the obese mice. The reintroduction of *ad libitum* feeding was sufficient to rapidly reduce autophagy in the lean mice and increase autophagy in the obese mice. In the second part of the study, autophagy was evaluated in the subcutaneous adipose tissue of nine obese-non-diabetic and six obese-diabetic subjects undergoing bariatric surgery for body mass reduction. Specimens were collected during the surgery, and approximately one year later. Markers of systemic inflammation such as tumor necrosis factor-1 α , interleukin-6, interleukin-1 β were evaluated. As in the mouse model, human obesity was associated with increased autophagy and body mass reduction led to an attenuation of autophagy in the adipose tissue. **Conclusion.** While caloric restriction leads to increased autophagy in the adipose tissue in lean subjects, in obesity, autophagy is defectively regulated, being increased during *ad libitum* feeding and reduced upon caloric restriction.

Keywords: Beclin, p62, mTor, PERK, GPR78, CHOP

Introduction

Increased body adiposity is tightly linked to the development of insulin resistance and is the main independent risk factor for type 2 diabetes mellitus ¹. The progressive increase of fat deposition in the adipose tissue, and eventually in extra-adipose tissue sites, such as the liver, can lead to the activation of an inflammatory response, which ultimately, is the main mechanism connecting obesity to insulin resistance ². However, how inflammation is actually triggered in obesity is still a matter of investigation. Nutrient-induced endoplasmic reticulum stress is certainly an early and important event in the course of the activation of obesity-associated inflammation ^{3, 4}. During the unfolded protein response, inflammatory serine/threonine kinases can be activated to target elements of the insulin signaling pathway, resulting in defective insulin signal transduction ⁵. Recent studies have provided further advance in the field by demonstrating that anomalous regulation of macroautophagy (herein referred as autophagy) can, also, lead to the activation of intracellular inflammatory signaling and, thus, modulate the insulin signal transduction pathway ⁶. Autophagy is a biological process that is highly preserved during evolution, through which organelles and other components of the cell are compartmentalized within a double-membrane vesicle, the autophagosome, and undergoing degradation by lysosomal enzymes ⁷. Originally, autophagy served as a life-preserving process, providing nutrients from the cells own components ⁸. In single-cell organisms, this is indeed the main outcome of autophagy. However, as organismal complexity grew, the functions and consequences of autophagy expanded ⁸. It is currently accepted that, in multi-cellular organisms, besides its important role in providing nutrients during starvation, autophagy regulates a number of other processes such as protein synthesis and endoplasmic reticulum activity ⁹, inflammation ¹⁰, cell-cycling ¹¹ and apoptosis ¹².

A recent study has shown that autophagy is increased in the adipose tissue of obese patients¹³. The quantitative evaluation of markers of autophagy significantly correlated with the degree of adiposity, visceral fat distribution and mean adipocyte size¹³. In addition, it was suggested that autophagy is related to the degree of insulin resistance, but each one, autophagy and insulin resistance, develop as independent outcomes of obesity¹³.

From yeast to mammals, caloric restriction is capable of inducing the activation of the autophagic machinery^{14, 15}. However, as autophagy in the adipose tissue is already abnormally increased in obese subjects during the fed state, we asked how adipose tissue autophagy would be regulated under caloric restriction. For this, we evaluated adipose tissue autophagy in mice on 40% caloric restriction and in obese humans undergoing bariatric surgery, which is known to produce a negative energy balance. As markers of autophagy, we evaluated beclin, mTor (mammalian target of rapamycin), p62 and the presence of autophagosomes. In addition, we evaluated markers of endoplasmic reticulum stress such as PERK (type I transmembrane endoplasmic reticulum resident protein), XBP1 (X-box binding protein-1), GPR78 (glucose-regulated protein-78) and CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein). Our results show that there is an anomalous regulation of autophagy in the adipose tissue in obesity.

Materials/subjects and methods

Human studies. All the patients (n = 15, female = 10) were selected for Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), based on the National Institutes of Health Consensus Statement criteria for bariatric surgery¹⁶. The criteria for selection of patients were; exclusion:

infectious or inflammatory disease, use of anti-inflammatory or psychotropic drugs and history of addiction or substance abuse; inclusion: women and men between 18 and 60 years of age who met the above-mentioned criteria for surgery. Clinical evaluation and determination of anthropometric, metabolic and inflammatory parameters were performed at baseline and approximately 12 months after surgery. Lean controls were selected amongst volunteers recruited at the University. For the patients, a fragment of the abdominal wall subcutaneous adipose tissue was obtained at base-line, during the surgery, and approximately one year later through a biopsy. The lean controls were submitted to an abdominal wall subcutaneous adipose tissue biopsy on the same occasion when anthropometric data and blood samples were obtained. The study was approved by the University of Campinas Ethics Committee and all the patients and controls signed an informed consent form.

Mouse model. Male Swiss mice were included in the study at 6 weeks of age. Initially, mice were randomly selected for *ad libitum* feeding on chow or a high-fat diet (HFD) (Table 1) for 12 weeks. In some experiments lean mice were fasted for 1-24 h. In order to achieve the correct period of fasting, mice were initially fasted overnight and at 8 am chow was reintroduced and left for 6 h. Subsequently, chow was withdrawn and mice were used in the experiments after the planned fasting period. In the second set of experiments, lean mice were placed into three or 15 days 40% caloric restriction, which was calculated after the evaluation of the means of caloric consumption in the five days preceding the beginning of the restriction period. In the third set of experiments, lean and obese mice were placed into 15 days 40% caloric restriction, which was always performed maintaining the mice on their original diets. Finally, in some experiments, lean and obese mice maintained for 15 days on 40% caloric restriction were returned to

ad libitum feeding on their original diets. The use of experimental animals in this study was approved by the University of Campinas Ethics Committee.

Determination of blood biochemistry and levels of cytokines and hormones. Fasting blood samples were collected at base-line and after one year and serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), adiponectin, leptin and insulin (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) were measured, according to the protocols suggested by the manufacturers. Blood biochemistry was evaluated by standard automated methods.

Tissue extraction and immunoblotting. Adipose tissue samples obtained from the patients or from the epididymal fat of mice were immediately homogenized in solubilization buffer at 4 °C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/mL] with a Polytron PTA 20 S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9,000 $\times g$ in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 4 °C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho[Thr 981]PERK (rabbit polyclonal, sc-32577), -CHOP (mouse monoclonal, sc-7351), or -GRP78 (rabbit polyclonal, sc-13968) antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-phospho[Thr183/Tyr185] JNK (mouse monoclonal, #9255), or -phospho[Ser2448] mTOR (rabbit polyclonal, #2971) antibodies, from Cell Signaling (Beverly, MA, USA); anti-beclin (rabbit polyclonal, ab16998), or -beta actin (rabbit

polyclonal, ab8227) from Abcam (Cambridge, MA, USA); anti-p62 (mouse monoclonal, 2C11) from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA); and anti-spliced-XBP1 (rabbit polyclonal, 143F) from Biologend (San Diego, CA, USA).

Transmission electron microscopy. Fragments of the adipose tissue obtained from the human subcutaneous tissue biopsies or mice epididymal fat were dissected and maintained overnight at 4°C in fixative containing 2.5% glutaraldehyde in cacodilate buffer 0.1 M (pH 7.2). The specimens were then trimmed, dehydrated and embedded in Durcupan (Fluka-Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). Ultrathin sections were collected on formvar-coated copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Tecnai G2 Spirit Twin transmission electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA). Images were acquired using a Gatan Orius SC1000B camera (Pleasanton, CA, USA). Autophagosomes were detected as suggested elsewhere¹⁷ and counted in 1.0 x 1.0 µm fields.

Data presentation and statistical analysis. Specific bands in immunoblots were scanned and submitted to quantitative analysis using the Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Representative bands obtained from each experiment are shown alongside with the quantitative results. In some experiments, we employed a ratio of the results obtained after calorie restriction and before calorie restriction, in mice studies; or, after surgery and before surgery, in human studies. By using this approach, the actual change in the expression of important markers is more clearly depicted; the value of 1.0 meaning no change; values smaller than 1.0 meaning reduction; and, values greater than 1.0 meaning increase after intervention. All these parameters and the PCR, transmission electron microscopy, biochemical, hormonal and inflammatory markers obtained from the animals and patients were analyzed by the Student's *t*-test or ANOVA, as appropriate.

Results

Long, but not short-term caloric restriction activates autophagy markers in the adipose tissue of lean mice. In order to define the optimal period of caloric restriction that activates autophagy in the adipose tissue, lean mice were fasted for up to 24 h (Fig. 1A) or placed into either three or 15 days 40% caloric restriction (Fig. 1B); the expression of beclin was then determined by immunoblot. No significant change in adipose tissue beclin expression was observed during 24 h of fasting (Fig. 1A). However, three or 15 days of caloric restriction resulted in an increased expression of beclin (Fig. 1B). As 15 days of caloric restriction resulted in a more pronounced increase in beclin expression, we defined 15 days as the period to be used in the remaining experiments with mice.

Improved metabolic parameters in caloric-restricted mice. Swiss mice fed on HFD presented increased body mass (Fig. 2A) and increased fasting blood glucose levels (Fig. 2B). Moreover, glucose handling was severely impaired, as determined by a glucose tolerance test (Fig. 2C) and by an insulin tolerance test (Fig. 2D). Mean caloric intake was increased in the HFD group (0.58 ± 0.09 vs. 0.79 ± 0.07 kCal/g.day, $p < 0.05$, for control and HFD, respectively). Fifteen days of 40% caloric restriction resulted in a reduction in body mass (Fig. 2A), fasting blood glucose levels (Fig. 2B), and area under the glucose curve during an intra-peritoneal glucose tolerance test (Fig. 2C). In addition, caloric restriction led to an increased glucose decay constant (Kitt) during and insulin tolerance test (Fig. 2D).

Partial correction of the expression of markers of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the adipose tissue of caloric-restricted mice. Obesity and insulin resistance resulted in the increased expression of markers of endoplasmic reticulum stress (CHOP) and inflammation (phospho-JNK) in the adipose tissue of mice (Fig. 2E-

G). Fifteen days of caloric restriction was sufficient to produce a return of CHOP (Fig. 2E and 2F) and phospho-JNK (Fig. 2E and 2G) expression to levels similar to those in lean mice. However, as compared to the *ad libitum* fed obese mice, this approach was not sufficient to significantly reduce the levels of either protein, as evaluated by the ratio between the level of respective protein after and before caloric restriction (Fig. 2H).

Abnormal regulation of markers of autophagy in the adipose tissue of obese mice. In lean mice, fifteen days of caloric restriction resulted in the altered expression of three distinct markers of autophagy, beclin, phospho-mTor and p62 (Fig. 2I-2L). In obese mice fed *ad libitum*, the expression levels of beclin and p62 were significantly higher, whereas phospho-mTor was lower than in lean mice fed *ad libitum* (Fig. 2I-2L). However, in obese mice upon caloric restriction, the expressions of beclin and p62 were significantly decreased, as compared to the *ad libitum* fed obese mice (Fig. 2I-2L). It is noteworthy that while in lean mice, caloric restriction resulted in an up to 2.5-fold increase in the expression of beclin and p62 (Fig. 2M), in obese mice, caloric restriction led to an up to 50% reduction in the levels of the same proteins (Fig. 2M). These results were further confirmed by transmission electron microscopy, which showed reduced presence of autophagosomes in the adipose tissue of calorie-restricted obese mice, as compared with calorie-restricted lean mice (Fig. 3A-3B).

Caloric re-feeding reactivates autophagy in the adipose tissue of obese mice. In order to evaluate the real impact of diet on the regulation of markers of autophagy in mice, both lean and obese mice were placed into a fifteen-day 40% caloric restriction, and then returned to *ad libitum* feeding on their original diets for ten days. In the obese mice, the return to *ad libitum* feeding resulted in increased fasting blood glucose levels (Fig. 4A), increased area under the glucose curve during an intraperitoneal glucose

tolerance test (Fig. 4B) and reduced constant of glucose decay during an insulin tolerance test (Fig. 4C). In parallel with the changes in metabolic control, re-feeding led to the increase in the expression of beclin and p62 in the adipose tissue of obese mice (Fig. 4D-4G). Conversely, in the lean mice, re-feeding resulted in the reduction of the expression of either beclin or p62 (Fig. 4D-4G). Again, it is noteworthy that, while an up to 80% reduction in the expression of markers of autophagy was observed in re-fed lean mice (Fig. 4G), in the obese mice re-feeding produced an up to 2.5-fold increase in the same proteins (Fig. 4G).

Changes in metabolic control and markers of inflammation following body mass reduction in humans. Body mass reduction obtained following RYGB was accompanied by an improved metabolic control in both non-diabetic and diabetic obese subjects, as determined by the reduction in body mass index and blood insulin and leptin levels (Table 2). In the subset of obese-diabetic patients there was also a significant reduction in fasting glucose and glycated hemoglobin levels (Table 2). In addition, body mass reduction resulted in the significant drop of blood levels of TNF- α and IL-1 β in the non-diabetic, but not in the diabetic obese subjects (Table 2).

Reduction in the expression of markers of endoplasmic reticulum stress in the non-diabetic, but not in the diabetic obese subjects, following body mass reduction. The protein expressions of three markers of endoplasmic reticulum stress, phospho-PERK, spliced-XBP1 and the chaperone, GRP78, were increased in the adipose tissue of both non-diabetic and diabetic obese subjects before RYGB, as compared to lean controls (Fig. 5A-5D). Following body mass reduction, significant decrease in the expressions of phospho-PERK, spliced-XBP1 and GRP78 were detected in the non-diabetic obese patients (Fig. 5A-5D). Conversely, in the diabetic obese patients, the reduction in body mass was not accompanied by a significant reduction in the expression of markers of

endoplasmic reticulum stress (Fig. 5A-5D). Thus, when comparing the ratio of the expression of phospho-PERK, spliced-XBP1 and GRP78 after and before body mass reduction, between non-diabetic and diabetic patients, a significant difference was always found (Fig. 5E-5G).

Body mass reduction is accompanied by a reduction in markers of autophagy in obese subjects. The expression of beclin was significantly increased in the adipose tissue of both non-diabetic and diabetic obese subjects before RYGB, as compared to lean controls (Fig. 6A-6C). Following body mass reduction, a significant drop in the expression of beclin was detected in both obese groups (Fig. 6A-6C). The presence of autophagy in the adipose tissue of obese patients before surgery could be further confirmed by transmission electron microscopy that allowed the identification (Fig. 6D) and quantification (Fig. 6E) of autophagosomes, which were virtually absent in the adipose tissue of patients after body mass reduction.

Discussion

Recently, a defect in autophagic activity was identified in the liver of an experimental model of insulin resistance, and the correction of autophagy by genetic means was sufficient to restore the hepatic responsiveness to insulin, providing a causal link between defective autophagy and obesity-associated insulin resistance⁶. In addition, autophagy was shown to be abnormally increased in the adipose tissue of obese subjects and a correlation between autophagy, adiposity and adipocyte hypertrophy was established¹³. Remarkably, while a reduction of autophagy in the liver was related to insulin resistance⁶, the opposite occurred in the adipose tissue¹³, raising questions as to whether autophagy is anomalously regulated in the adipose tissue of obese subjects.

The present study was designed to evaluate markers of autophagy in the adipose tissue during body mass reduction in humans and mice, and to test the hypothesis that autophagy is defectively regulated in the hypertrophic adipose tissue. Upon high-fat feeding, Swiss mice, which are related to the diabetes prone AKR^{18,19}, became obese and diabetic and the adipose tissue expression of markers of endoplasmic reticulum stress and autophagy were increased. In lean mice, caloric deprivation resulted in a significant increase in the expression of markers of autophagy. Conversely, in the obese mice, caloric restriction reduced autophagy and this was related to the lack of nutrients as re-feeding rapidly increased autophagy markers again. Although the regulation of autophagy has not been previously studied in the adipose tissue of animal models of obesity, we expected, from the human studies^{13,20}, that it should be increased, as in fact it was. Some animal studies have shown that the genetic disruption of autophagy in the adipose tissue leads to a lean phenotype and protects against diet-induced obesity and insulin resistance^{21,22}. In addition, it was shown that autophagy is important for adipose tissue differentiation²³, which suggests that the increased activation of adipose tissue autophagy in obesity may be required for the expansion and growth of adipocytes. In fact, our results provide further support for this fact since the markers of autophagy were consistently regulated in concert with adiposity and nutrient availability, but not in parallel to changes in insulin sensitivity.

Similarly to our findings in mice and to the previously published human studies^{13,20}, our obese patients presented increased expression of markers of autophagy in the adipose tissue. In addition, in keeping with the findings in mice, body mass reduction resulted in the reduction of markers of autophagy in the adipose tissue of the patients.

Recent studies suggesting that defective regulation of autophagy could be one of the mechanisms linking caloric overload to insulin resistance^{6,24} prompted us to evaluate

markers of inflammation, endoplasmic reticulum stress and autophagy in obese non-diabetic in parallel with obese diabetic subjects. The reduction of adiposity was, as expected, very effective in promoting a reduction in the blood levels of insulin and leptin, which was accompanied, in the diabetes group, by reductions in fasting glucose and glycated hemoglobin levels. In the obese patients group two important markers of systemic inflammation, TNF- α and IL-1 β , underwent significant reductions after body mass reduction; however, in the diabetes patients group the changes in the blood levels of the cytokines were not significant. These results reinforce the findings of former studies showing that, while in obese non-diabetic patients the reduction in adiposity results in the rapid normalization of the levels of systemic markers of inflammation, in obese diabetic subjects this rectification is not the rule ²⁵⁻²⁸. Interestingly, in a similar manner, the markers of endoplasmic reticulum stress were completely corrected after body mass reduction in the obese non-diabetic patients, while in the diabetic patients there was only a tendency towards reduction.

With regard to autophagy, both diabetic and non-diabetic obese subjects presented normalization of the expression of its markers after body mass reduction. Thus, similarly to the mice studies, in humans, while markers of inflammation and endoplasmic reticulum stress always change in similar directions, markers of autophagy are more related to adipose tissue mass and caloric load. Only one previous study has evaluated the expression of markers of endoplasmic reticulum stress in obese patients following bariatric surgery ²⁹. As in our group of obese non-diabetic patients, body mass reduction resulted in the attenuation of endoplasmic reticulum stress ²⁹. No previous study evaluated changes in autophagy during body mass reduction.

According to studies in single-cell organisms, it is believed that autophagy has evolved as a mechanism for providing nutrients obtained from the cell's own organelles during

periods of starvation⁸. In multi-cellular organisms, this important function is preserved and autophagy is highly stimulated during nutrient deprivation¹⁵. However, in the adipose tissue of overfed humans and experimental animals this rule is apparently challenged¹³.

It is important to comment that our human studies evaluated subcutaneous and not visceral fat. It is well known that most of the adipose tissue inflammatory activity in obesity occurs in the visceral fat³⁰. It may happen that regulation of autophagy markers occurs differently in visceral fat, as compared to subcutaneous, however, as in the mice studies we employed visceral fat, we believe this possibility is somewhat weakened. Nevertheless, further studies studying the regulation of autophagy in visceral adipose tissue of humans will add important information to the field.

In conclusion, the main finding of the present study is the demonstration that obesity and caloric overfeeding can lead to the defective regulation of autophagy in the adipose tissue. In addition, the parallel evaluation of endoplasmic reticulum stress and autophagy in diabetic and non-diabetic obese subjects suggest that, at least in the adipose tissue, these functions may be regulated independently, which provides support for the findings of Kovesan and colleagues¹³. Finally, our data suggest that, in the adipose tissue, endoplasmic reticulum stress is more related to inflammation than autophagy.

Acknowledgements. We thank Dr. E. R. Roman, Mr. J. G. Ferraz and Mr. M. Cruz, from the University of Campinas for technical assistance. We thank Dr. N. Conran for editing the English grammar. The support for the study was provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

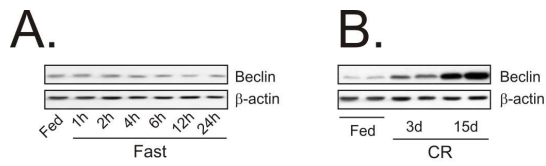
References

1. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; **444**(7121): 840-6.
2. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 415-45.
3. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; **306**(5695): 457-61.
4. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; **140**(6): 900-17.
5. Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2008; **32 Suppl 7**: S52-4.
6. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010; **11**(6): 467-78.
7. Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol* 2008; **3**: 427-55.
8. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; **451**(7182): 1069-75.
9. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007; **27**: 19-40.
10. Delgado M, Singh S, De Haro S, Master S, Ponpuak M, Dinkins C *et al.* Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 2009; **227**(1): 189-202.
11. Botti J, Djavaheri-Mergny M, Pilatte Y, Codogno P. Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. *Autophagy* 2006; **2**(2): 67-73.
12. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; **40**(2): 280-93.
13. Kovan J, Bluher M, Tarnovscki T, Kloting N, Kirshtein B, Madar L *et al.* Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**(2): E268-77.
14. Tang F, Watkins JW, Bermudez M, Gray R, Gaban A, Portie K *et al.* A life-span extending form of autophagy employs the vacuole-vacuole fusion machinery. *Autophagy* 2008; **4**(7): 874-86.

15. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011; **146**(5): 682-95.
16. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992; **55**(2 Suppl): 615S-619S.
17. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; **8**(4): 445-544.
18. Rossmeisl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* 2003; **52**(8): 1958-66.
19. De Souza CT, Araujo EP, Stoppiglia LF, Pauli JR, Ropelle E, Rocco SA *et al.* Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J* 2007; **21**(4): 1153-63.
20. Ost A, Svensson K, Ruishalme I, Brannmark C, Franck N, Krook H *et al.* Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 2010; **16**(7-8): 235-46.
21. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(47): 19860-5.
22. Goldman S, Zhang Y, Jin S. Autophagy and adipogenesis: implications in obesity and type II diabetes. *Autophagy* 2010; **6**(1): 179-81.
23. Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell* 2011; **147**(4): 724-7.
24. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy: a potential link between obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 2010; **11**(6): 449-51.
25. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E *et al.* Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**(6): 1042-7.
26. Lima MM, Pareja JC, Alegre SM, Geloneze SR, Kahn SE, Astiarraga BD *et al.* Acute effect of roux-en-y gastric bypass on whole-body insulin sensitivity: a study with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**(8): 3871-5.
27. van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR *et al.* Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes* 2011; **60**(6): 1699-704.

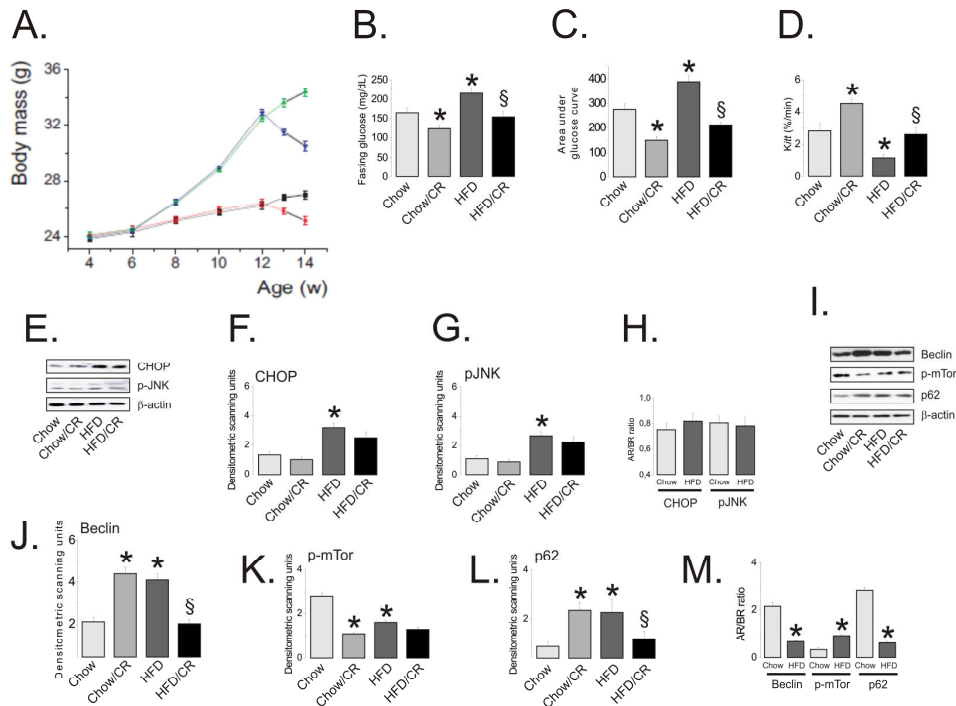
28. Geloneze SR, Geloneze B, Morari J, Matos-Souza JR, Lima MM, Chaim EA *et al.* PGC1alpha gene Gly482Ser polymorphism predicts improved metabolic, inflammatory and vascular outcomes following bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)* 2012; **36**(3): 363-8.
29. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS *et al.* Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2009; **58**(3): 693-700.
30. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D *et al.* Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 2006; **55**(6): 1554-61.

Figures



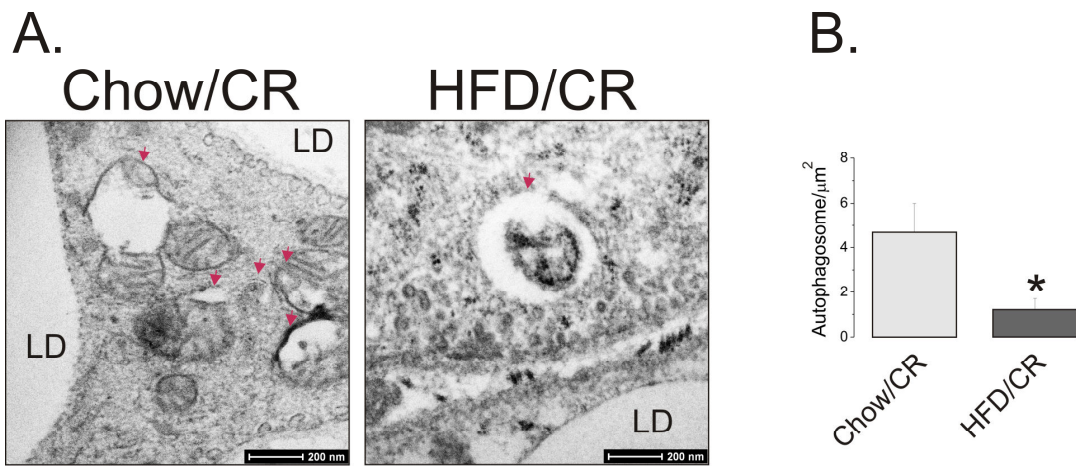
Nuñez, Figure 1

Figure 1. Effect of caloric restriction on the expression of beclin in the visceral adipose tissue of mice. A, Lean mice were fasted overnight and at 8 am chow was made freely available for 4h; mice were then fasted again for 1-24h and the expression of beclin was evaluated in visceral adipose tissue by immunoblot. B, Lean mice were placed into three or 15 days 40% caloric restriction (CR) and the expression of beclin was evaluated in visceral adipose tissue by immunoblot. In all experiments $n = 6$. Blots are representative of all experiments.



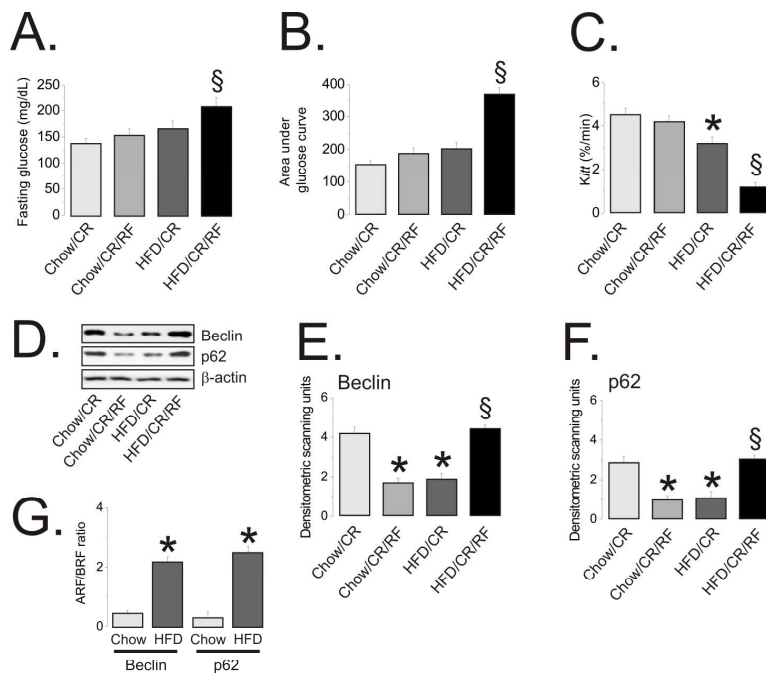
Nuñez, Figure 2

Figure 2. Effect of caloric restriction on the expression of autophagy and endoplasmic reticulum stress markers in the visceral adipose tissue of mice. In A-M, mice were fed either chow or high-fat diet (HFD) *ad libitum* for 8 wk beginning at age 4 wk; at age 12 wk mice of both groups were randomly selected for maintaining on the same diet *ad libitum* or on the same diet with 40% caloric restriction (CR) for another 2 wk. A, body mass was evaluated throughout the experimental period (chow, black; chow/CR, red; HFD, green; HFD/CR, blue). Fasting glucose (B), the area under glucose curve during an intraperitoneal glucose tolerance test (C) and the constant of glucose decay (*K_{itt}*) during an insulin tolerance test (D) were determined at the end of the experimental period. The expressions of CHOP (E and F) and phospho-JNK (E and G) were determined in visceral adipose tissue by immunoblot, and the ratios between the relative expressions of CHOP and phospho-JNK after and before caloric restriction (AR/BR) were calculated (H). The expressions of beclin (I and J), phospho-mTor (I and K) and p62 (I and L) were determined in visceral adipose tissue by immunoblot, and the ratios between the relative expressions of beclin, phospho-mTor and p62 after and before caloric restriction (AR/BR) were calculated (M). In all experiments, n = 6. In B-D, F-G and J-L, *p<0.05 vs. chow and §p<0.05 vs. HFD. In H and M, *p<0.05 vs. respective chow. In E and I, membranes were stripped and re-blotted with β-actin to evaluate protein loading. Blots are representative of all experiments. Bar-graphs represent means±standard errors.



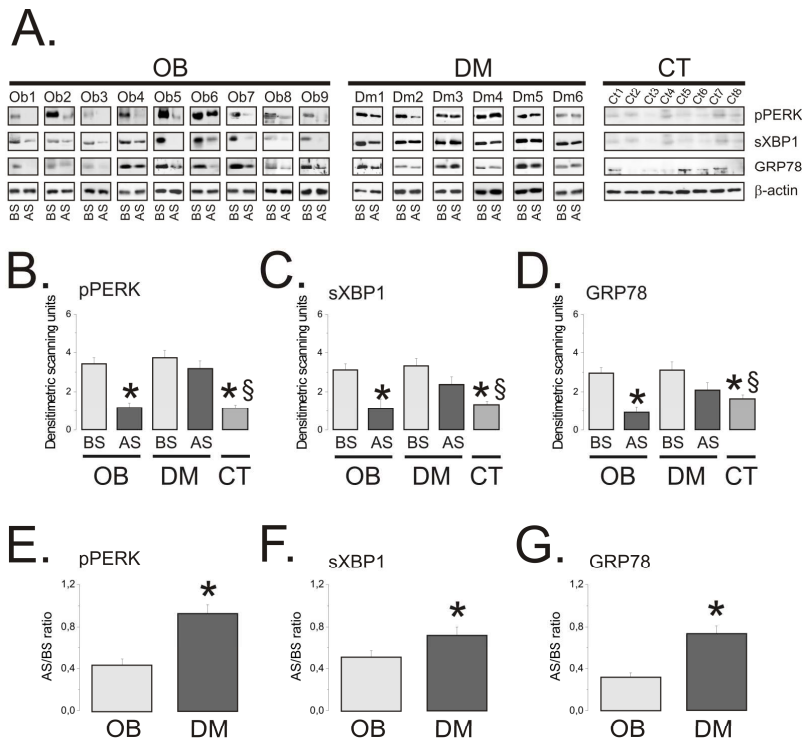
Nuñez, Figure 3

Figure 3. Transmission electron microscopy evaluation of autophagosomes in the visceral adipose tissue of mice. Mice were fed either chow or high-fat diet (HFD) *ad libitum* for 8 wk beginning at age 4 wk; at age 12 wk mice of both groups were given the same diet with 40% caloric restriction (CR) for another 2 wk. A, Visceral adipose tissue was collected for evaluation of the presence of autophagosomes (red arrows) using transmission electron microscopy; LD, lipid droplet; B, autophagosomes were counted in fields of 1.0 x 1.0 μm . In all experiments n = 4. In B, *p<0.05 vs. chow. Images are representative of all experiments. Bar-graph represent means \pm standard errors.



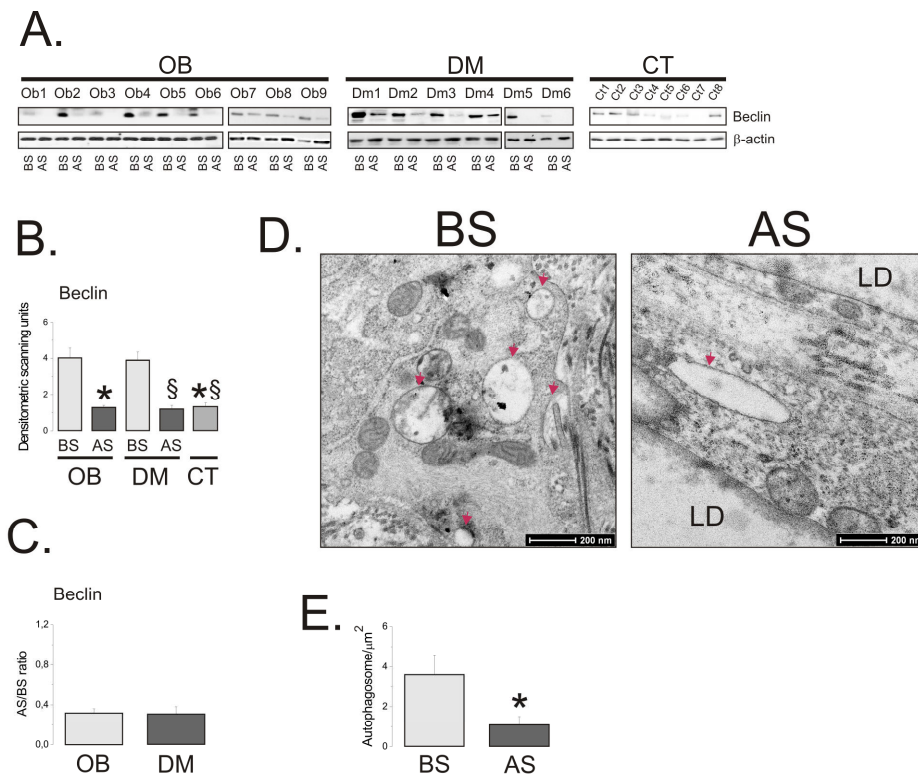
Nuñez, Figure 4

Figure 4. Effect of caloric re-feeding on the expression of autophagy proteins in the visceral adipose tissue of mice. Mice were fed on either chow or high-fat diet (HFD) *ad libitum* for 8 wk beginning at age 4 wk; at age 12 wk mice from both groups were transferred to a 40% caloric restriction (CR) regimen on the same diet, for another 2 wk; at age 14 wk mice from both groups were randomly selected for maintaining on caloric restriction or were returned to consumption of the same diet (RF) for another ten days. Fasting glucose (A), the area under glucose curve during an intraperitoneal glucose tolerance test (B) and the constant of glucose decay (*K_{itt}*) during an insulin tolerance test (C) were determined at the end of the experimental period. The expressions of beclin (D and E) and p62 (D and F) were determined in visceral adipose tissue by immunoblot, and the ratios between the relative expressions of beclin and p62 after and before reintroduction of *ad libitum* diet (ARF/BRF) were calculated (G). In all experiments, n=6. In A-C and E-F, *p<0.05 vs. chow/CR and §p<0.05 vs. HFD/CR. In G, *p<0.05 vs. respective chow. In D, membranes were stripped and re-blotted with β -actin to evaluate protein loading. Blots are representative of all experiments. Bar-graphs represent means \pm standard errors.



Nuñez, Figure 5

Figure 5. Regulation of markers of endoplasmic reticulum stress during body mass reduction in subcutaneous adipose tissue of humans. The protein expressions of phospho-PERK (A and B), spliced XBP1 (A and C) and GRP78 (A and D) were determined by immunoblot in the subcutaneous adipose tissue of obese non-diabetic (OB) and obese-diabetic (DM) patients and in lean controls (CT); adipose tissue specimens were collected right before (BS) a Roux-in-Y gastric bypass surgery, and approximately one year later (AS). The ratios between the relative expressions of phospho-PERK (E), spliced XBP1 (F) and GRP78 (G), after and before surgery (AS/BS) were calculated (G). Specimens were collected from nine OB, six DM and eight CT. In B-D, * $p < 0.05$ vs. OB/BS and § $p < 0.05$ vs. DM/BS. In E-G, * $p < 0.05$ vs. OB. In A, membranes were stripped and re-blotting with β -actin to evaluate protein loading. Bar-graphs represent means \pm standard errors.



Nuñez, Figure 6

Figure 6. Regulation of markers of autophagy during body mass reduction in subcutaneous adipose tissue of humans. The protein expression of beclin (A and B) was determined by immunoblot in the subcutaneous adipose tissue of obese non-diabetic (OB) and obese-diabetic (DM) patients and in lean controls (CT); adipose tissue specimens were collected during a Roux-in-Y gastric bypass surgery (BS), and approximately one year later (AS). The ratio between the relative expression of beclin after and before surgery (AS/BS) was calculated (C). D, transmission electron microscopy image of the adipose tissue in an OB patient collect during Roux-in-Y gastric bypass surgery; LD, lipid droplet; red arrows indicate autophagosomes. E, autophagosomes were counted in fields of $1.0 \times 1.0 \mu\text{m}$. Specimens were collected from nine OB, six DM and eight CT. In B and E, * $p < 0.05$ vs. OB/BS and § $p < 0.05$ vs. DM/BS. In A, membranes were stripped and re-blotted with β -actin to evaluate protein loading. Bar-graphs represent means \pm standard errors.

Table 1. Macronutrient composition of diets.

| | <i>Chow</i> | | <i>High-Fat Diet</i> | |
|---------------|-------------|-----|----------------------|-----|
| | g% | kJ% | g% | kJ% |
| Protein | 20 | 19 | 20 | 14 |
| Carbohydrate | 76 | 72 | 45 | 31 |
| Saturated fat | 4 | 9 | 35 | 55 |
| kJ/g | 17.5 | | 24.1 | |

Table 2. Clinical and metabolic data of patients and controls.

| | Obese | | Diabetes | | Control |
|--------------------------|------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | BS | AS | BS | AS | |
| Female\Male | 7\2 | | 3\3 | | 5\3 |
| Age (y) | 32±6 | | 49±11 | | 36±12 |
| BMI (kg/m ²) | 43±4.3§ | 29±4.1* | 32±2.2§ | 25±3.5# | 23±2.7 |
| Fasting glucose (mg/dL) | 98±12§ | 82±6 | 245±97§ | 143±70# | 80±6 |
| Hb1Ac (%) | 6.1±0.4 | 5.2±0.5 | 11.1±2.9§ | 7.2±1.6# | 5.8±0.8 |
| Insulin (mU/L) | 22.2±9.7§ | 10.3±7.7* | 15.1±5.9§ | 7.1±3.0# | 6.1±0.7 |
| Leptin (ng/mL) | 55.3±14.2§ | 16.1±6.6* | 32.2±6.4§ | 9.2±1.3# | 10.2±6.6 |
| Adiponectin (µg/mL) | 7.1±1.1 | 8.7±0.9 | 4.8±1.8§ | 9.8±2.3# | 12.5±7.1 |
| TNFα (pg/mL) | 7.4±3.4§ | 1.9±0.9* | 9.2±2.6§ | 8.3±2.8 | 1.3±1.9 |
| IL6 (pg/mL) | 2.7±1.1§ | 1.5±1.0 | 3.2±0.7§ | 2.2±0.7 | 0.7±0.5 |
| IL1β (pg/mL) | 11.7±3.2 | 3.1±1.2§* | 22.6±2.4§ | 23.8±4.7 | 13.3±10.6 |

AS, after surgery; BMI, body mass index; BS, before surgery; Hb1Ac, glyated hemoglobin

*p<0.05 vs. Obese BS

§p<0.05 vs. Control

#p<0.05 vs. Diabetes BS.

DISCUSSÃO GERAL

O aumento da adiposidade está intimamente ligado ao desenvolvimento da resistência à insulina e é fator de risco independente para o desenvolvimento de DM2 (27).

O progressivo aumento da deposição de gordura no tecido adiposo e eventualmente em outros tecidos, como fígado, pode levar à ativação da resposta inflamatória que é o principal mecanismo que conecta a obesidade à resistência à insulina (83). Contudo, ainda não se sabe como a inflamação é de fato desencadeada na obesidade. Um evento primário importante na ativação da inflamação associada à obesidade é certamente a indução de ERE por meio de nutrientes (83, 59).

Durante a UPR, proteínas inflamatórias com atividade catalítica serina/treonina quinase podem ser ativadas e prejudicar a transdução de sinal da insulina por alterar o estado de fosforilação de proteínas-chave desta via (85).

Estudos recentes têm demonstrado que a regulação anômala da autofagia pode levar à ativação de um sinal inflamatório intracelular, e assim, modular a transdução do sinal da insulina (62). De fato a autofagia é um importante regulador da vitalidade e função de organelas, incluindo o retículo endoplasmático, e aparenta ser um modulador potencial do estresse de retículo e da inflamação (64).

Um estudo recente demonstrou que a autofagia está aumentada no tecido adiposo de indivíduos obesos. Os autores sugerem que o aumento autofagia está relacionado ao grau de resistência à insulina, corroborando o trabalho de Öst em 2010 (77, 86). Contudo o grau de adiposidade, a distribuição visceral de gordura e o tamanho médio do adipócito,

correlacionaram-se ao aumento da autofagia de forma independente à resistência à insulina (86).

Na obesidade experimental, a autofagia é anormalmente regulada no fígado (62). Contudo, em contraste com os achados em tecido adiposo humano, a autofagia hepática está reduzida, e a correção genética deste defeito resulta em redução do estresse de retículo endoplasmático e aumento da ação da insulina. Portanto sugere-se, pela regulação da função do retículo endoplasmático, que a autofagia pode agir como um importante regulador da resposta hepática à insulina (62).

Em organismos unicelulares, a autofagia apresenta-se como mecanismo que provém nutrientes obtidos de organelas próprias em períodos de privação de nutrientes (87). Em organismos multicelulares, essa importante função é preservada e a autofagia é amplamente estimulada durante a privação de nutrientes (88). Contudo, no tecido adiposo de humanos, ocorre o aumento da autofagia mediante a superalimentação e hipertrofia de adipócitos (86).

No presente estudo, avaliamos a regulação da autofagia durante a privação de nutrientes em animais e humanos obesos. O Camundongo Swiss é uma cepa *outbreed* originada de AKR propensos ao diabetes e à obesidade, que tem sido extensivamente usado como modelo de obesidade e DM2 induzida por dieta (89, 90).

Esses animais, em dieta hiperlipídica tornam-se obesos e diabéticos e apresentam aumento da expressão de marcadores de ERE e autofagia. De forma oposta ao que ocorre aos animais magros, camundongos obesos sob restrição calórica mostram redução da autofagia e esta redução está

relacionada à restrição de nutrientes, visto que a re-alimentação rapidamente aumenta os marcadores de autofagia.

A despeito da regulação da autofagia não ter sido estudada em tecido adiposo em modelos animais de obesidade, a expectativa era de que, assim como em humanos (77, 85), esta se apresentaria aumentada (91) e de fato estava. Alguns estudos em animais mostraram que o bloqueio genético da autofagia no tecido adiposo leva a um perfil magro protegido contra a obesidade induzida por dieta e resistência à insulina (75, 76). Adicionalmente, foi demonstrado que a autofagia é importante para a diferenciação de adipócitos (76, 92), o que sugere que o aumento da ativação da autofagia no tecido adiposo pode ser requerido para a expansão dos adipócitos que ocorre na obesidade.

De forma similar aos achados em camundongos e publicações prévias de estudos com humanos (86, 77) os pacientes obesos do nosso estudo apresentam aumento da expressão de marcadores de autofagia no tecido adiposo. Corroborando os achados em camundongos, a redução da massa corporal resulta em redução da autofagia no tecido adiposo de pacientes. Falhas na regulação da autofagia podem ser um dos mecanismos ligados aos efeitos deletérios da sobrecarga calórica e à resistência à insulina (62, 64), assim, avaliamos os marcadores de inflamação, ERE e autofagia em obesos não-diabéticos em paralelo a pacientes obesos e diabéticos. A redução da adiposidade foi, como esperado, muito eficiente em promover a redução dos níveis sanguíneos de insulina e leptina, que foi acompanhado no grupo diabético, pela redução da glicose sanguínea em jejum e da hemoglobina glicosilada. Nos pacientes obesos dois importantes marcadores de inflamação

sistêmica, TNF- α e IL-1 β , mostraram significativas reduções após a redução da massa corporal, contudo, no grupo de portadores de diabetes as concentrações sanguíneas de citocinas não mudaram de forma significativa.

Esses resultados reforçam os achados anteriores mostrando que, enquanto o obeso não diabético, a redução da adiposidade resulta em rápida normalização dos níveis de marcadores sistêmicos da inflamação, contudo, em pacientes obesos e diabéticos isso não é uma regra (91, 94).

De forma similar, a alteração dos marcadores de ERE foi completamente corrigida após a redução da massa corporal em indivíduos obesos não-diabéticos, enquanto em diabéticos houve apenas uma tendência de redução.

Finalmente, com relação à autofagia, ambos, diabéticos e não diabéticos mostraram a normalização após a redução de peso. Apenas um estudo prévio avaliou a expressão de marcadores de ERE em pacientes obesos após a cirurgia bariátrica (42). Como em nosso grupo de pacientes obesos não diabéticos, a redução da massa corporal resulta em atenuação do ERE (42).

O presente estudo demonstra que a obesidade e a excessiva ingestão calórica, podem ocasionar uma regulação defeituosa da autofagia no tecido adiposo no que tange a resposta as variações na disponibilidade e energia/nutrientes. Adicionalmente, a avaliação do ERE concomitante à autofagia em indivíduos diabéticos e não diabéticos sugere que, ao menos no tecido adiposo de indivíduos diabéticos, essas funções podem ser reguladas de forma independentemente, o que corrobora os achados de Kovsan et al., em 2011(Figura 3).

Assim, uma vez supra-ativada no tecido adiposo hipertrófico e inflamado do obeso, a redução ou aumento da autofagia, em tecido adiposo, é

determinada primariamente pelo aporte de energia em detrimento à condição inflamatória associada à resistência à insulina ou diabetes.

A desconexão entre dois mecanismos que visam salvaguardar a homeostase celular – ERE e autofagia – pode estar relacionada à ineficácia da perda de massa corporal em reduzir a inflamação no paciente diabético.

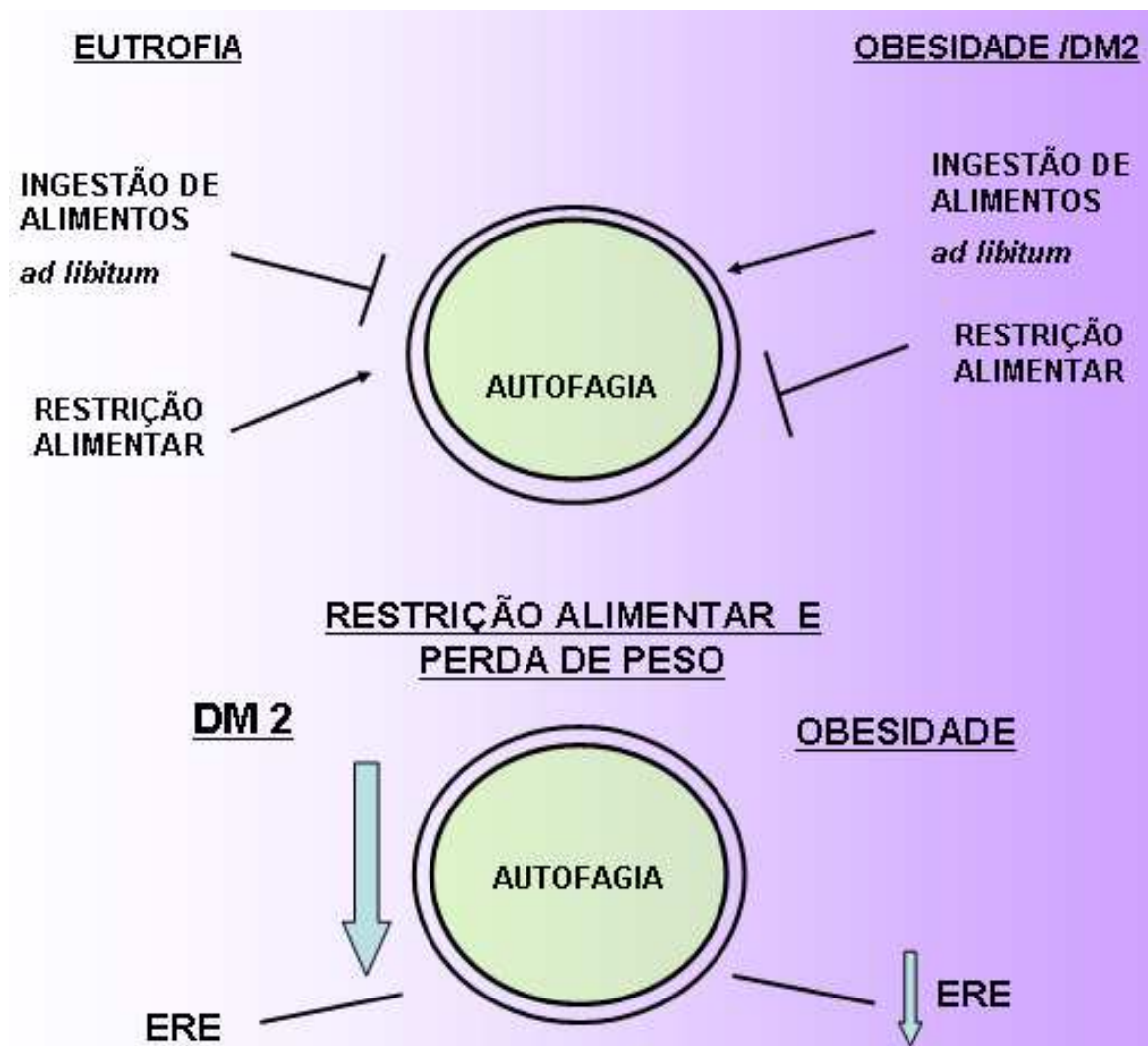
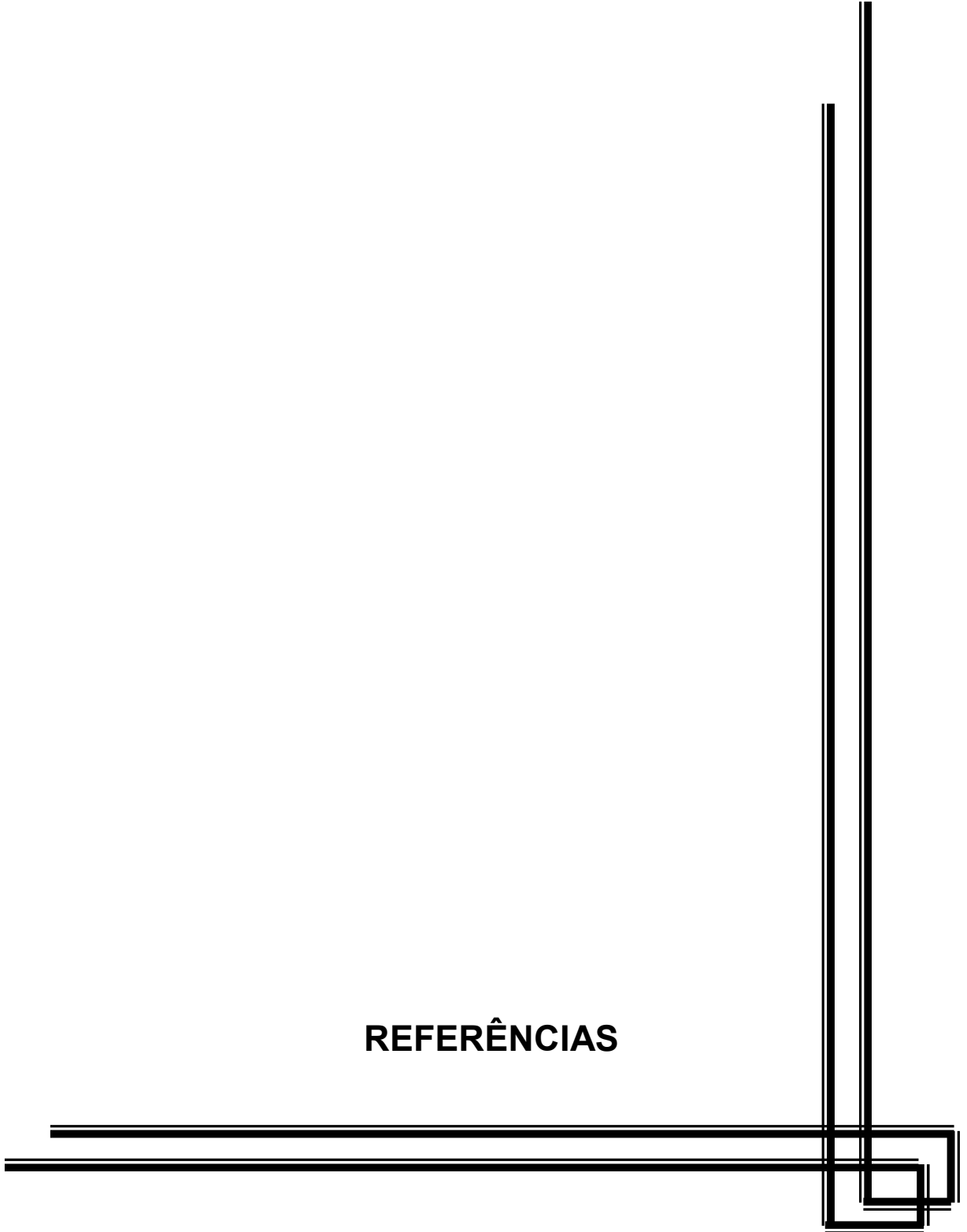


Figura 3 – Regulação do processo autofágico no Tecido adiposo. Na eutrofia, a autofagia é supra-regulada em condição de privação de energia e nutrientes. No obeso, portador de DM2 (*diabetes mellitus* tipo 2) ou não ocorre o inverso. Na restrição alimentar com redução do peso há redução da autofagia tanto obesos portadores de DM2 como em não- portadores, contudo apenas no último grupo há redução concomitante do estresse de retículo endoplasmático.

REFERÊNCIAS



1. WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. 1995. 854:312-344.
2. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 abr 6;404(6778):635-43.
3. Heber, D. "An Integrative View of Obesity." *American Journal of Clinical Nutrition* 91, no. 1 (November 18, 2009): 280S-283S.
4. Aitsi-Selmi, A, Batty GD, Barbieri MA, Silva AAM, Cardoso VC, Goldani MZ, Marmot MG, and Bettiol H. "Childhood Socioeconomic Position, Adult Socioeconomic Position and Social Mobility in Relation to Markers of Adiposity in Early Adulthood: Evidence of Differential Effects by Gender in the 1978/79 Ribeirao Preto Cohort Study." *International Journal of Obesity* (May 8, 2012). 1-9.
5. Ramachandrappa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2011. Jun 1;121(6):2080-6.
6. WHO|Obesity and overweight [on line].[Acesso em 2 out.2011]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
7. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008 set;32(9):1431-7.
8. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Engl. J. Med*. 2006 ago 24;355(8):763-78.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.
10. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. *Am J Public Health*. 2007 out;97(10):1808-12.
11. Center for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Division of Nutrition, Physical Activity and Obesity. The Obesity Epidemic. [on line]. [Acesso em 06 ago.2012]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cdctv/ObesityEpidemic/>.
12. World Health Organization (WHO). WHO global infobase. Prevalence of overweight and obesity map.[on line]. [Acesso em 03 ago. 2012]. Disponível em: <https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx>.
13. Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr. Rev*. 2006 dez;27(7):710-8.

14. Popkin BM, Gordon-Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *International Journal of Obesity*. 2004 Nov;28:S2–S9.
15. Damião R, Castro TG, Cardoso MA, Gimeno SGA, Ferreira SRG, others. Dietary intakes associated with metabolic syndrome in a cohort of Japanese ancestry. *British Journal of Nutrition*. 2006;96(3):532–8.
16. Haslam D. Obesity: a medical history. *Obes Rev*. 2007 mar;8 Suppl 1:316.
17. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, MPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011 ago 27;378(9793):804–14.
18. Batista Filho M, Rissin A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad saúde pública*. 2003;19(Supl 1):181–91.
19. Friedman JM. Modern science versus the stigma of obesity. *Nat. Med*. 2004 jun;10(6):563–9.
20. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *International Journal of Obesity* 2011; 35: 1455-65.
21. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 dez;37(12):1595–607.
22. DeFronzo RA. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes*. 1979 dez;28(12):1095–101.
23. Whitcroft S, Herriot A. Insulin resistance and management of the menopause: a clinical hypothesis in practice. *Menopause International*. 2011 mar 22;17:24–8.
24. Verma A. Insulin Resistance Syndrome in Women with Prior History of Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002 jul 1;87:3227–35.
25. Bennett B, Larson-Meyer DE, Ravussin E, Volaufova J, Soros A, Cefalu WT, et al. Impaired Insulin Sensitivity and Elevated Ectopic Fat in Healthy Obese vs. Nonobese Prepubertal Children. *Obesity (Silver Spring, Md.) [Internet]*. 2011 ago 25 [citado 2011 nov 13]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869763>
26. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology*. 2010 set;151(9):4109–15.
27. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006 dez 14;444(7121):840–6.

28. Laakso M, Sarlund H, Salonen R, Suhonen M, Pyörälä K, Salonen JT, et al. Asymptomatic atherosclerosis and insulin resistance. *Arterioscler. {Citation}*
29. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000 jul;106(2):171–6.
30. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 2005 mar;146(3):1576–87.
31. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Clinical Investigation.* 1994a;94(4):1543.
32. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87–91.
33. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 dez 14;444(7121):860–7.
34. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation.* 1995;95(5):2409.
35. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17(1):4–12.
36. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *The Journal of Lipid Research.* 2007 maio 9;48:1905–14.
37. Schäffler A, Schölmerich J, Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in Immunology.* 2007 Sep;28(9):393–9.
38. Gerace L, Gilmore R, Johnson A, Lazarow P, Neupert W, O'Shea E, Weis K. Intracellular Compartments and Protein Sorting. The Endoplasmic Reticulum. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4^a ed. New York. Garland Science; 2002.
39. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Current Biology.* *Current Biology* 8, no16. 2012. 622-626.
40. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine.* 2012 Jan;18(1):59–68.

41. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes*. 2008 Dec 3;58(3):693–700.
42. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007 Jul;8(7):519–29.
43. Harding H, Zhang Y & Ron, D. Translation and protein folding are coupled by an endoplasmic reticulum resident kinase. *Nature* 397,(1999): 271–274.
44. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*,6,(November,2000): 1099–1108.
45. Parmar VM, Schröder M. Sensing endoplasmic reticulum stress. *Self and Nonself*. 2012;153–68.
46. Shi Y, Vatten KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2 α -Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *Molecular and Cellular Biology*. (December, 1998): 7499–7509.
47. Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*. 2010 Mar;140(6):900–17.
48. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10(11):3787–99.
49. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6 α Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Developmental Cell*. 2007 Sep 4;13(3):351–64.
50. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. *Developmental Cell*. 2007 Sep 4;13(3):365–76.
51. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell*. 2002;3(1):99–111.
52. Schindler AJ, Schekman R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(42):17775–80.

53. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 2000;6(6):1355–64.
54. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 1997;90(6):1031–9.
55. Yoshida H, Uemura A, Mori K. pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell Structure and Function*. 2009.34:1-10.
56. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH. 2000;
57. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(11):4854–8.
58. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Molecular and Cellular Biology* 2006 April;26(8):3071-3084.
59. Ozcan, U. “Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes.” *Science* 306, no. 5695 (October 15, 2004): 457–461.
60. Delgado M, Singh S, De Haro S, Master S, Ponpuak M, Dinkins C, et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunological Reviews*. 2009 Jan;227(1):189–202.
61. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome Formation in Mammalian Cells. *Cell Structure and Function* 27 (2002):421-429.
62. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2010 Jun;11(6):467–78.
63. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2010 Mar;21(3):142–50.
64. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy: A Potential Link between Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2010 Jun;11(6):449–51.
65. Czaja MJ. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *AJP: Cell Physiology*. 2010 Jan 20;298(5):C973–C978.

66. Lavallard VJ, Meijer AJ, Codogno P, Gual P. Autophagy, signaling and obesity. *Pharmacological Research* [Internet]. 2012 Sep [cited 2012 Sep 27]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661812001673>
67. Altman BJ, Wofford JA, Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Wieman HL, et al. Autophagy Provides Nutrients but Can Lead to Chop-dependent Induction of Bim to Sensitize Growth Factor–deprived Cells to Apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(4):1180–91.
68. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(12):4788–93.
69. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):323–35.
70. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004 Dec;36(12):2503–18.
71. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology*. 2001;152(4):657–68.
72. Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the Cellular Energetic Balance. *Cell Metabolism*. 2011 May;13(5):495–504.
73. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in Genetics*. 2008 Dec;24(12):604–12.
74. Singh (2009a) R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009 Apr 1;458(7242):1131–5.
75. Singh (2009b) R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2009 Oct 12 [cited 2012 Sep 27]; Available from: <http://www.jci.org/articles/view/39228>
76. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(47):19860–5.
77. Öst A, Svensson K, Ruishalme I, Brännmark C, Franck N, Krook H, et al. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from

- obese patients with type 2 diabetes. *Molecular Medicine*. 2010;16(7-8):235.
78. Hartley T, Brumell J, Volchuk A. Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic β -cells. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 2008 Sep 23;296(1):E1–E10.
 79. Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, et al. Loss of Autophagy Diminishes Pancreatic β Cell Mass and Function with Resultant Hyperglycemia. *Cell Metabolism*. 2008 Oct 8;8(4):318–24.
 80. Zhou, L., M. Liu, J. Zhang, H. Chen, L. Q. Dong, and F. Liu. “DsbA-L Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Adiponectin Downregulation.” *Diabetes* 59, no. 11 (August 10, 2010): 2809–2816.
 81. Zhou, L., J. Zhang, Q. Fang, M. Liu, X. Liu, W. Jia, L. Q. Dong, and F. Liu. “Autophagy-Mediated Insulin Receptor Down-Regulation Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Insulin Resistance.” *Molecular Pharmacology* 76, no. 3 (June 18, 2009): 596–603.
 82. Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, Yasuda M, Kume S, Morino K, et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 Jan;417(1):352–7.
 83. Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, Joosten LAB, Netea MG, Tack CJ, Stienstra R. Autophagy Activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 2012; 153(12):5866-5874.
 84. Gregor MF, Hotamisligil GS: Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-445
 85. Hotamisligil, GS. “Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in Obesity and Diabetes.” *International Journal of Obesity* 32 (December 2008): S52–S54.
 86. Kovsan J, Bluher M, Tarnovscki T, Kloting N, Kirshtein B, Madar L, Shai I, Golan R, Harman-Boehm I, Schon MR, Greenberg AS, Elazar Z, Bashan N, Rudich A: Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E268-277
 87. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008;451:1069-1075.
 88. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and Aging. *Cell*. 2011 Sep;146(5):682–95.
 89. De Souza CT. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology*. 2005 Oct 1;146(10):4192–9.

90. Rossmeisl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes*. 2003;52(8):1958–66.
91. Maixner N, Kovsan J, Harman-Boehm I, Blüher M, Bashan N, Rudich A. Autophagy in Adipose Tissue. *Obesity Facts*. 2012;5(5):710–21.
92. Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on Fat: p62-mTORC1-Autophagy Connections. *Cell*. 2011 Nov;147(4):724–7
93. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Schernthaner G. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1042-1047
94. Geloneze SR, Geloneze B, Morari J, Matos-Souza JR, Lima MM, Chaim EA, Pareja JC, Velloso LA: PGC1alpha gene Gly482Ser polymorphism predicts improved metabolic, inflammatory and vascular outcomes following bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:363-368

OBRAS CONSULTADAS



Bleisch VR, Mayer J, Dickie MM. Familial Diabetes Mellitus in Mice, Associated with Insulin Resistance Obesity, and Hyperplasia of the Islands of Langerhans. *The American Journal of Pathology*. 1952;28(3):369.

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes care*. 1994;17(9):961–9.

Cuervo AM, Macian F. Autophagy, nutrition and immunology. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012 Feb;33(1):2–13.

Danielsson A, Fagerholm S, Öst A, Franck N, Kjolhede P, Nystrom FH, Strålfors P. Short-Term Overeating Induces Insulin Resistance in Fat Cells in Lean Human Subjects. *Mol Med* 15 (2009) 228 - 234.

Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and Type 2 Diabetes: What Can Be Unified and What Needs to Be Individualized? *Diabetes Care*. 2011 May 20;34(6):1424–30.

Hammarstedt A, Graham TE, Kahn B b. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2012;4(1):42.

Meng Q, Cai D. Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the I B Kinase (IKK)/NF- B Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jul 22;286(37):32324–32.

Ministério da Saúde. Informações de Saúde. DATASUS- Tecnologia da Informação a Serviço da Ciência. Morbidade Hospitalar do SUS por local de residência- Brasil. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nruf.def>. último acesso em: 06 de agosto de 2012.

Münz, Christian. “Enhancing Immunity Through Autophagy.” *Annual Review of Immunology* 27, no. 1 (April 2009): 423–449.

Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-WileyTM, Vega GL, PhD; Farzaneh-Far R, Grundy SM, et al. Dysfunctional Adiposity and the Risk of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Obese Adults. *JAMA*. 2012; 308(11):1150-1159.

Nelson KM, Reiber G, Boyko EJ. Diet and exercise among adults with type 2 diabetes findings from the third national health and nutrition examination survey (NHANES III). *Diabetes Care*. 2002;25(10):1722–8.

Nijholt DAT, de Graaf TR, van Haastert ES, Oliveira AO, Berkers CR, Zwart R, et al. Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: implications for Alzheimer’s disease. *Cell Death & Differentiation*. 2011;18(6):1071–81.

Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009 Oct 1;461(7264):654–8.

Ogata, M., S.-i. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, et al. "Autophagy Is Activated for Cell Survival After Endoplasmic Reticulum Stress." *Molecular and Cellular Biology* 26, no. 24 (October 9, 2006): 9220–9231.

Prentki, M. & Nolan, C.J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-12 (2006).

Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO. Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1994;17(9):1067–74.

Rodrigues D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. 2011. *Biochimica et Biophysica Acta*.1813: 564-574.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010. 87: 4 -14.

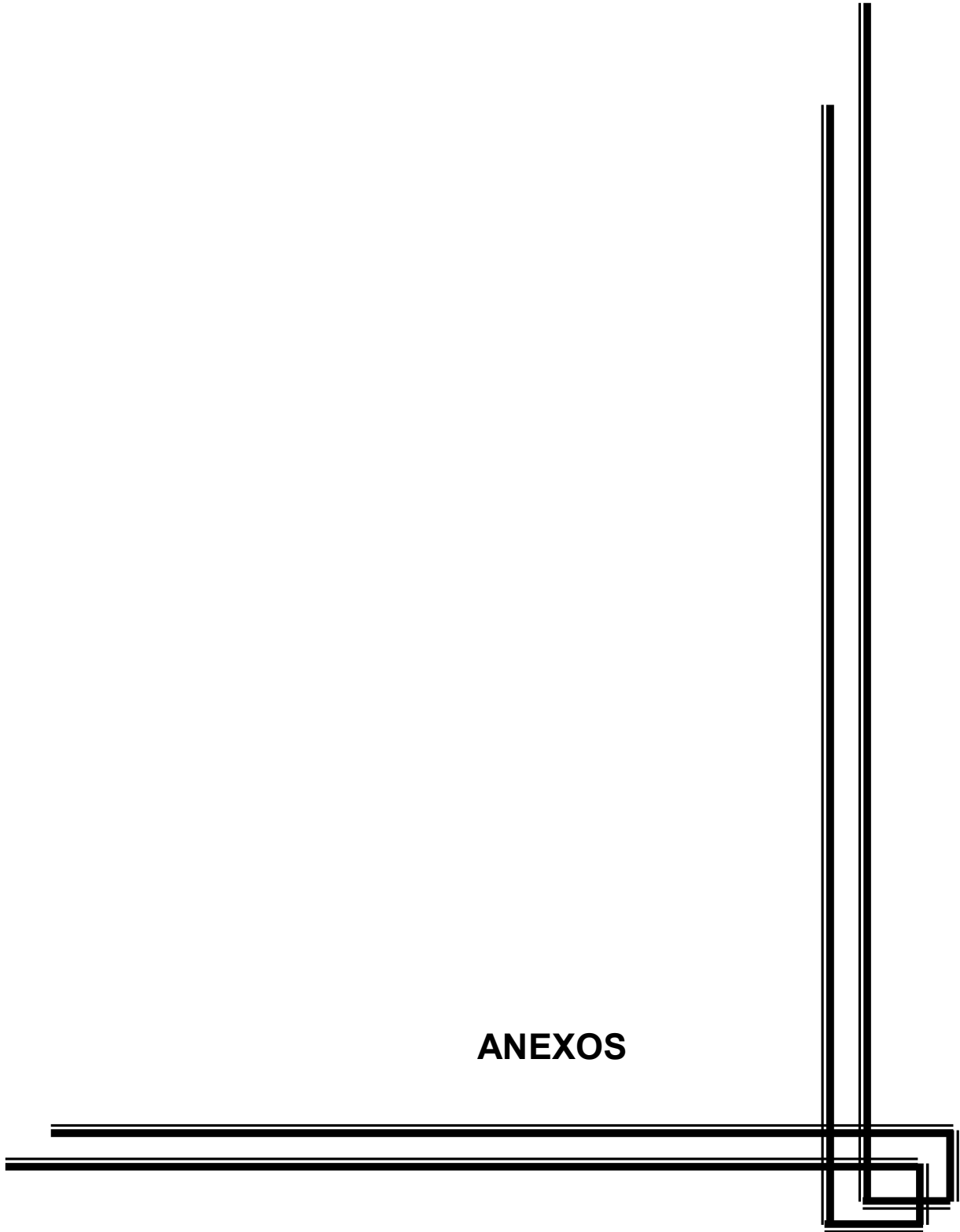
Smith BT, Lynch JW, Fox CS, Harper S, Abrahamowicz M, Almeida ND, et al. Life-Course Socioeconomic Position and Type 2 Diabetes Mellitus: The Framingham Offspring Study. *American Journal of Epidemiology*. 2011 Jan 17;173(4):438–47.

Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. *Nature Immunology*. 2009 May;10(5):461–70.

World Health Organization (WHO).Media Center – Diabetes- What is diabetes? <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Último acesso em: 02 de outubro de 2012.

Xiao J, Yang W. Weight Loss Is Still an Essential Intervention in Obesity and its Complications: A Review. *Journal of Obesity*. 2012;2012:1–6.

ANEXOS



ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA- FCM/UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Stress de retículo endoplasmático em tecido adiposo de pacientes obesos e com diabetes mellitus do tipo 2 – Efeitos da perda de massa corpórea e do controle metabólico”.

Nome: _____

RG: _____

Declara que é de livre vontade que está participando do projeto supracitado, de responsabilidade das pesquisadoras Carla Evelyn Coimbra Nuñez e Eliana Pereira de Araújo.

Este trabalho justifica-se pela importância do tema em saúde, visto que diabetes e obesidade representam hoje algumas das doenças mais comuns do planeta. O aparecimento dessas doenças leva a um considerável sofrimento humano devido à necessidade de restrições físicas, psicológicas e comportamentais que comumente as acompanham, além de levarem a um risco elevado para doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, doenças do coração e, portanto, podendo diminuir a expectativa de vida. Desta forma os objetivos para a realização desta pesquisa é conhecer às causas do aparecimento dessas doenças para que esses novos conhecimentos possam ajudar no desenvolvimento de novas formas de tratamento e novos medicamentos.

Caso aceite em participar da pesquisa será retirado um fragmento de gordura do subcutâneo de 1cm³, por meio de biópsia durante a cirurgia e 10mL de sangue para análises.

Esta pesquisa não acarretará em prejuízo ou dano para você, uma vez que a única intervenção será a aquisição de um fragmento de gordura e do sangue, durante a cirurgia.

A sua participação no estudo não levará a outras intervenções ou necessidades de acompanhamento ao longo da vida, sendo esse momento o único em que haverá necessidade de sua participação. Você poderá a qualquer momento desistir de sua participação na pesquisa e com ela você não vai ter nenhum gasto, portanto não vai haver nenhuma forma de reembolso de dinheiro.

Asseguramos que seu nome não aparecerá no trabalho e que as informações obtidas servirão única e exclusivamente para fins científicos.

Você tem a liberdade de aceitar ou recusar a participar do estudo, se assim o desejar. A não participação no estudo não acarretará prejuízo no atendimento, cuidado e tratamento pela equipe de profissionais de saúde do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Pela participação no estudo, você não receberá qualquer ressarcimento de despesas, mas terá a garantia de que o trabalho de realização da pesquisa não será de sua responsabilidade.

Se necessário qualquer esclarecimento antes durante ou após a pesquisa, poderá entrar em contato com as pesquisadoras Carla Evelyn Coimbra Nuñez e Eliana Pereira de Araujo se assim desejar, pelos endereços a seguir:

- telefone (19) 3521.8592 / (19) 9260. 1988

- e-mail: carlaecn@fcm.unicamp.br

Caso necessite entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, órgão que regulamenta a pesquisa na UNICAMP, você pode fazê-lo pelo telefone (19) 3521-8936.

Campinas, __ de _____ de 2008.

Assinatura do (a) voluntário (a)

ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-FCM/UNICAMP



CEP, 28/06/11.
(PARECER CEP: N° 099/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “STRESS DE RETÍCULO ENDOPLÁSTICO EM TECIDO ADIPOSE DE PACIENTES OBESOS E COM DIABETES MELLITUS DO TIPO 2. EFEITOS DA PERDA DE MASSA CORPÓREA E DO CONTROLE METABÓLICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Eliana Pereira de Araújo

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2 – PARECER DA Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA- INSTITUTO DE BIOLOGIA/UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "EFEITO DA PERDA ACENTUADA DE PESO SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS CIRCULANTES E O ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLAMÁTICO EM TECIDO ADIPOSEO" (protocolo nº 2778-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo / Carla Evelyn Coimbra Nuñez, 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 28 de agosto de 2012.

Campinas, 28 de agosto de 2012.

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/>

ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO PARA REIMPRESSÃO DO ARTIGO

----- Forwarded message -----

From: **Haines, Lucinda** <L.Haines@nature.com>
Date: 2013/4/15
Subject: RE: Request for use o article in PhD Thesis
To: "lavelloso.unicamp@gmail.com" <lavelloso.unicamp@gmail.com>

Hi Licio

It is fine to reuse the article in a thesis as long as you reference original publication the journal

Kind Regards

Lucinda

Lucinda Haines
Publishing Manager
Academic Journals
Nature Publishing Group
The Macmillan Building
4 Crinan Street
London
N1 9XW

Tel: [+44 \(0\)207 843 3634](tel:+442078433634)
Fax: [+44 \(0\)207 843 4839](tel:+442078434839)
Email: L.haines@nature.com
Web: www.nature.com

From: Lício Velloso
Sent: Friday, April 12, 2013 5:51 PM
To: International Journal of Obesity
Subject: Request for use o article in PhD Thesis

Ms
Nickie Roake
Editorial Office

Dear Ms Roake,

We have recently published a paper in IJO, and, as the paper is a part of the work performed by my PhD Student, Carla Nunez, I would like to request your authorization for printing the paper in the body of the thesis. The thesis has only restricted circulation within the University of Campinas, in Brazil.

The paper is

[Int J Obes \(Lond\)](#), 2013 Mar 12. doi: 10.1038/ijo.2013.27. [Epub ahead of print]

Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity.

[Nuñez CE](#), [Rodrigues VS](#), [Gomes FS](#), [de Moura RF](#), [Victorio SC](#), [Bombassaro B](#), [Chaim EA](#), [Pareja JC](#), [Geloneze B](#), [Velloso LA](#), [Araujo EP](#).

Source

Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, Campinas, Brazil.

I Thank you in advance