

DANIELA MITI LEMOS TSUKUMO

**MUTAÇÃO INATIVADORA DO TLR4 PROTEGE CONTRA
A OBESIDADE E A RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDAS
POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

CAMPINAS

UNICAMP

2008

DANIELA MITI LEMOS TSUKUMO

**MUTAÇÃO INATIVADORA DO TLR4 PROTEGE CONTRA
A OBESIDADE E A RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDAS
POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de concentração em
Ciências Básicas

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS

UNICAMP

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T789m Tsukumo, Daniela Miti Lemos
Mutação inativadora do TLR4 protege contra a obesidade e a resistência   insulina induzidas por dieta hiperlipídica / Daniela Miti Lemos Tsukumo. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Mario José Saad
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. TLR4. 3. Resistência a insulina. I. Saad, Mario José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance

Keywords: • Obesity
• Toll-Like Receptor 4 gene
• Insulin Resistance

Titula o: Doutor em Clínica Médica
 rea de concentra o: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário José Saad
Prof. Dr. Ubiratan Machado
Prof. Dr. Sérgio Dib
Prof. Dr. Ant nio Carlos Boschero
Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior

Data da defesa: 27- 02 - 2008



Cópia autêntica da Ata da Comissão Examinadora da Tese de Doutorado a que se submeteu **DANIELA MITI LEMOS TSUKUMO (RA-950414)**, aluna regularmente matriculada no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Doutorado.

Ata da Comissão Examinadora da Tese de Doutorado a que se submeteu a aluna **DANIELA MITI LEMOS TSUKUMO (RA-950414)**, aluna regularmente matriculada no Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Doutorado. Aos **vigésimo sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e oito**, com início às 09:00hs, no Anfiteatro do Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Examinadora para a prova em epígrafe, formada pelos Professores Doutores: Mario José Abdalla Saad, Presidente e Orientador, Ubiratan Machado, Sérgio Atala Dib,, Antonio Carlos Boschero, Wilson Nadruz Júnior, membros. Os trabalhos foram considerados abertos pelo Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, que agradeceu a presença de todos e passou a palavra a candidata para que expusesse seu trabalho de Tese, o qual teria a duração de "trinta minutos" e versou sobre o tema "**Mutação inativadora do TLR4 (Toll-like receptor 4) protege contra a obesidade e a resistência à insulina induzidas por dietas hiperlipídica**". A seguir deu-se início às arguições na seguinte ordem: Professor Doutor Ubiratan Machado, Professor Doutor Sérgio Atala Dib, Professor Doutor Antonio Carlos Boschero, Professor Doutor Wilson Nadruz Júnior e Professor Doutor Mário José Abdalla Saad que colocaram suas dúvidas, as quais foram sendo esclarecidas pela candidata. Logo após foi dado um intervalo de dez minutos para que os examinadores preferissem um parecer final. Considerando a candidata aprovada por unanimidade e levando em conta a relevância do trabalho apresentado, a Banca Examinadora houve por bem concluir pela aprovação. Portanto, a candidata foi considerada "Aprovada", fazendo jus ao Título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração **Ciências Básicas**. Para que o respectivo título possa ser concedido, com as prerrogativas legais dele advindas, é necessário que ocorra a entrega dos volumes definitivos no prazo de máximo de **60 dias**, a constar da data da defesa. Nada mais havendo a constar, eu, Cristiane Patrícia de Freitas, secretária da Subcomissão de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, lavrei a presente ata.

Campinas, 27 de fevereiro de 2008

Professor Doutor Ubiratan Machado _____

Professor Doutor Sérgio Atala Dib _____

Professor Doutor Antonio Carlos Boschero _____

Professor Doutor Wilson Nadruz Júnior _____

Professor Doutor Mário José Abdalla Saad _____

DEDICATÓRIA

Ao Daniel, meu esposo

Aos meus pais, Alfredo e Zeca

AGRADECIMENTOS

Ao professor Mário Saad pela orientação, incentivo, ensinamentos e amizade durante estes anos de convívio.

Ao professor José Barreto pelas discussões durante a elaboração deste trabalho e pela amizade.

Ao professor Lício pelos ensinamentos.

Ao professor Rui Curi por disponibilizar seu laboratório para a execução dos experimentos.

Ao Marco (Brahma) pelo apoio, amizade e incentivo.

À Patrícia Prada pela ajuda na realização dos experimentos e pela agradável convivência.

Ao Sandro pela indispensável colaboração neste trabalho.

Ao André pela ajuda na realização deste trabalho.

À Joseane pela contribuição essencial nos experimentos de RT-PCR.

À Andréia, ao Eduardo, ao Eli, à Fernanda, à Kellen, ao Marcelo, à Paula, à Rosa, ao Rodrigo e a todos os amigos do laboratório pelos bons momentos compartilhados.

Aos técnicos seu Luís e seu Jósimo pela disponibilidade e dedicação.

A todos os funcionários do biotério e, em especial ao Márcio, por ter me ensinado a manusear os animais no início deste trabalho e pelo cuidado com os animais.

Ao Daniel, meu esposo, pelo companheirismo, paciência e carinho.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo ao longo desses anos.

À Cinira e à Mônica, minhas amigas queridas, pelo apoio e pela amizade, mesmo que à distância.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xxi</i>
ABSTRACT.....	<i>xxv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	29
1.1- Obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2: Epidemiologia.....	31
1.2- Inflamação, Diabetes Mellitus e Obesidade.....	32
1.3- Ativação de vias inflamatórias e resistência à insulina.....	34
1.4- Intersecção entre sistema imune e sistema metabólico.....	37
1.5- Sistema Imune em Mamíferos.....	39
1.6- “Toll-like receptors” como PRRs.....	40
1.7- Vias de sinalização dos TLRs.....	43
1.8- TLR4.....	45
2- OBJETIVOS.....	47
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4- RESULTADOS.....	67
5- DISCUSSÃO.....	101
6- CONCLUSÕES.....	115
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
8- ANEXO.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

α -PY	Anti-fosfotirosina
μ Ci	MicroCuri
μ M	Micromolar
3 H	Trício
125 I	Isótopo de iodo 125
AGLs	Ácidos graxos livres
Akt/PKB	Proteína Serina/ treonina quinase B
BSA	Soro de Albumina Bovina
CD14	Proteína glicofosfatidilinositol co-receptora do LPS
CLS	“Crown-like structures”
C57BL/10ScCr	Camundongo “knockout” do TLR4
DH	Dieta Hiperlipídica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DP	Dieta Padrão
DTT	Ditiotreitol
E	Ácido Esteárico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	Ácido (hidroxi-piperazina)etanosulfônico
HSP70	Proteína do Choque Térmico 70

I	Insulina
IB	Immunoblot
IGTT	Teste de Tolerância à glicose intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INFs	Interferons
INF- γ	Interferon gama
IP	Imunoprecipitado
IRAK1	Quinase 1 associada ao receptor de IL-1
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor de IL-1
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRSs	Substratos do Receptor de Insulina
IR β	Receptor de Insulina
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
IKK β	Quinase β do inibidor do NF- κ B
I κ B α	Inibidor do NF- κ B
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
Kitt	Constante de decaimento da glicose
L	Ácido Láurico
LPS	Lipopolissacarídeo

LRR	“Leucine-rich-repeat”
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína 1 quimiotática de monócitos
MD-2	“Myeloid Differentiation-2”
MYD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear NF- κ B
OMS	Organização Mundial de Saúde
NS	Não significativo
P	Palmitato
PAMPs	“Pathogen-associated molecular patterns”
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRRs	“Patern recognition receptors”
PKC- δ	Proteína quinase C delta
PKC- θ	Proteína quinase C zeta
PMSF	Fenil-metilsulfonilfluoreto
QR	Quociente respiratório
RAGE	Produtos finais de glicação avançada
RBP-4	Proteína-4 ligadora de retinol
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SAA	Amilóide sérico A

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOCS	Supressor de Sinalização de citocina
SOCS-1	Supressor de Sinalização de citocina 1
SOCS-3	Supressor de Sinalização de citocina 3
SOCS-6	Supressor de Sinalização de citocina 6
TAB1	Proteína 1 ligadora da TAK1
TAB2	Proteína 2 ligadora da TAK1
TAB3	Proteína 3 ligadora da TAK1
TAK1	Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β
TICAM1	“TRIF/TIR-domain-containing molecule 1”
TIR	“Toll/IL-1R homology”
TIRAP	Proteína associada ao TIR
TLRs	“Toll-like receptors”
TLR4	“Toll-like receptor 4”
TLR4 ^{-/-}	“Knockout” do TLR4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	Molécula adaptadora relacionada à TRIF
TRIF	Proteína adaptadora que contém domínio TIR que induz interferon- β
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Estudos recentes demonstram que a obesidade está associada com a resistência à insulina e com um estado de inflamação crônica subclínica. Os “Toll-Like Receptors” (TLRs) têm um papel fundamental na ativação do sistema imune através do reconhecimento de antígenos de microorganismos. O TLR4 é um subtipo de TLRs que é ativado pelo lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas e por outros agonistas, como os ácidos graxos saturados. A ativação do TLR4 estimula vias inflamatórias relacionadas à indução de resistência à insulina, como a JNK e a IKK β .

Neste estudo, demonstrou-se que camundongos C3H/HeJ, que apresentam uma mutação inativadora do TLR4, estão protegidos da obesidade e da resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica. Além disso, músculos sóleos isolados de camundongos C3H/HeJ estão protegidos da resistência à insulina induzida por ácidos graxos.

Camundongos C3H/HeJ tratados com dieta hiperlipídica (DH) apresentam um menor ganho de peso, maior tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina em relação aos controles em DH. A análise morfométrica do tecido adiposo evidenciou que os adipócitos dos camundongos C3H/HeJ em DH são 30% menores em relação aos adipócitos dos camundongos controle tratados com a mesma dieta. Foi evidenciada uma maior fosforilação em tirosina do IRS-1 e maior fosforilação da Akt, após estímulo com insulina, em músculo, tecido adiposo e fígado de camundongos C3H/HeJ tratados com DH em relação aos controles. Observou-se uma maior ativação da JNK, da IKK β e da iNOS em músculo, tecido adiposo e fígado de animais controle tratados com DH quando comparado com camundongos C3H/HeJ tratados com a mesma dieta.

O tratamento com palmitato reduziu a captação de glicose e a síntese de glicogênio em 40-50% em músculo sóleo isolado de camundongos controle, mas este efeito não foi observado em músculo sóleo isolado de camundongos C3H/HeJ. Em resumo, o nosso estudo demonstra que a inativação do TLR4 previne a obesidade induzida por dieta, a ativação da IKK β , da JNK, a resistência

à insulina em camundongos em DH, além da resistência à insulina induzida por palmitato em músculo isolado. O estudo sugere que o TLR4 tem um papel importante na interligação entre o sistema imune inato e a resistência à insulina, sendo um possível alvo terapêutico para a obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2.

ABSTRACT

Obesity is associated with insulin resistance and a state of abnormal inflammatory response. The Toll-like receptor 4 (TLR4) has an important role in inflammation and immunity and its expression has been reported in most tissues of the body, including the insulin-sensitive ones. Since it is activated by lipopolysaccharide (LPS) and saturated fatty acids, which are inducers of insulin resistance, TLR4 may be a candidate for participation in the cross-talk between inflammatory and metabolic signals. Here, we show that C3H/HeJ mice, which have a loss-of-function mutation in TLR4, are protected against the development of diet-induced obesity. In addition, these mice demonstrate decreased adiposity, increased oxygen consumption, a decreased respiratory exchange ratio, improved insulin sensitivity and enhanced insulin signaling capacity in adipose tissue, muscle and liver, as compared to control mice during high fat feeding. Moreover, in these tissues, control mice fed on a high fat diet show an increase in IKK β and JNK activity, which is prevented in C3H/HeJ mice. In isolated muscles from C3H/HeJ a protection from saturated fatty acid-induced insulin resistance is observed. Thus, TLR4 appears to be an important mediator of obesity and insulin resistance and a potential target for the therapy of these highly prevalent medical conditions.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2: Epidemiologia

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a obesidade são doenças de alta prevalência na população e atualmente atingem proporções epidêmicas em todo o mundo.

Estimativas da OMS (Organização Mundial de Saúde) indicam que no mundo mais de um bilhão de adultos apresentam sobrepeso e, destes, 300 milhões são obesos (WHO, 2002). A obesidade predispõe o indivíduo a uma série de outras doenças como o diabetes mellitus tipo 2, a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia, a doença hepática gordurosa não-alcoólica, doenças cardiovasculares, asma, osteoartrite e certos tipos de câncer (Calle e Kaaks, 2004; Kopelman, 2000; Mannino et al., 2006; Wellen e Hotamisligil, 2005).

A incidência de diabetes mellitus tipo 2 aumentou muito nas duas últimas décadas e o DM2 afeta atualmente cerca de 150 milhões de pessoas no mundo (Zimmet et al., 2001). Estimativas para o ano de 2030 indicam um aumento da prevalência para 366 milhões de pessoas, com os maiores aumentos previstos nos países em desenvolvimento da América do Sul, África e Ásia (Wild et al., 2004; Zimmet et al., 2001).

Esta forma tão comum de diabetes mellitus é freqüentemente associada à obesidade e, as epidemias dessas duas doenças estão altamente relacionadas (Mokdad et al., 2003). Tanto obesidade como diabetes mellitus tipo 2 estão associados à resistência à ação da insulina, caracterizada por um prejuízo às ações normais da insulina (Reaven, 1988). Geralmente, o diabetes mellitus tipo 2 desenvolve-se quando a capacidade das células β de produzir insulina é insuficiente para sobrepujar este estado de resistência à insulina. O DM2 impõe altos custos médicos e socioeconômicos para o sistema de saúde. Além disso, as complicações associadas com a doença acarretam morbidade e mortalidade prematuras para os pacientes, principalmente por doenças cardiovasculares (Hogan et al., 2003).

1.2- Inflamação, Diabetes Mellitus e Obesidade

Há mais de um século, foi verificado que altas doses de salicilato sódico (5-7g/dia) diminuam a glicosúria em pacientes com a “forma mais leve do diabetes” (Shoelson, 2002), pressupostamente o DM2, indicando um possível envolvimento da inflamação na fisiopatologia do DM2.

Dados epidemiológicos que associam inflamação com obesidade e DM2 datam das décadas de 50 e 60, quando estudos epidemiológicos demonstraram aumento de proteínas de fase aguda na obesidade e no DM2 (Fearnley et al., 1959; Ogston e McAndrew, 1964). Estudos mais recentes correlacionam uma maior incidência do DM2 com o aumento de marcadores e mediadores da inflamação e proteínas de fase aguda como o fibrinogênio, proteína C reativa, interleucina-6 (IL-6) e com o aumento da contagem total de leucócitos (Pradhan et al., 2001; Schmidt et al., 1999; Tataranni e Ortega, 2005; Vozarova et al., 2002).

Durante a última década, estudos demonstraram que um estado de inflamação crônica subclínica está associado à obesidade, ao diabetes mellitus tipo 2 e à resistência à insulina (Wellen e Hotamisligil, 2005). Pesquisas realizadas nos últimos anos identificaram vias que ligam o sistema imune e o sistema metabólico. Em 1993, Hotamisligil et al e Feinstein et al evidenciaram que o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, tinha sua expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos obesos e que poderia induzir resistência à insulina. Foi verificado também que, como nos camundongos, o TNF- α também tem sua produção aumentada no músculo e tecido adiposo de humanos obesos (Hotamisligil et al., 1995; Kern et al., 1995; Saghizadeh et al., 1996). A administração de TNF- α recombinante para células em cultura ou para animais reduz a sensibilidade à insulina e, camundongos obesos que têm TNF- α não funcional ou que não têm receptores de TNF- α apresentam melhora da sensibilidade à insulina, quando comparados com camundongos controles (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997). O aumento da produção de

TNF- α no tecido adiposo, principalmente em modelos experimentais, é uma característica da obesidade e contribui para a resistência à insulina.

Estudos posteriores evidenciaram que, além do TNF- α , outros mediadores da inflamação e citocinas têm sua expressão aumentada no tecido adiposo e em outros tecidos em modelos experimentais de obesidade e em humanos, indicando que a obesidade é caracterizada por uma ampla resposta inflamatória (Dandona et al., 2004; Pickup, 2004).

A resposta inflamatória que emerge na presença da obesidade parece ser desencadeada no tecido adiposo. Originalmente considerado um depósito passivo de energia, atualmente o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, que se comunica com o sistema nervoso central e com tecidos periféricos através da secreção de substâncias que regulam o apetite e o metabolismo (Kershaw e Flier, 2004). O tecido adiposo é um sítio de produção de uma série de citocinas e outras substâncias bioativas, incluindo leptina, interleucina 6 (IL-6), resistina, adiponectina, visfatina, TNF- α , proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1), proteína-4 ligadora de retinol (RBP-4), amiloide sérico A (SAA) e outras (Fried et al., 1998; Fukuhara et al., 2005; Stepan et al., 2001; Tilg e Moschen, 2006; Yamauchi et al., 2001; Zhang et al., 1994). O tecido adiposo de humanos e camundongos obesos é caracterizado por um infiltrado de macrófagos, que são uma fonte adicional de citocinas e outros mediadores solúveis (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Foi observado que, em camundongos e indivíduos obesos, os macrófagos se agregam em “crown-like structures” (CLS), que contêm até 15 macrófagos em torno de um adipócito (Cinti et al., 2005). As CLS localizam-se exclusivamente ao redor de adipócitos que sofreram necrose (Cinti et al., 2005). Foi também evidenciada a formação de células gigantes multinucleadas na circunvizinhança de gotículas de gordura de adipócitos necrosados, sugerindo que os macrófagos possam ter um papel na limpeza de lipídeos residuais.

1.3- Ativação de vias inflamatórias e resistência à insulina

A insulina exerce suas ações através da sua ligação com o receptor de insulina (IR) na superfície das células. O receptor de insulina se autofosforila e fosforila vários substratos da família do receptor de insulina (IRS), iniciando uma cascata sinalizatória que permite as ações normais da insulina (Saltiel e Pessin, 2002; White, 1997). A inibição da sinalização abaixo do receptor de insulina é um mecanismo pelo qual a inflamação causa resistência à insulina.

A fosforilação inibitória do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) em serina pode ocorrer após a exposição de células ao TNF- α ou a altos níveis de ácidos graxos livres (AGLs) (Aguirre et al., 2000; Hotamisligil et al., 1996; Yin et al., 1998). Esta fosforilação do IRS-1 em serina reduz sua fosforilação em tirosina em resposta à insulina e sua capacidade de se associar com o IR, bloqueando a sinalização e ação da insulina (Aguirre et al., 2002; Paz et al., 1997).

Várias serina/treonina quinases que são ativadas por estímulos inflamatórios na obesidade e em outras condições de resistência à insulina contribuem para a inibição da sinalização da insulina através da fosforilação do IRS-1 em serina, incluindo a JNK (c-Jun NH₂-terminal quinase), a IKK β (quinase β do inibidor do NF- κ B) e a proteína quinase C convencional (Aguirre et al., 2000; Aguirre et al., 2002; Gao et al., 2002; Griffin et al., 1999; Hirosumi et al., 2002). A ativação dessas quinases na obesidade ressalta a interligação entre as vias imunes e metabólicas, pois estas são as mesmas quinases (principalmente a JNK e a IKK β) que são ativadas na resposta imune inata pelos Toll-like receptors (TLRs) após sua ligação com o lipopolissacarídeo (LPS), peptídeoglicano e outros produtos microbianos (Medzhitov, 2001).

Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β (interleucina-1 β) ativam a JNK e a IKK β , através dos mecanismos clássicos mediados por seus receptores. Porém, essas quinases também podem ser ativadas por “Pattern recognition receptors” (PRRs) como os TLRs e o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) (Akira et al., 2006).

A obesidade é associada com o aumento da atividade da JNK no tecido adiposo, fígado, músculo e no hipotálamo (Hirosumi et al., 2002; Prada et al., 2005). A JNK é ativada por citocinas como o TNF- α , por AGLs e por estresse do retículo endoplasmático (Aguirre et al., 2000; Gao et al., 2004; Ozcan et al., 2004). Camundongos obesos com deficiência genética da JNK-1 estão protegidos da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (DH) ou geneticamente induzida (camundongos ob/ob), da fosforilação do IRS-1 em serina do e do desenvolvimento do diabetes (Hirosumi et al., 2002). Inibidores da JNK melhoram a sensibilidade à insulina em camundongos com resistência à insulina (Kaneto et al., 2004).

A IKK β pode bloquear a sinalização da insulina por pelo menos dois mecanismos. Primeiramente, a IKK β pode fosforilar diretamente o IRS-1 em resíduos de serina (Gao et al., 2002; Yin et al., 1998). Além disso, a IKK β pode fosforilar o inibidor do NF- κ B (I κ B), que sofre degradação e libera o NF- κ B para translocação para o núcleo, onde este promove a expressão de vários genes alvo que induzem resistência à ação da insulina, incluindo o TNF- α e a IL-6 (interleucina 6). Camundongos heterozigotos IKK $\beta^{+/-}$ ficam protegidos da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica, infusão de lípidos ou obesidade genética (Kim et al., 2001; Yuan et al., 2001). A inibição da IKK β pela administração de altas doses de salicilatos melhora a ação da insulina em modelos experimentais e em humanos (Hundal et al., 2002; Yuan et al., 2001). A inibição do NF- κ B em macrófagos ou no fígado, através da expressão tecido-específica de um I κ B α inibitório dominante ou da deleção/ supressão tecido-específica da IKK β , diminui a expressão de genes inflamatórios e a resistência à insulina em animais tratados com DH (Arkan et al., 2005; Cai et al., 2005).

A proteína quinase C também é importante na interação entre inflamação e metabolismo e tem sido implicada como a quinase responsável por transmitir sinais lipídicos (Boden et al., 2005; Kim et al., 2004; Yu et al., 2002).

Lipídeos derivados dos ácidos graxos, como o diacilglicerol, podem ativar a PKC- θ (PKC zeta) em músculo ou a PKC- δ (PKC delta) no fígado e inibir a ação da insulina (Boden et al., 2005; Yu et al., 2002). Camundongos com deficiência genética da PKC- θ são protegidos da resistência à insulina induzida por AGLs (Kim et al., 2004). A PKC- θ ativa a IKK β , podendo contribuir para a resistência à insulina por estimular esta via.

Além da ativação das serina/treonina quinases, outras vias contribuem para a resistência à insulina induzida pela inflamação. Três membros da família da SOCS (supressor da sinalização de citocina), incluindo a SOCS-1, SOCS-3 e SOCS-6 foram implicadas na supressão da sinalização da insulina mediada por citocinas (Emanuelli et al., 2001; Mooney et al., 2001; Rui et al., 2002). Essas moléculas parecem inibir a sinalização da insulina interferindo com a fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2 ou através do direcionamento do IRS-1 e do IRS-2 para degradação proteossômica (Rui et al., 2002; Ueki et al., 2004). A SOCS-3 também apresenta um papel na regulação da ação central da leptina. Camundongos heterozigotos SOCS3^{+/-} e camundongos com deficiência neuronal da SOCS-3 mostram proteção contra a obesidade e resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica (Howard et al., 2004; Mori et al., 2004)

Citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e INF- γ) aumentam a produção de óxido nítrico através da indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em músculo esquelético de ratos e cultura de miócitos e adipócitos (Bedard et al., 1997; Kapur et al., 1997; Kapur et al., 1999). A indução da iNOS foi associada com a redução da captação de glicose estimulada por insulina em cultura de miócitos (Bedard et al., 1997). A ablação genética da iNOS em camundongos protege da resistência à insulina induzida por dieta (Perreault e Marette, 2001). Recentemente, Carvalho-Filho et al (2005) demonstraram que, em animais submetidos à dieta hiperlipídica e em camundongos ob/ob, ocorre aumento da ativação da iNOs em tecido muscular. Os autores observaram que proteínas da via de sinalização da insulina, como o IR, o IRS-1 e a proteína serina/treonina quinase B (Akt/PKB) podem sofrer S-nitrosação,

o que contribui para reduzir a sinalização da insulina via IR/IRS-1/Akt em tecido muscular. Além disso, a S-nitrosação pode levar o IRS-1 à degradação, justificando os níveis reduzidos de IRS-1 no músculo destes animais. O bloqueio da indução da iNOS por rosiglitazona em camundongos com obesidade induzida por dieta, diminui o desenvolvimento de resistência à insulina e impede a S-nitrosação de proteínas da via de sinalização da insulina (Carvalho-Filho et al., 2005).

1.4- Intersecção entre sistema imune e sistema metabólico

A sobrevivência de organismos multicelulares depende da capacidade de debelar infecções e de armazenar energia para períodos de escassez alimentar e alto gasto energético. Os sistemas imunes e metabólicos estão, portanto, entre os mais indispensáveis para a sobrevivência dos animais e muitos mecanismos responsáveis pela detecção de patógenos e de nutrientes são altamente conservados de organismos como o helminto *Caenorhabditis elegans* e da *Drosophila* até os mamíferos. A habilidade de combater infecções levou à seleção de respostas imunes potentes, particularmente após declínios maciços da população durante períodos de pandemias e epidemias por doenças infecciosas (Beutler, 2004b; Levin et al., 1999). A fome foi uma ameaça à saúde humana ao longo de toda a história e houve a seleção de um sistema metabólico com alta capacidade de armazenar energia e excesso de calorias. Desta forma, a combinação desses traços criou uma organização biológica que é altamente capaz de processar e armazenar energia e tem um sistema imune potente e às vezes hiper-sensível.

Durante os períodos de fome prolongada, que assolaram a humanidade, uma vantagem foi conferida por genes que favorecem o uso econômico e o armazenamento da energia, os chamados genes poupadores (Zimmet e Thomas, 2003). A existência dos genes poupadores foi proposta inicialmente por Neel (1962), que evidenciou a glicose como um eficiente

combustível biológico. Ele sugeriu que pressões evolutivas, para preservar a glicose como combustível para o cérebro durante períodos de fome, levaram a uma propensão genética que favorece a resistência à insulina em tecidos periféricos (Neel, 1962).

Estilos de vida sedentários e consumo irrestrito de alimentos com alta densidade energética, ricos em gorduras saturadas e carboidratos simples, como ocorre na sociedade atual, podem tornar este estado metabólico, antes vantajoso, em nocivo à saúde. Além disso, é sugerido que os genes poupadores, que trouxeram uma vantagem de sobrevivência para a humanidade, possam ser responsáveis pelas epidemias de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 que atualmente acometem a população de todo o mundo (Zimmet e Thomas, 2003).

A inter-relação íntima entre os sistemas imune e metabólico tem muitas bases evolutivas. As unidades funcionais, que controlam atividades imunes e metabólicas chave em organismos superiores, evoluíram de estruturas ancestrais comuns. Uma destas estruturas é o “corpo gorduroso da *Drosophila*”, que incorpora homólogos do fígado e dos sistemas imune e hematopoiético em mamíferos (Leclerc e Reichhart, 2004; Sondergaard, 1993). Esta estrutura também inclui o equivalente ao tecido adiposo em mamíferos. O “corpo gorduroso da *Drosophila*” é o local de coordenação de respostas imunes e metabólicas. Em organismos superiores, o fígado, tecido adiposo e sistema hematopoiético se especializaram em órgãos ou unidades funcionais distintas. Entretanto, é interessante ressaltar que tanto fígado como tecido adiposo apresentam uma organização arquitetural em que células metabólicas (adipócitos ou hepatócitos) estão em proximidade com células imunes (macrófagos ou células de Kupffer) e que ambos têm acesso a uma vasta rede de vasos sanguíneos. Esta configuração permite interações contínuas e dinâmicas entre respostas imunes e metabólicas e é possível aventar que vias comuns ou superpostas regulam funções imunes e metabólicas através de sistemas sinalizatórios comuns. Isto pode permitir que nutrientes interajam com sistemas responsáveis pela detecção de patógenos,

como os Toll-like receptors (TLRs), desencadeando respostas inflamatórias (Beutler, 2004 b; Shi et al., 2006; Song et al., 2006).

A integração do metabolismo e da imunidade é vantajosa em condições normais porque durante uma resposta imune ou inflamatória pode ser necessária a redistribuição da energia, com mobilização dos lipídeos armazenados (Khovidhunkit et al., 2004). A resposta inflamatória favorece, portanto, um estado catabólico, com supressão de vias anabólicas, como a via da sinalização da insulina. Contudo, a interligação entre os sistemas metabólico e imune depende de um balanço delicado e, distúrbios crônicos da homeostase metabólica, como ocorre na obesidade, podem desencadear respostas imunes aberrantes, responsáveis pelo surgimento de doenças inflamatórias relacionadas à obesidade como o diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose e doença hepática gordurosa não-alcoólica (Wellen e Hotamisligil, 2005).

1.5- Sistema Imune em Mamíferos

O sistema imune em mamíferos é composto por duas divisões: a imunidade inata e a imunidade adquirida.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão por patógenos e é mediado por fagócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas. A imunidade adquirida é responsável pela eliminação dos patógenos na fase mais tardia da infecção, assim como pela geração de memória imunológica. A imunidade adquirida é caracterizada pela especificidade. A resposta imune inata não é completamente inespecífica como se supunha originalmente, mas é capaz de discriminar entre o 'próprio' e uma variedade de patógenos (Aderem e Ulevitch, 2000; Hoffmann et al., 1999; Medzhitov e Janeway, 1997b). O sistema imune inato identifica os microorganismos através de um número limitado de receptores ("PRRs"- pattern-recognition receptors) que reconhecem componentes específicos dos microorganismos. Os "PRRs"

distinguem padrões moleculares associados aos patógenos (“PAMPs”- pathogen-associated molecular patterns) que são essenciais à sobrevivência do microorganismo, o que dificulta a modificação pelo microorganismo. Os PRRs são expressos constitutivamente no hospedeiro e detectam patógenos independente do estágio no ciclo de vida. Diferentes PRRs reagem com PAMPs específicos, apresentam padrões de expressão distintos, ativam vias de sinalização específicas e levam a diferentes respostas contra os microorganismos.

1.6- “Toll-like receptors” como PRRs

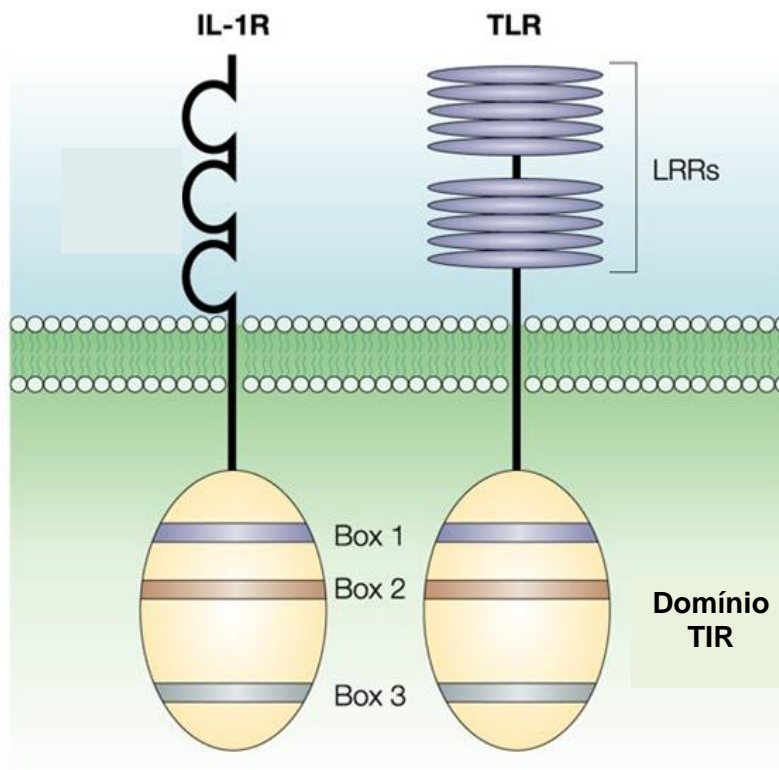
Os “Toll receptors” são proteínas transmembranas responsáveis pela detecção da invasão do organismo por patógenos em plantas, insetos e mamíferos. Esses receptores são conservados ao longo da evolução desde o helminto *Caenorhabditis elegans* até os mamíferos (Akira e Takeda, 2004; Beutler, 2004a; Hoffmann, 2003; Janeway e Medzhitov, 2002).

Os “Toll receptors” foram inicialmente identificados na *Drosophila* como receptores essenciais para o estabelecimento do desenvolvimento dorso-ventral dos embriões (Hashimoto et al., 1988). Em 1996, Lemaitre et al demonstraram que moscas com mutação no “Toll” eram mais susceptíveis à infecção fúngica. Posteriormente, homólogos dos “Toll receptors” foram identificados em mamíferos e designados “Toll-like receptors” (TLRs) (Medzhitov et al., 1997a). A análise funcional dos TLRs demonstrou que esses receptores são responsáveis pelo reconhecimento de padrões específicos de componentes microbianos que são conservados entre os microorganismos, mas que não estão presentes nos mamíferos. Atualmente existem 12 membros da família dos TLRs identificados em mamíferos.

Os TLRs são glicoproteínas de membrana caracterizados por um domínio extracelular contendo um número variado de repetições de leucinas (“leucine-rich-repeat”-LRR) e um domínio citoplasmático ou intracelular homólogo

ao receptor de interleucina 1 (IL-1R) denominado domínio “Toll/IL-1R homology” (TIR) (Bowie e O'Neill, 2000) (**Esquema. 1**). Os domínios LRR são compostos por 19-25 repetições de leucinas com 24-29 aminoácidos cada. Estes domínios são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs de bactérias, parasitas, fungos e vírus.

Os TLRs reconhecem coletivamente lipídeos, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos expressados em diferentes grupos de microorganismos. Os TLRs podem ser divididos em subfamílias que reconhecem PAMPs relacionados. A subfamília composta por TLR1, TLR2 e TLR6 reconhece lipídeos. TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem ácidos nucleicos. O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, as proteínas de choque térmico (heat-shock proteins) e o fibrinogênio, entre outros ligantes (Akira e Takeda, 2004; Takeda et al., 2003b).



Esquema 1- Receptor de Interleucina-1 (IL-1R) e “Toll-like receptors”

(Adaptado de Akira S; Takeda K, Nature Reviews Immunology, 2004)

Os TLRs são expressos em várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e tipos específicos de linfócitos T. A expressão dos TLRs também é observada em outros tipos de células como adipócitos, células endoteliais, cardiomiócitos, células do epitélio intestinal (Takeda et al., 2003b). A expressão dos TLRs não é estática, sendo modulada rapidamente em resposta a patógenos, citocinas e estresse do ambiente. Além disso, os TLRs podem ser expressos no intra e extracelular. Alguns TLRs (TLRs 3, 7, 8 e 9) encontram-se quase que exclusivamente nos compartimentos intracelulares (Akira e Takeda, 2004).

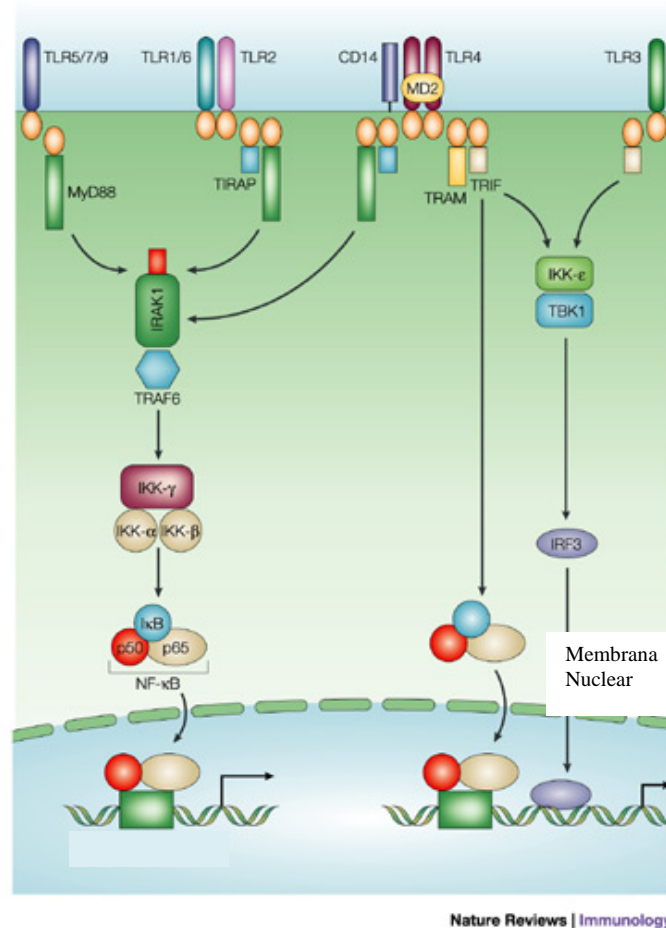
Evidências crescentes indicam que os TLRs podem ser ativados por ligantes endógenos, desencadeando resposta imune. Sinais de células lesadas ou sob estresse podem iniciar a resposta imune, mesmo na ausência de infecção. Estes sinais podem ser gerados quando as células sofrem necrose, iniciando respostas imunes e inflamatórias, em contraste com a morte fisiológica via apoptose, que não desencadeia inflamação (Akira et al., 2001).

1.7- Vias de sinalização dos TLRs

A associação dos TLRs com seus ligantes ativa duas vias sinalizatórias distintas, a via dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a via independente do MyD88 (Akira e Takeda, 2004). Após sua ativação, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras contendo um domínio TIR para o domínio TIR do TLR. Há quatro moléculas adaptadoras que exercem este papel: o MyD88, a proteína associada ao TIR (TIRAP/MyD88-adaptor like), a proteína adaptadora que contém domínio TIR que induz interferon- β (TRIF/TIR-“domain-containing molecule 1” (TICAM1) e a molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM) (Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). O MyD88 e o TRIF são responsáveis pela ativação de vias sinalizatórias diferentes, que acarretam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (INFs), respectivamente.

O MyD88 é crítico para a sinalização de todos os TLRs, exceto para a sinalização do TLR3 (Akira et al., 2006). Depois da ativação do TLR, o MyD88 liga-se ao domínio citoplasmático dos TLRs, o que facilita a associação da quinase 4 associada ao receptor de IL-1 (IRAK4) com o receptor. A ligação do MyD88 com a IRAK4 permite a fosforilação de resíduos na quinase 1 associada ao receptor de IL-1 (IRAK1), induzindo a atividade quinase da IRAK1. A IRAK1 ativada autofosforila resíduos na sua região N-terminal e esta hiperfosforilação da IRAK1 possibilita a ligação do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) ao complexo (Akira e Takeda, 2004). O complexo IRAK1-TRAF6 desliga-se do

receptor e interage na membrana plasmática com outro complexo pré-formado que inclui a quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β (TAK1), a proteína 1 ligadora da TAK1 (TAB1) e a proteína 2 ligadora da TAK1 (TAB2) ou a proteína 3 ligadora da TAK1 (TAB3). Esta interação induz a fosforilação da TAB2/TAB3 e da TAK1, que se desloca em conjunto com o TRAF6 e TAB1 para o citoplasma. A TAK1 é ativada no citoplasma, possibilitando a ativação da kinase β do inibidor do NF- κ B (IKK β) e conseqüentemente do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Akira et al., 2006). A ativação da TAK1 também permite a ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo a c-Jun NH2-terminal quinase (JNK) (**Esquema. 2**).



Esquema 2- Sinalização intracelular dos “Toll-like receptors”

(Adaptado de Akira S; Takeda K, Nature Reviews Immunology, 2004)

1.8- TLR4

O TLR4 é um subtipo de TLR que é responsável pelo reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Dois grupos de pesquisadores independentes identificaram mutações no gene do TLR4 como responsáveis pela diminuição da resposta ao LPS em duas linhagens de camundongos, C3H/HeJ e C57BL/10ScCr (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). Os camundongos C3H/HeJ apresentam uma mutação de ponto no gene do TLR4, na região que codifica a porção intracelular do receptor, com a substituição de uma prolina altamente conservada por uma histidina. Esta mutação gera um alelo dominante negativo, defeitos na sinalização do TLR4 e, conseqüentemente, supressão da resposta ao LPS (Hoshino et al., 1999). A outra linhagem de camundongos que é hipo-responsiva ao LPS, o C57BL/10ScCr, tem a deleção do gene inteiro do TLR4 (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

Além do LPS, o TLR4 reconhece uma série de outros ligantes como proteínas do envelope viral (Rassa et al., 2002), a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório (Haynes et al., 2001; Kurt-Jones et al., 2000), ligantes endógenos como a proteína do choque térmico 70 (HSP70) (Asea et al., 2002; Vabulas et al., 2002) e o fibrinogênio (Smiley et al., 2001). Recentemente, também foi observado que ácidos graxos saturados podem ativar o TLR4 (Lee et al., 2001).

O reconhecimento do LPS pelo TLR4 requer a contribuição de outras moléculas. O LPS interage com a proteína ligadora de LPS presente no soro e o complexo formado por LPS e proteína ligadora de LPS é reconhecido pela CD14, uma molécula glicofosfatidilinositol que fica ancorada na superfície de macrófagos/monócitos e neutrófilos (Takeda et al., 2003b). A MD-2 (“Myeloid Differentiation-2”) é uma glicoproteína que se associa com a porção extracelular do TLR4 e aumenta a resposta ao LPS (Akashi et al., 2000; Shimazu et al., 1999). Camundongos que não expressam a MD-2 são resistentes ao choque séptico induzido por LPS, como os camundongos que não expressam o TLR4 (Nagai et al., 2002), demonstrando que a MD-2 é essencial na resposta ao LPS.

Os “Toll-like receptors” são fundamentais para ativação do sistema imune inato em mamíferos através do reconhecimento de PAMPs. O TLR4 é um subtipo de TLR que é ativado por ácidos graxos saturados e pelo LPS, que são indutores de resistência à ação da insulina. Portanto, pode-se pressupor que o TLR4 participe na interligação entre sistema imune inato e metabólico. Entretanto, o papel do TLR4 na conexão entre sistema imune inato e resistência à insulina ainda não foi estabelecido.

2- OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram investigar em camundongos C3H/HeJ, que apresentam uma mutação inativadora no TLR4, os efeitos do tratamento com dieta hiperlipídica (DH) no ganho de peso, sensibilidade à insulina, morfologia do tecido adiposo e ativação de proteínas da via inflamatória nos tecidos muscular, adiposo e hepático. Além disso, foi avaliado o efeito de ácidos graxos saturados na captação de glicose e sinalização insulínica em músculo isolado de camundongos C3H/HeJ e seus controles.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais

Camundongos machos C3H/HeJ, C3H/HeN, C57Bl/10ScCr e seus controles específicos foram obtidos do laboratório Jackson e providos pela Universidade de São Paulo.

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas. Os camundongos foram mantidos sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C.

Camundongos C3H/HeJ e seus controles específicos (C3H/HeN) foram divididos em dois grupos, com pesos similares, para receber dois tipos de dieta: ração padrão para camundongos e água à vontade ou dieta hiperlipídica com 55% de calorias provenientes de gordura, 29% de carboidratos e 16% de proteínas. O peso e a ingestão alimentar foram avaliados semanalmente.

Anticorpos, reagentes químicos e materiais

A insulina regular humana (Humulin R) foi adquirida da Lilly. Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), triton X-100, tween 20, colagenase tipo II e glicerol foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (^{125}I) foi adquirida da Amersham (Amersham, UK) e a proteína A sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, $0.45 \mu\text{m}$) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da Cristália (Itapira/SP, Brasil). O TRIzol® foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA). O ácido (hidroxi-piperazina) etanosulfônico (HEPES) foi obtido da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha). Os anticorpos anti-IR, IRS-1, anti-fosfotirosina, anti-Akt, anti-I κ B α , anti-JNK, anti-fosfo-JNK, anti-TLR4,

anti-MYD88, anti-fosfo-c-Jun foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Anti-Akt [Ser473] foi adquirido da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), anti-F4/80 foi adquirido da Abcam (Cambridge, MA, USA) e anti-fosfo-IRS-1^{ser307} foi adquirido da Upstate Biochnology (Lake Placid, NY, USA).

Soluções utilizadas

Tampão de Extração

O tampão de extração para extrato total e imunoprecipitado foi utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados. Este tampão contém: trisma base pH 7,5 (hidroximetil aminometano) 100 mM, EDTA (Ácido etileno-diaminotetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 1%, ortovanadato de sódio 10 mM e aprotinina 0,1mg/ml. A solução foi mantida a 4°C e o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram adicionados no momento do uso.

Tampão de Laemmli (5X)

O tampão de Laemmli foi usado para estocar o material extraído e para a sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE). Contém azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta solução contém: trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída a 1:4.

Solução tampão para transferência

Esta solução é empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose e contém: trisma base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi mantida estocada a 4°C.

Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (“resolving”)

O tampão é composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (“stacking”) das proteínas

O tampão contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

Solução basal

Solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Esta solução contém: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, tween 20 0,02%.

Solução bloqueadora

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado

Esta solução contém: trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e triton X-100 0,5%.

Solução para anticorpos

Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

Solução com proteína A marcada com ¹²⁵I

Permite a visualização das bandas em auto-radiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 2 µCi de proteína A ¹²⁵I.

Dosagem de Leptina, Insulina, Adiponectina, IL-6, TNF- α e Ácidos Graxos Livres

As concentrações de leptina, insulina e adiponectina foram determinadas por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (LINCO, Billerica, MA, USA). A concentração sérica de ácidos graxos livres foi avaliada com o kit NEFA-Kit-U (Wako Chemical GmbH, Neuss, Germany) com o ácido oléico como o padrão. As glicemias foram medidas a partir do sangue venoso com um monitor de glicemia (Glucometer, Bayer). Foram determinadas as concentrações séricas de IL-6 (interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) através de ELISA (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA).

Consumo de oxigênio e Quociente Respiratório (QR) em camundongos C3H/HeJ e controles

O consumo do oxigênio foi medido através do analisador de gases (Columbus Instruments' Oxymax Deluxe System, Ohio, USA), em camundongos submetidos a jejum alimentar de quatro horas. Os fluxos foram ajustados de acordo com o peso do animal para manter mudanças na composição dos gases expirados menos de 0,05%. O medidor de fluxo foi previamente calibrado com gases de concentrações conhecidas. Após 10 minutos de estabilização dos gases no interior da câmara, o consumo de O₂ foi determinado a cada minuto por um período de 15 minutos.

Microscopia Óptica

Após jejum alimentar de 12 horas, os camundongos foram anestesiados com uma overdose de tiopental sódico e a cavidade abdominal aberta para a dissecação do tecido adiposo peri-epididimal. Depois da dissecação, o tecido adiposo peri-epididimal foi fixado por imersão em formaldeído 4% com tampão fosfato 0,1M (PH 7,4), por um período de até 24 horas. Em seguida, o tecido foi automaticamente processado em aparelho histotécnico e submetido à desidratação, diafanização e impregnação por parafina, por meio de banhos consecutivos em alcoóis de concentrações crescentes, xilol e parafina. Por fim, o tecido foi incluído em blocos de parafina e foram obtidas secções de cinco micrômetros de espessura, que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para se verificar a morfologia do tecido adiposo.

Morfometria

As secções de tecido adiposo foram avaliadas com um microscópio de luz Zeiss Axiophot com uma objetiva de 40X e as imagens digitais foram obtidas com uma Canon PowerShot G5. Foi avaliada a presença de “Crown-like structures” (CLS), que são compostas por macrófagos em torno de adipócitos

individuais, formando uma 'coroa' de macrófagos (Cinti et al., 2005). A densidade das CLS (média de CLS em 10 campos de maior aumento, por animal) e a área média dos adipócitos (área média de 30 adipócitos escolhidos aleatoriamente, por animal) foi determinada, utilizando o software Imagelab Analysis (versão 2.4), como previamente descrito (Schenka et al., 2005).

Microscopia Eletrônica

A análise ultra-estrutural do tecido adiposo foi realizada conforme os procedimentos padrões, descritos anteriormente (Metze e Andrade, 1991). Em resumo, pequenos fragmentos de tecido adiposo (1x1mm) foram fixados na solução de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5 % e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato a 0,1M) por quatro horas. Em seguida, os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% por duas horas e deixados durante a noite em solução de acetato de uranila a 0,5%. Os blocos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 30 min; 50%, 15 min; 90%, 15 min; anidra I, 15 min; anidra II, 15 min) e embebidos em uma resina epóxida (Araldite[®], Huntsman Advanced Materials, SP, Brasil). Cortes semifinos de 1 μM foram obtidos em ultramicrotomo, corados com azul de toluidina a 1% e examinadas com o microscópio de luz com o intuito de selecionar os campos de interesse para os cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre, corados com citrato de chumbo e observados ao microscópio de transmissão (Zeiss EM10) do Departamento de Anatomia Patológica do HC-Unicamp, a 60kV.

Separação do Tecido Adiposo em Estroma Vascular e Adipócitos

A separação do tecido adiposo foi realizada conforme descrito previamente por (Lumeng et al., 2007). O tecido adiposo peri-epididimal foi dissecado, cortado em pequenos pedaços e imerso em tampão fosfato salino (PBS) com albumina 0,2%. As suspensões teciduais foram centrifugadas a 1000

g, 20⁰C por cinco minutos para remover eritrócitos e leucócitos livres. Colagenase tipo II (Sigma-Aldrich) foi adicionada à suspensão tecidual na proporção de 2mg/ml e incubada a 37⁰C por 30 minutos. A suspensão tecidual foi filtrada através de um filtro de nylon com poros de 180 µM e então centrifugada por 10 minutos a 600 g, 20⁰C para a separação de adipócitos (sobrenadante) e estroma vascular (“pellet”). Para assegurar a separação apropriada das frações, a fração dos adipócitos foi examinada por microscopia óptica.

PCR Real Time

RNA total foi obtido das frações adipócitos e estroma vascular do tecido adiposo dos camundongos, de acordo com métodos descritos anteriormente (Bertelli et al., 2006; Weisberg et al., 2003). As duas frações do tecido adiposo isoladas foram colocadas em TRIzol® (Invitrogens Corp., Carlsbad, California, USA) e o RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado por um espectrofotômetro. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 1%. e a intensidade de fluorescência da relação 28S/18S do RNA ribossômico foi determinada (Eagle Eye; Stratagene, La Jolla, CA). PCR quantitativo foi realizado para determinar as expressões de TNF- α e IL-6 nas duas frações do tecido adiposo utilizando primers comercialmente disponíveis (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Mm00443258_m1 e Mm00446190_m1, respectivamente. O gene de referência foi o GAPD (TaqMan, Applied Biosystems). Os resultados foram expressos como valores relativos, de acordo com o método previamente publicado (Weisberg et al., 2003).

Preparação de Extratos Nucleares

A obtenção dos extratos nucleares foi realizada conforme descrito anteriormente (Carvalho et al., 2001) com pequenas modificações. Os tecidos adiposo e muscular foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio

líquido. Os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido com ajuda de cadinho e pistilo e homogeneizados em 10 volumes de tampão A (HEPES 10mM, pH 7,9, cloreto de potássio 10mM, DTT 1mM, cloreto de magnésio 1,5 mM, PMSF 1mM, 10µg/ml de aprotinina e ortovanadato de sódio 1mM). O material homogeneizado foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 4^oC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado (extrato citoplasmático) e congelado a -80^oC. O “pellet” foi resuspendido em cerca de 400 µl e submetido à nova centrifugação a 2000 g por 10 minutos a 4^oC. Em seguida, o “pellet” foi resuspendido em tampão B (HEPES 20mM, pH 7,9, cloreto de sódio 0,42M, cloreto de potássio 10mM, DTT 1mM, glicerol 20%, 10µg/ml de aprotinina e ortovanadato de sódio 1mM) e homogeneizado com seringas e agulhas. As amostras foram mantidas em agitação contínua por 30 minutos a 4^oC e após este período foram novamente centrifugadas a 16000 g por 30 minutos a 4^oC. O sobrenadante foi retirado e utilizado para determinar a concentração protéica do extrato nuclear (Bradford, 1976) e guardado a -80^oC.

Determinação da ativação do NF-κB

A ativação da subunidade p50 do NF-κB foi determinada em extratos nucleares de músculo e tecido adiposo por ELISA (Pierce Biotechnology-89858), de acordo com as recomendações do fabricante.

Teste de tolerância à insulina Intraperitoneal (ITT)

Após oito semanas de dieta hiperlipídica, foi realizado teste de tolerância à insulina nos camundongos submetidos a jejum de seis horas. Depois de coletado sangue da cauda (tempo 0), foi injetada insulina (1,5 U/1000g de peso corpóreo) na cavidade peritoneal. Em seguida, foram coletadas amostras nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da glicose plasmática. A razão da constante de decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula

0.693/t_{1/2}. A glicose t_{1/2} foi calculada usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear (Bonora et al., 1987).

Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (IGTT)

O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum noturno de 12 a 14 horas. Os animais foram anestesiados e em seguida tiveram coletada pequena amostra de sangue por secção da cauda para medir a glicemia basal (tempo 0). Injetamos glicose intraperitoneal (1g/1000g de peso corpóreo) e dosamos a glicemia nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 seguintes. Os níveis de insulina foram medidos em diferentes pontos durante o IGTT.

Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação

Após jejum alimentar, não hídrico, de 12-14 horas, os animais foram submetidos à anestesia por administração intraperitoneal de solução contendo tiopental sódico (50 mg/Kg de peso corporal) e utilizados após a abolição do reflexo corneano, caudal e retirada a dor da pata.

A insulina foi injetada via intraperitoneal (3,8U/kg de peso corpóreo) e após cinco minutos foram retirados os tecidos na seguinte ordem: músculo (gastrocnemius), tecido adiposo peri-epididimal e fígado. Os animais controle negativo (sem insulina) receberam 0,1 ml de solução salina (NaCl 0,9%). Os tecidos retirados foram colocados em tubo tipo “falcon” contendo tampão de extração e foram homogeneizados por 20 segundos com processador tipo “polytron”, operado em velocidade máxima. Ao final da extração, foi adicionado triton X-100 1% em todas as amostras, que foram mantidas em gelo. Após 40 minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação.

Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm, a 4^oC por 40 minutos para remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação da concentração de proteínas. Foram utilizados 20 µl do sobrenadante para a quantificação protéica de cada amostra, através do método do biureto. Uma parte do sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação. A outra parte do sobrenadante foi utilizada para a separação das proteínas em SDS-PAGE. Para aplicação no SDS-PAGE, o sobrenadante foi armazenado em alíquotas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200mM, na proporção de 1:5 (400 µl do sobrenadante em 100 µl do tampão de Laemmli com DTT), mantidos a 4^oC até a aplicação no gel de poliacrilamida.

A seguir, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose, banhadas com tampão de transferência durante 120 min a 120 V em gelo, utilizando o equipamento de eletro-transferência do minigel da Bio-Rad. Após transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução tris-salina (solução basal) durante duas horas e depois foram lavadas com solução tris-salina em três sessões de cinco minutos. As membranas foram incubadas durante a noite, sob agitação contínua, a 4^oC, com os anticorpos antifosfotirosina, anti p-Akt, anti p-JNK, anti IκBα, anti IRS-1 Ser³⁰⁷, anti MYD88, anti TLR4. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução basal por três vezes em sessões de cinco minutos e incubadas a seguir com solução de proteína A, marcada com ¹²⁵I, durante duas horas à temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e as membranas foram expostas ao filme de RX (Kodak XAR-Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightining Plus intensifying screens-DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80^oC. Após aproximadamente cinco dias, os filmes foram revelados na forma convencional. Após a revelação das auto-radiografias, as bandas obtidas foram quantificadas, utilizando-se o programa ScionCorp. Os dados numéricos obtidos, correspondentes às bandas protéicas, foram comparados estatisticamente como descrito abaixo.

Imunoprecipitação

Uma parte do sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação com anti-IRS-1, anti-IR, TLR4 e MyD88. Os volumes das amostras utilizadas para imunoprecipitação foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas com os anticorpos por 12 a 14 horas, a 4°C. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com proteína A sepharose 6MB (Pharmacia, Uppsala, Sweden) por duas horas a 4°C e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4°C/12.000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de cinco minutos, com tampão de lavagem (2,0 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,5% triton X-100). O sobrenadante foi descartado restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (Velloso et al., 1996). Os imunocomplexos foram ressuspensos em 25 µl de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/l de DTT.

Captação de glicose e síntese de glicogênio em músculo sóleo isolado de C3H/HeJ e controles tratados com palmitato, ácido láurico e ácido esteárico

Músculos sóleos de camundongos C3H/HeJ e seus respectivos controles foram isolados e pré-incubados na presença de 100µM de palmitato (previamente dissolvido em etanol) por 4 horas, como descrito previamente (Massao Hirabara et al., 2003). Em alguns experimentos, músculos sóleos isolados de C3H/HeJ e de seus controles foram incubados na presença de 100 µM de ácido esteárico e ácido láurico por 4 horas. No estado basal e uma hora após tratamento com insulina, a captação de glicose e síntese de glicogênio foram medidas. Os músculos utilizados para avaliar a captação de glicose foram pré-incubados, por 30 minutos em banho aquecido a 37°C, em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer, contendo 5,6mM de glicose, pH 7,4, 95% O₂ e 5% CO₂, com agitação contínua a 120 rpm. Subseqüentemente, os músculos foram transferidos para outros frascos contendo o mesmo tampão, porém acrescido de 0,3µCi/mL de [U-¹⁴C]-D-glicose e 0,2µCi/mL de 2-deoxi- [2,6-³H]-D-glicose e foram

incubados em condições similares por meia hora, na presença ou ausência de insulina. A gaseificação foi realizada por mais 15 minutos e então interrompida. Ao final da incubação, os músculos foram brevemente lavados em salina (0,9% de NaCl) a 4° C e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram realizadas as mensurações da captação de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glicose e da síntese de [¹⁴C]-glicogênio, segundo os métodos descritos por Challiss et al (1983) e Leighton e Coper (1988).

Sinalização da insulina em músculo sóleo isolado de C3H/HeJ e controles tratados com palmitato, ácido láurico e ácido esteárico

Músculos sóleos de C3H/HeJ e seus respectivos controles foram incubados por quatro horas na presença de 100 µM de palmitato, ácido láurico ou ácido esteárico. Insulina (10mU/ml) foi adicionada ao meio e os músculos foram incubados por mais cinco minutos. Para comparação, alguns músculos foram incubados por cinco minutos na ausência (grupo controle) ou na presença de insulina 10mU/ml (grupo insulina) e outros na presença de 100 µM de palmitato sozinho. Ao final do período de incubação, os músculos foram homogeneizados em 0,6 ml de tampão de extração e centrifugados como descrito previamente. Os sobrenadantes foram utilizados para imunoprecipitação e para separação de proteínas em SDS-PAGE.

Transmissão do sinal do TLR4 em músculos sóleos isolados de C3H/HeJ e controles tratados previamente com LPS ou palmitato

Em alguns experimentos, músculos sóleos isolados de C3H/HeJ e C3H/HeN foram incubados com LPS (lipopolissacarídeo) ou palmitato por uma hora. Ao final do período de incubação, músculos foram homogeneizados e centrifugados, como foi descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram utilizados para imunoprecipitação com anti-MyD88 e anti-TLR4. Outra parte do sobrenadante foi utilizada para separação das proteínas em SDS-PAGE.

Captação de glicose induzida por insulina, sinalização da insulina e ativação de vias do TLR4 em músculos sóleos isolados previamente tratados com anticorpo monoclonal do TLR4 (MTS510)

Músculos sóleos de C3H/HeJ e C3H/HeN foram isolados como foi previamente descrito e incubados por uma hora na ausência (grupo controle) ou presença de 10 $\mu\text{g/ml}$ de um anticorpo antagonista monoclonal do TLR4 (MTS510). Após este período, os músculos foram incubados com ou sem LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) por uma hora ou com ou sem palmitato (100 μM) por quatro horas. Ao final do período de incubação, os músculos foram homogeneizados como descrito anteriormente e os extratos foram usados para imunoprecipitação. Em alguns experimentos, no estado basal e 30 minutos após tratamento com insulina, a captação de glicose foi medida, como previamente descrito.

Análise Estatística

Todos os resultados numéricos estão expressos como média \pm desvio da média seguido do número de experimentos. Os resultados dos “Western blot” estão apresentados como comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa “Scion Image” (Scion Corp). Os dados foram analisados através de teste “t Student’s”, quando comparados dois grupos e através de análise de variância (Anova), seguida por análise de significância (Bonferroni) quando apropriado. A significância estatística adotada foi $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

Peso, ingestão alimentar, peso da gordura peri-epididimal e níveis de leptina em camundongos C3H/HeJ e controles

Camundongos machos C3H/HeJ e seus controles específicos, com seis semanas de vida, foram submetidos à dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por oito semanas. O peso dos camundongos C3H/HeJ, após oito semanas de DH, era menor em comparação ao peso dos controles na mesma dieta (Controle + DH 38,15 +/-3,1 vs C3H/HeJ + DH 33,5+/- 1,5g, $P<0,05$, Figura. 1A). Após oito meses de DH, a diferença de peso entre camundongos C3H/HeJ e seus controles era ainda mais evidente (Figura. 1B) e estes animais pesavam cerca de 15% menos do que os controles (C3H/HeJ + DH 43,3+/-2,0 vs Controle + DH 48,0 +/-1,8g, $P<0,01$, Figura. 1B) . Entretanto, a ingestão alimentar não diferia entre os animais em DH (C3H/HeJ + DH 25,3 +/-1,2 vs Controle + DH 25,0+/-1,5 kcal/dia, NS, Figura. 1C) e também era semelhante entre os camundongos alimentados com dieta padrão (Figura. 1C).

Observou-se que a diferença de peso entre os animais em DH era decorrente de um menor peso da gordura peri-epididimal nos camundongos C3H/HeJ. O peso da gordura peri-epididimal era 40% menor nestes animais em comparação com os controles (Controle + DH 1,54+/-0,2 vs C3H/HeJ + DH 0,9+/-0,1g, $P<0,001$, Figura. 1D). Os animais em dieta padrão apresentavam peso similar da gordura peri-epididimal (Controle + DP 0,42+/- 0,14 vs C3H/HeJ + DP 0,36+/-0,14g, NS) . Além disso, verificamos que os níveis de leptina eram 36% menores nos C3H/HeJ em DH do que nos controles (Controle + DH 23,8+/-3,9 vs C3H/HeJ + DH 15,3+/-1,5ng/ml, $P<0,01$, Figura. 1E). Os níveis de leptina eram semelhantes em controles e C3H/HeJ em dieta padrão (Controle + DP 1,2+/-0,3 vs C3H/HeJ + DP 1,1+/-0,4ng/ml, NS, Figura. 1E)

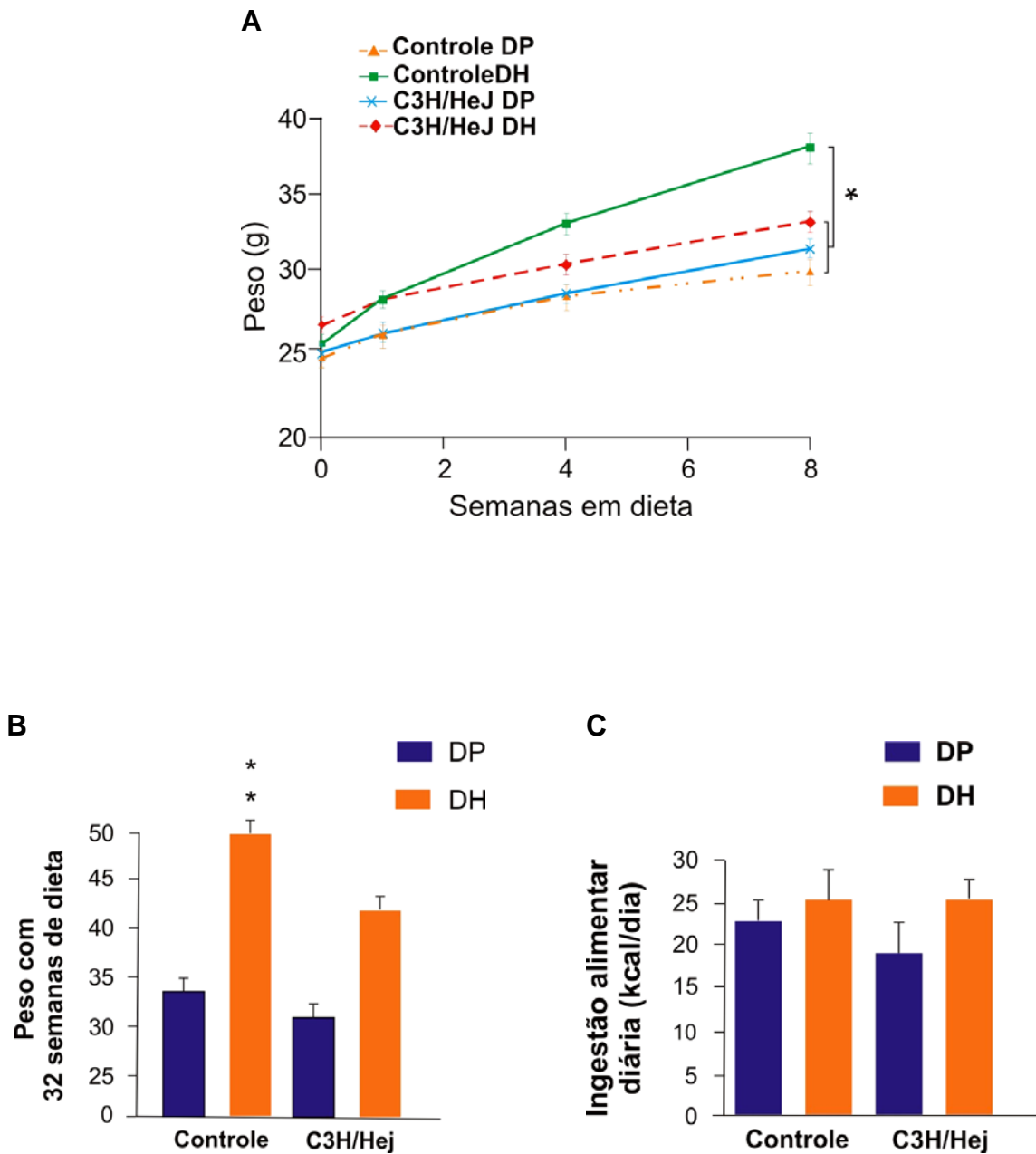


Figura 1- Peso dos camundongos após oito e 32 semanas de dieta hiperlipídica. **(A)** Peso dos camundongos C3H/HeJ e controles submetidos a oito semanas de dieta hiperlipídica. **(B)** Peso com 32 semanas de dieta hiperlipídica. **(C)** Ingestão alimentar. Em todos os experimentos n=6-8. * $P < 0,05$ (controle em DH vs todos os outros grupos); ** $P < 0,01$ (controle em DH vs todos os outros grupos).

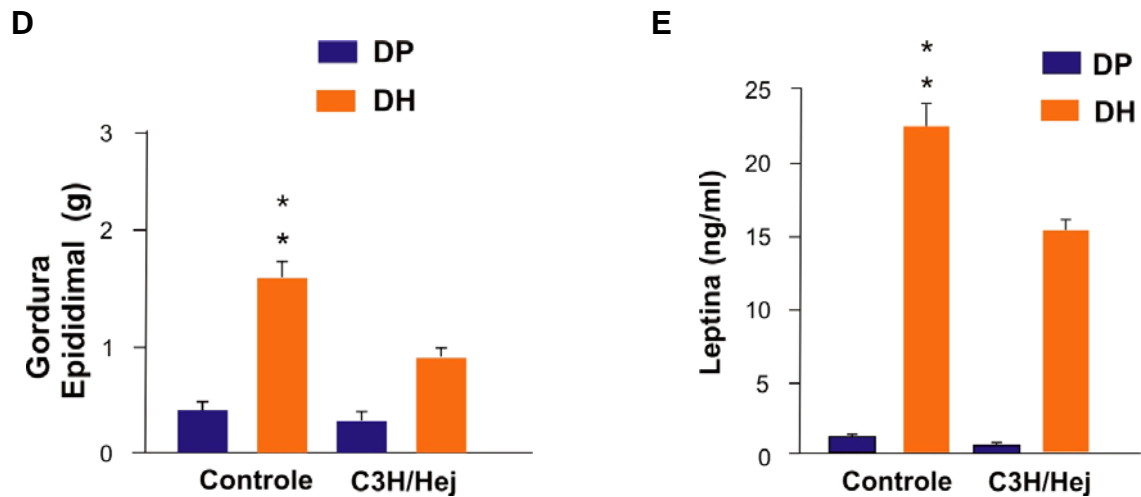
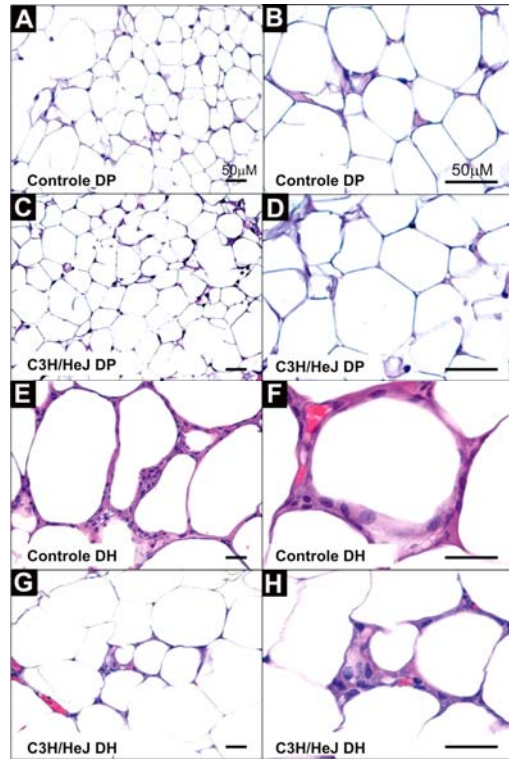


Figura 1- Peso da gordura peri-epididimal (**D**) e (**E**) Leptina sérica em camundongos C3H/HeJ e controles. Em todos os experimentos n=6-8. ** $P < 0,01$ (controle em DH vs todos os outros grupos).

Morfologia e características ultra-estruturais do tecido adiposo em camundongos C3H/HeJ e controles

Avaliou-se se a diferença de peso encontrada entre os animais em DH poderia ser decorrente de mudanças na morfologia do tecido adiposo. A análise morfométrica evidenciou que os adipócitos dos camundongos C3H/HeJ em DH (Figura. 2G, 2H) eram consistentemente menores do que de os adipócitos dos animais controles (Figura. 2E, 2F), com uma redução média de 30% ($P < 0,05$) do tamanho. Contudo, não se evidenciou diferença significativa entre o tamanho dos adipócitos de animais submetidos à dieta padrão (Figuras. 2A-D).

Também foi observado que a distribuição e frequência de macrófagos maduros no tecido adiposo era diferente entre os grupos. Os macrófagos, como foi previamente descrito (Cinti et al., 2005), se agregavam em “crown-like structures” (CLS), formando uma ‘coroa’ de até 15 macrófagos em torno de adipócitos individuais. A formação das CLS era um evento raro no tecido adiposo de controles (1,0 +/-0,5) (Figura. 2A, 2B) ou C3H/HeJ (1,0 +/- 0,5) (Figura. 2C, 2D). Contudo, a formação das CLS aumentou mais de 100 vezes no tecido adiposo de controles em DH e apenas 10 vezes no tecido adiposo de C3H/HeJ em DH (C3H/HeJ + DH $11,5 \pm 2,1$ vs Controle + DH $105,5 \pm 7,8$, $P < 0,05$, Figuras. 2E-H), indicando uma menor infiltração do tecido adiposo por macrófagos nos animais C3H/HeJ. Análise do tecido adiposo por microscopia eletrônica evidenciou que as CLS são formadas por um adipócito morto envolvido por vários macrófagos. Em ambos os grupos de animais, os adipócitos mortos exibiam características clássicas de necrose, com ruptura das membranas basais, degeneração de organelas intracitoplasmáticas e restos celulares (Figura. 2I).



I

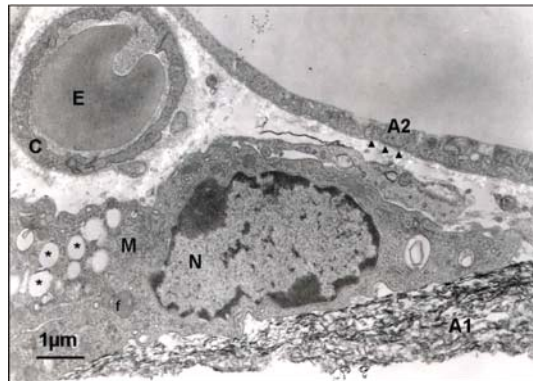


Figura 2- Cortes histológicos representativos do tecido adiposo peri-epididimal de controles (**A, B**) e C3H/HeJ (**C, D**) em dieta padrão e controles (**E, F**) e C3H/HeJ (**G, H**) em dieta hiperlipídica. (**I**) Elétron-micrografia representativa do tecido adiposo de um animal controle em DH. (M) macrófago limpando remanescentes citoplasmáticos de um adipócito morto (A1). (A2): adipócito normal (as cabeças das setas indicam a presença da membrana basal íntegra). *, fagolisossomos com lipídeos; *f*, fagolisossoma; C, capilar; N, núcleo. Escala 50 μ m para as figuras 2A-H. Em todos os experimentos n=8-10 camundongos por grupo.

Aumento do gasto energético em camundongos C3H/HeJ em DH

Avaliou-se se o menor ganho de peso nos camundongos C3H/HeJ em DH poderia ser decorrente de um aumento do gasto energético. Verificou-se o consumo de oxigênio e o quociente respiratório nos dois grupos de animais. O consumo de oxigênio era semelhante entre controles e C3H/HeJ em dieta padrão (Controle + DP 46,3±11,0 vs C3H/HeJ + DP 48,0±4 ml/kg/min, NS, Figura. 3A). O quociente respiratório também não diferia de forma significativa entre os dois grupos de camundongos em dieta padrão (Controle + DP 0,80±0,04 vs C3H/HeJ + DP 0,83±0,04, NS, Figura. 3B). Entretanto, após oito semanas de DH, os camundongos C3H/HeJ apresentavam um consumo de oxigênio maior do que os controles (C3H/HeJ + DH 54,85±5,3 vs Controle + DH 48,28±5,9 ml/kg/min, $P<0,05$, Figura. 3A). Além disso, esses animais exibiam um quociente respiratório menor do que os controles em DH (C3H/HeJ + DH 0,72±0,02 vs Controle + DH 0,80±0,01, $P<0,001$, Figura. 3B), indicando que esses animais estavam utilizando principalmente ácidos graxos como fonte energética.

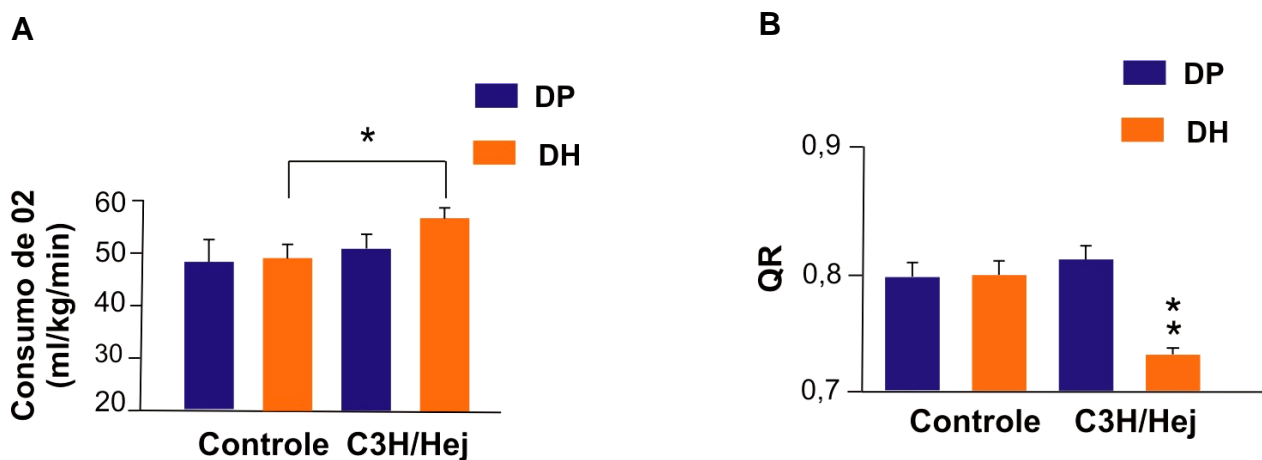


Figura 3- Consumo de oxigênio (A) e quociente respiratório (B) em camundongos C3H/HeJ e controles. Em todos os experimentos n=8-10 camundongos por grupo. * $P<0,05$ (C3H/HeJ em DH vs controle em DH); ** $P<0,001$ (C3H/HeJ em DH vs todos os outros grupos).

Adiponectina, ácidos graxos livres, TNF- α , IL-6 e em C3H/HeJ e controles em DH

Foram determinados os níveis séricos de adiponectina, IL-6, TNF- α e ácidos graxos livres que, sabidamente, têm um papel na obesidade e na ação da insulina (Boden, 1997; Hotamisligil et al., 1993; Lazar, 2005; Pradhan et al., 2001; Senn et al., 2002; Uysal et al., 1997; Vozarova et al., 2001; Yamauchi et al., 2001), nos animais em dieta padrão e hiperlipídica. Os níveis de adiponectina eram similares em controles e C3H/HeJ em DP (Controle + DP 8,4 \pm 0,1 vs C3H/HeJ + DP 7,5 \pm 0,4 μ g/ml, NS, Figura. 4A). Entretanto, comparando os animais em DH, observou-se que os níveis de adiponectina estavam reduzidos nos controles em DH, mas não nos camundongos C3H/HeJ na mesma dieta (Controle + DH 7,1 \pm 0,4 vs C3H/HeJ + DH 9,5 \pm 0,6 μ g/ml, P<0,001, Figura. 4A). A análise dos níveis de ácidos graxos livres (AGLs) evidenciou um aumento menos pronunciado dos AGLs no soro dos C3H/HeJ em DH em comparação com os controles na mesma dieta (C3H/HeJ + DH 0,62 \pm 0,06 vs Controle + DH 0,96 \pm 0,07 mEq/l, P<0,001, Figura. 4B). Contudo, não se verificou diferença significativa entre os níveis de AGLs no soro de animais em dieta padrão (Controle + DP 0,50 \pm 0,06 vs C3H/HeJ + DP 0,56 \pm 0,06 mEq/l, NS, Figura. 4B) Os níveis de IL-6 e TNF- α só foram detectados no sangue de animais em DH e eram muito maiores nos controles do que nos C3H/HeJ (IL-6: Controle + DH 249,43 \pm 55,12 vs C3H/HeJ + DH 47,54 \pm 42,25, P<0,001; TNF- α : Controle + DH 467,71 \pm 87,8 vs C3H/HeJ + DH 115,2 \pm 73,11, P<0,001, Figuras. 4C e D)

O tecido adiposo foi separado em suas duas frações (estroma vascular e adipócitos), conforme descrito anteriormente (Lumeng et al., 2007), e investigou-se os níveis de RNAm de TNF- α e IL-6 expressos pelas diferentes frações do tecido adiposo. Observou-se um aumento da expressão relativa de RNAm de TNF- α em ambas as frações do tecido adiposo de animais controle submetidos à DH, o que não ocorreu em animais em DP e em camundongos C3H/HeJ em DH (Figura. 4E). A expressão de RNAm de IL-6 aumentou de forma

significativa na fração dos adipócitos em animais controles em DH (Figura. 4F). Este efeito não foi observado nos C3H/HeJ em DH ou nos animais em DP.

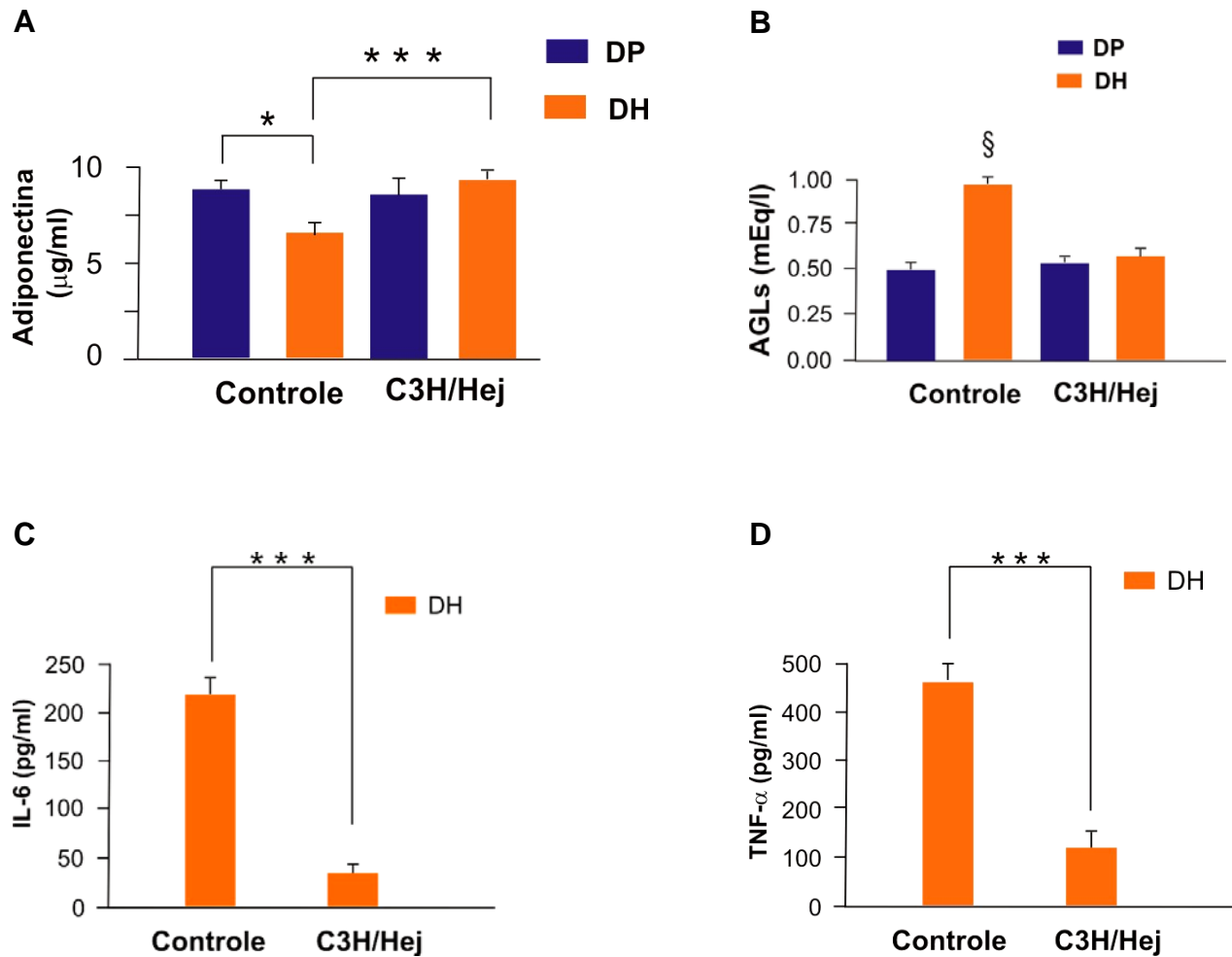


Figura 4- Adipocitocinas e ácidos graxos livres em C3H/HeJ e controles após oito semanas de dieta hiperlipídica. **(A)** Níveis séricos de adiponectina em jejum. **(B)** Concentração sérica de ácidos graxos livres em jejum. **(C)** Níveis de IL-6 e **(D)** TNF- α determinados por ELISA. * $P < 0,05$ (entre os grupos, conforme indicado); *** $P < 0,001$ (controles em DH vs C3H/HeJ em DH); § $P < 0,01$ (controles em DH vs todos os outros grupos). Em todos os experimentos n=8-10 camundongos por grupo.

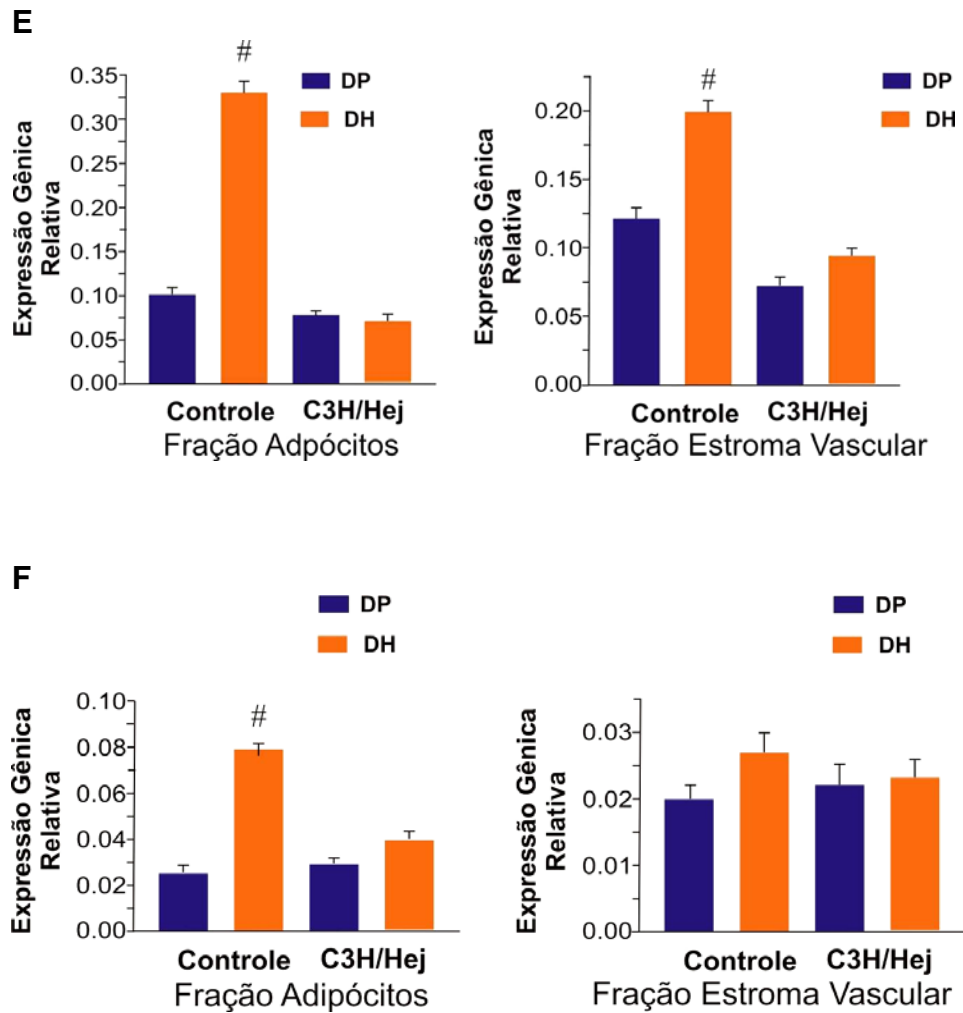


Figura 4- Expressão relativa de RNAm de TNF- α e IL-6 pelas frações do tecido adiposo após oito semanas de dieta hiperlipídica. **(E)** Expressão relativa de RNAm de TNF- α e **(F)** IL-6 nas frações do tecido adiposo (adipócitos e estroma vascular) por RT-PCR. [#] $P < 0,05$ (controles em DH vs todos os outros grupos). Os dados representam n=6-8 camundongos por grupo.

Melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina em camundongos C3H/HeJ

A sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose foram investigadas através do teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ITT) e do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IGTT), respectivamente. Foram determinados os níveis de insulina durante alguns pontos durante o IGTT. A taxa de decaimento da glicose após infusão de insulina foi menor nos animais controle em DH em relação aos animais C3H/HeJ na mesma dieta (Controle + DH $2,77 \pm 0,7$ vs C3H/HeJ + DH $4,03 \pm 1,2 \text{ \%min}^{-1}$, $P < 0,05$, Figura. 5A), indicando que os animais controle em DH apresentam resistência à ação da insulina. O Kitt (constante de decaimento da glicose) foi semelhante em controles e C3H/HeJ em DP (Controle + DP $4,68 \pm 0,64$ vs C3H/HeJ + DP $4,48 \pm 0,44 \text{ \%min}^{-1}$, NS, Figura. 5A).

Em todos os tempos do IGTT, após a infusão de glicose, os níveis glicêmicos eram maiores nos camundongos controle em DH do que nos C3H/HeJ (Figura. 5B), indicando que os camundongos C3H/HeJ estavam protegidos da intolerância à glicose desencadeada por DH. Além disso, os níveis de insulina medidos durante o IGTT eram significativamente menores nos C3H/HeJ em DH do que nos controles (Figura. 5C).

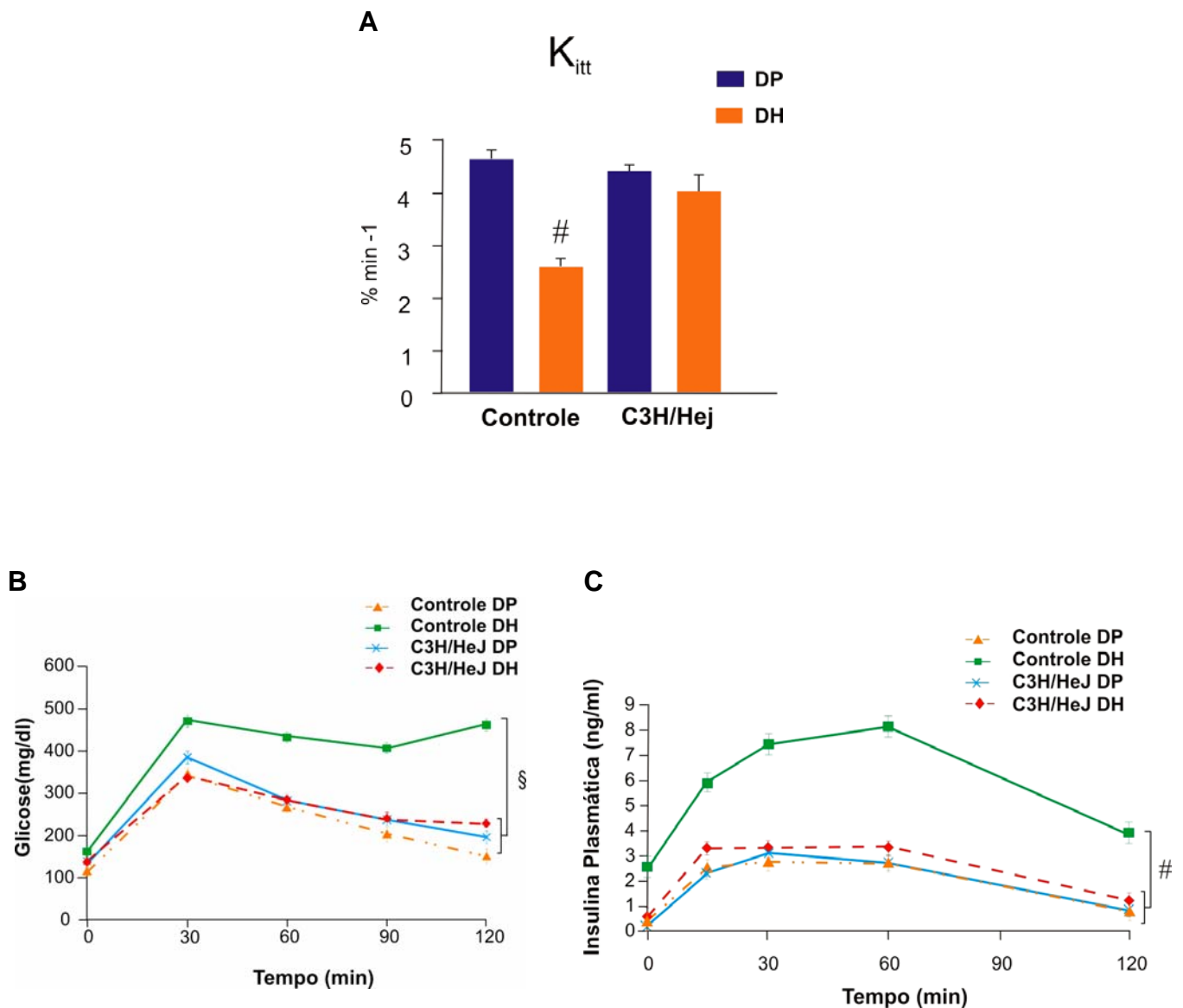


Figura 5- Teste de tolerância à insulina e teste de tolerância à glicose em camundongos C3H/HeJ e controles submetidos a oito semanas de dieta hiperlipídica. **(A)** K_{itt} - taxa de decaimento da glicose após infusão de insulina intraperitoneal (1,5 U/kg de peso). **(B)** IGTT após infusão de glicose intraperitoneal (1g/kg de peso). **(C)** Níveis séricos de insulina durante o IGTT. Os dados representam $n= 6-8$ camundongos por grupo. [#] $P < 0,05$ (controles em DH vs todos os outros grupos); [§] $P < 0,01$ (controles em DH vs todos os outros grupos).

Sinalização da Insulina em Músculo e Tecido Adiposo de camundongos C3H/HeJ e controles em dieta hiperlipídica

A sinalização molecular da insulina foi investigada em músculo e tecido adiposo de animais em DP e DH. Verificou-se que, após estímulo com insulina, havia uma redução de 60% ($P < 0,05$) da fosforilação do IR em tirosina (Figura. 6A), de 60% ($P < 0,05$) da fosforilação do IRS-1 em tirosina (Figura. 6B) e 70% ($P < 0,05$) da fosforilação em serina 473 da Akt (Figura. 6C) em tecido muscular de animais controle em DH. Paralelamente, detectou-se uma redução de 50% dos níveis teciduais de IRS-1 em músculo de animais controles em DH (Figura. 6B). Em tecido adiposo, após estímulo com insulina, observou-se uma redução de 65% ($P < 0,05$) da fosforilação do IR em tirosina (Figura. 6D), de 60% ($P < 0,05$) da fosforilação do IRS-1 em tirosina (Figura. 6E) e de 60% ($P < 0,05$) da fosforilação em serina 473 da Akt (Figura. 6F) em controles em DH. Além disso, houve uma redução de 70% nos níveis de IRS-1 em tecido adiposo de controles em DH (Figura. 6E). Entretanto, a dieta hiperlipídica não alterou os efeitos estimulatórios da insulina na fosforilação do IR, IRS-1 e da Akt em músculo e tecido adiposo de C3H/HeJ (Figura 6 A-F). Os níveis teciduais de IRS-1 não se alteraram nos tecidos dos animais C3H/HeJ em DH (Figura. 6B, 6E).

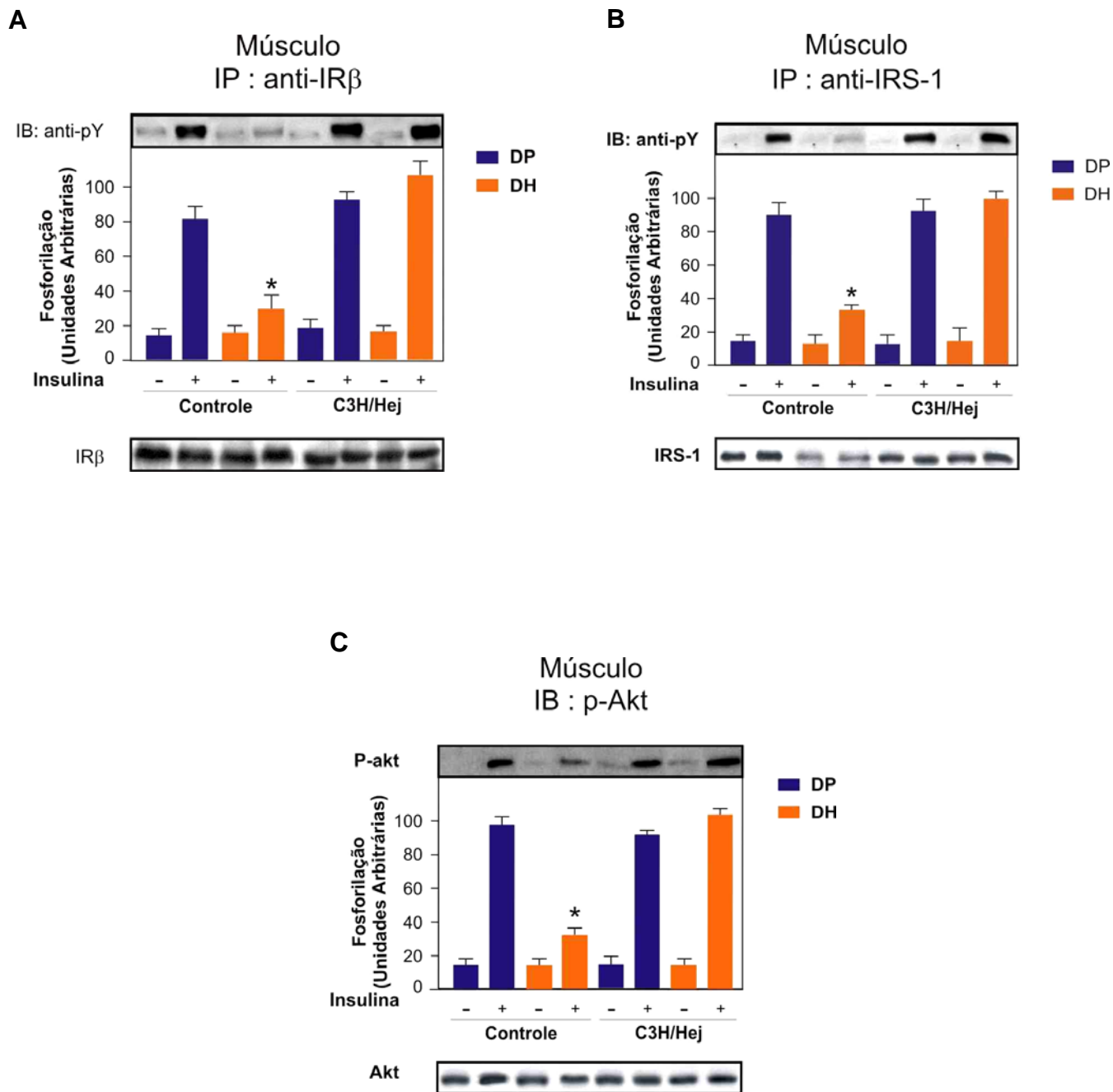


Figura 6- Efeitos da dieta hiperlipídica na sinalização insulínica em músculo. Após estímulo com insulina, foi avaliada a fosforilação em tirosina do IR (A), do IRS-1 (B) e a fosforilação em serina da Akt (C). Foram avaliados os níveis teciduais de IRS-1(B). As barras representam n=6-8 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ (controles em DH, após estímulo com insulina vs todos os outros grupos também estimulados com insulina). IB, imunoblot; IP, imunoprecipitado.

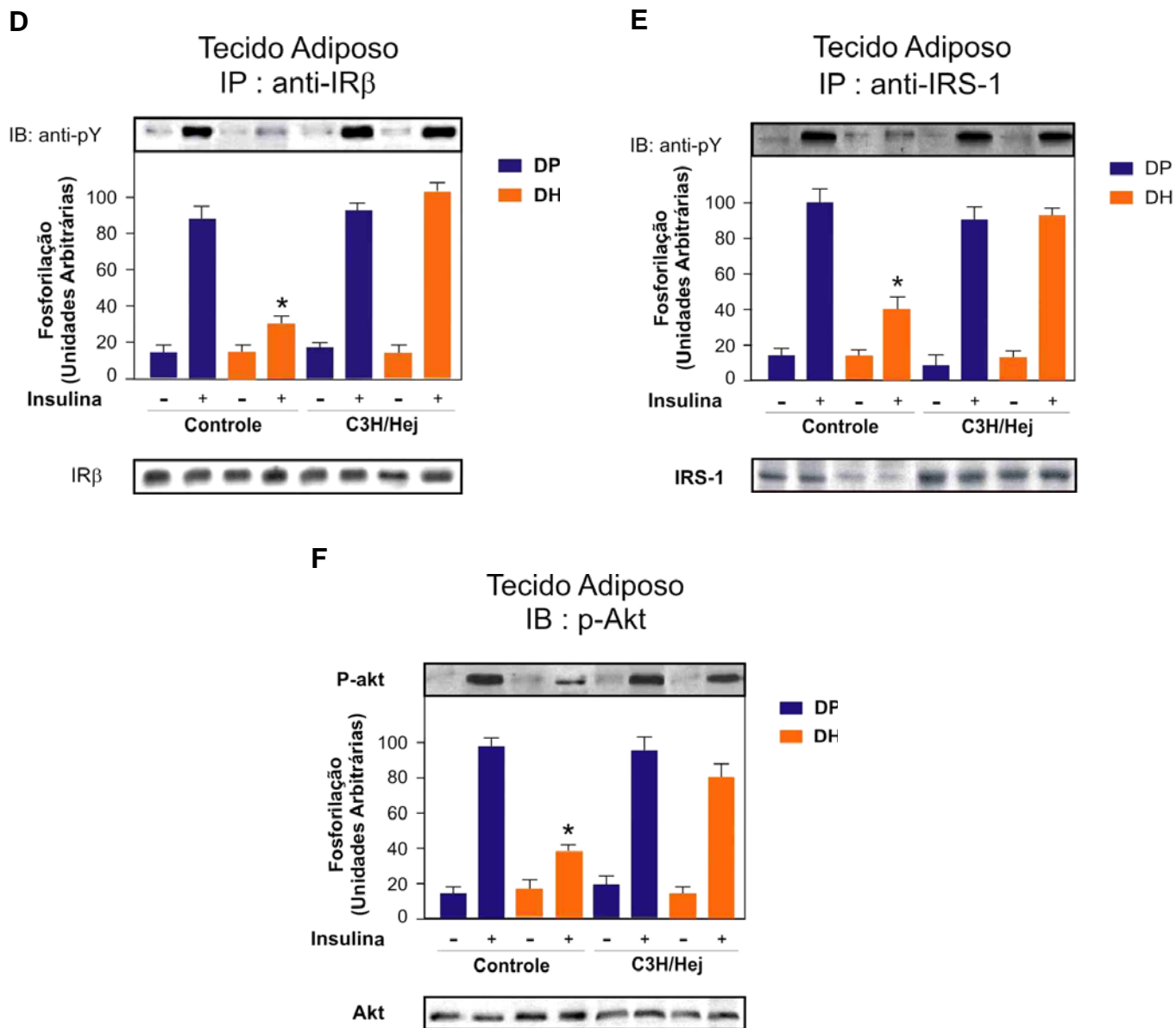


Figura 6- Efeitos da dieta hiperlipídica na sinalização insulínica em tecido adiposo de controles e C3H/HeJ. Após estímulo com insulina, foi avaliada a fosforilação em tirosina do IR (D), do IRS-1 (E) e a fosforilação em serina da Akt (F). Foram verificados os níveis teciduais de IRS-1(E). As barras representam n=6-8 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ (controles em DH, após estímulo com insulina vs todos os outros grupos também estimulados com insulina). IB, imunoblot; IP, imunoprecipitado.

Fosforilação do IRS-1 em serina 307 e ativação da JNK e da IKK β em músculo e tecido adiposo de controles e C3H/HeJ tratados com dieta hiperlipídica

A fosforilação do IRS-1 em serina 307, que é um indicador molecular de resistência à ação da insulina (Aguirre et al., 2002; Gao et al., 2002; Hirosumi et al., 2002; Lee et al., 2003), foi investigada em músculo e tecido adiposo de animais controle e C3H/HeJ. A fosforilação do IRS-1 em serina 307 aumentou cerca de 3,5 vezes ($P < 0,05$, Figura. 7A) em músculo e em 3 vezes em tecido adiposo ($P < 0,05$, Figura. 7B) de animais controle tratados com DH. A DH não induziu aumento da fosforilação do IRS-1 em serina 307 nos tecidos dos animais C3H/HeJ (Figura. 7A, 7B). A ativação da IKK β foi avaliada de forma indireta através dos níveis teciduais da proteína I κ B α , como previamente descrito (Gao et al., 2003). Os níveis de I κ B α estão reduzidos em 60% em músculo ($P < 0,05$, Figura. 7C) e em 50% em tecido adiposo ($P < 0,05$, Figura. 7D) de animais controle, mas os níveis de I κ B α não se reduzem nos tecidos dos C3H/HeJ em DH (Figura. 7C, 7D). Também avaliou-se a ativação da subunidade p-50 do NF- κ B através de ELISA e foi encontrado um aumento de 30% ($P < 0,05$, Figura. 7E) da ativação da p50 em extratos nucleares de músculo e 65% ($P < 0,05$, Figura. 7F) em tecido adiposo de controles em DH. Entretanto, não houve ativação significativa da subunidade p-50 do NF- κ B em extratos nucleares de músculo e tecido adiposo nos outros grupos estudados (Figura. 7E, 7F). A ativação da JNK foi averiguada através da fosforilação da JNK (Thr 183 e Tyr 185) e da c-JUN (Ser63), que é um substrato da JNK. Observou-se que a fosforilação da JNK estava aumentada em cerca de 3 vezes em músculo ($P < 0,05$, Figura. 7G) e em aproximadamente 2 vezes no tecido adiposo ($P < 0,05$, Figura. 7H) de animais controles, mas não nos tecidos dos C3H/HeJ em DH (Figura. 7G, 7H).

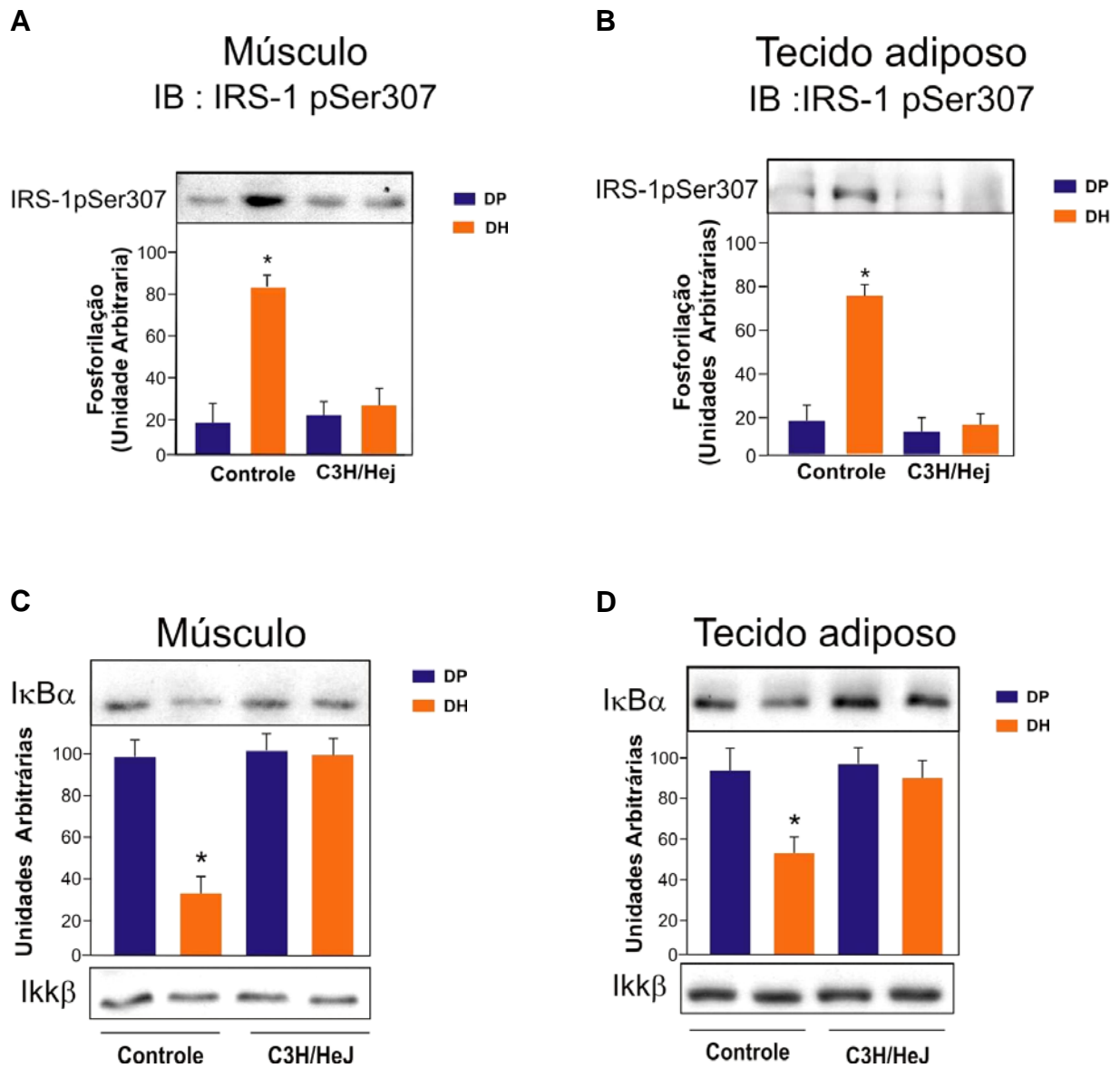


Figura 7- Efeitos da dieta hiperlipídica na fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷ e na ativação da IKKβ em músculo e tecido adiposo de C3H/HeJ e controles em DH. (**A, B**) Fosforilação em Ser³⁰⁷ do IRS-1 (**C, D**) Níveis protéicos da IκBα. **P*<0,05 (controles em DH vs todos os outros grupos).

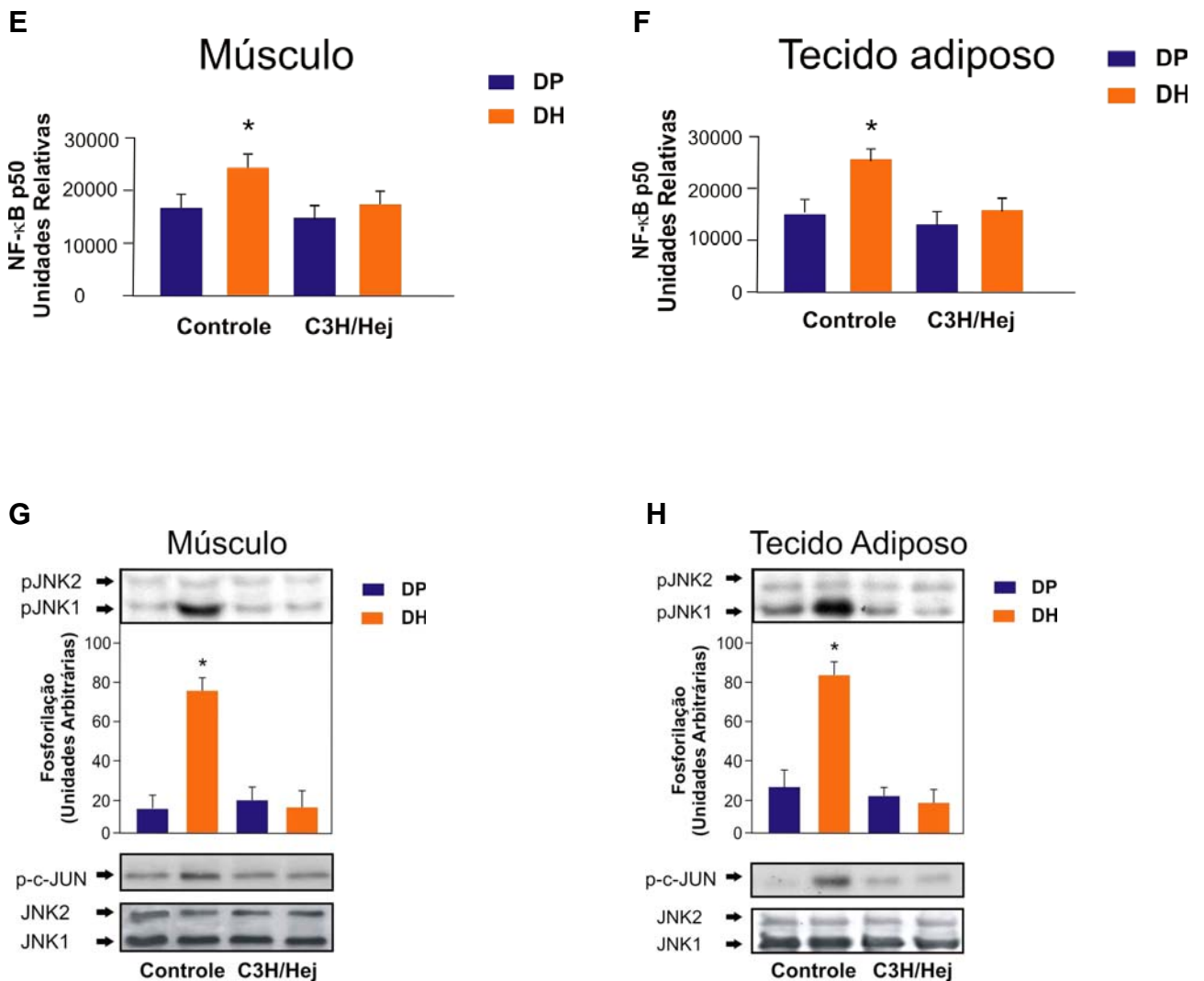


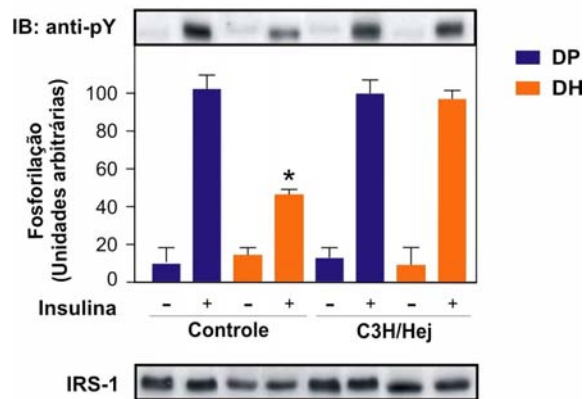
Figura 7- Efeitos da dieta hiperlipídica na ativação da subunidade p-50 do NF- κ B e na fosforilação da JNK em músculo e tecido adiposo de C3H/HeJ e controles em DH. **(E, F)** Ativação da subunidade p-50 do NF- κ B determinada por ELISA em extratos nucleares de músculo e tecido adiposo. **(G, H)** Fosforilação da JNK e da Jun. Os “immunoblots” são representativos de experimentos repetidos independentemente pelo menos três vezes com resultados similares. * $P < 0,05$ (controles em DH vs todos os outros grupos).

Sinalização da Insulina e ativação da JNK e IKK β no fígado de animais controles e C3H/HeJ em dieta hiperlipídica

A sinalização molecular da insulina foi investigada em fígado de animais controle e C3H/HeJ. Detectou-se uma redução de 50% ($P < 0,05$) da fosforilação em tirosina do IRS-1 induzida por insulina, acompanhada por uma redução de 30% ($P < 0,05$) nos níveis teciduais de IRS-1 em controles em DH (Figura. 8A). Observou-se também uma redução de 65% da fosforilação da Akt induzida por insulina no fígado destes animais (Figura. 8B). Porém, em camundongos C3H/HeJ em DH, após estímulo com insulina, não se detectou redução da fosforilação em tirosina do IRS-1 e da fosforilação da Akt em tecido hepático (Figura. 8A, 8B). A fosforilação em Ser³⁰⁷ do IRS-1 aumentou cerca de 3 vezes ($P < 0,05$, Figura. 8C), a fosforilação da JNK aumentou aproximadamente 5 vezes ($P < 0,05$, Figura. 8D) e a concentração tecidual de I κ B α diminuiu 70% ($P < 0,05$, Figura. 8E) no fígado de controles em DH. Contudo, a DH não induziu a fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷, a ativação da JNK e a degradação da I κ B α no fígado de camundongos C3H/HeJ (Figura. 8 C-E).

A

Fígado
IP : anti-IRS-1

**B**

Fígado
IB: p-Akt

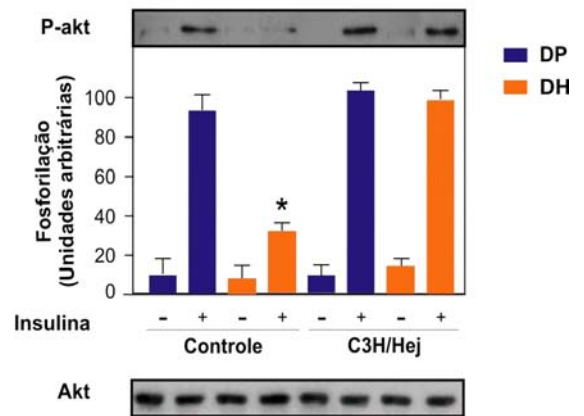


Figura 8- Efeitos da dieta hiperlipídica na sinalização da insulina em fígado de C3H/HeJ e controles. **(A)** Fosforilação do IRS-1 em tirosina após estímulo com insulina e concentração tecidual de IRS-1. **(B)** Fosforilação em serina da Akt induzida por insulina. As barras representam a média de n= 6-8 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ (controles em DH após estímulo com insulina vs todos os outros grupos estimulados com insulina).

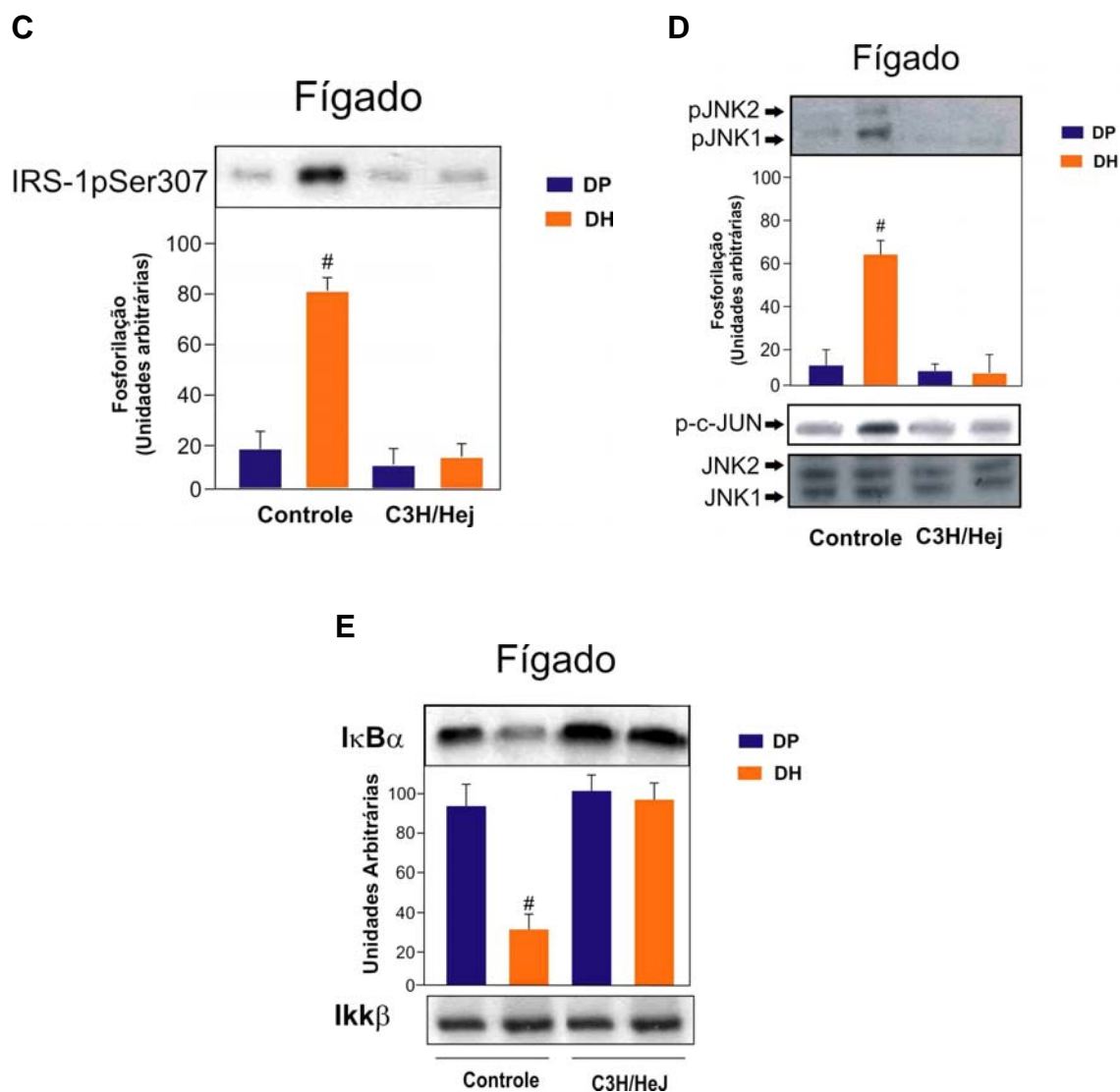


Figura 8- Efeitos da dieta hiperlipídica na fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷, na fosforilação da JNK e na ativação da IKKβ em fígado de C3H/HeJ e controles. (C) Fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷. (D) Fosforilação da JNK e da Jun. (E) Níveis protéicos da IκBα. As barras representam a média de n= 6-8 camundongos por grupo. #P<0,05 (controles em DH vs todos os outros grupos)

Ativação da iNOS em músculo, tecido adiposo e fígado de controles e C3H/HeJ em DH

A ativação da via do IKK β /I κ B α /NF- κ B pode aumentar a expressão da iNOS (Kleinert et al., 2004). Estudos recentes mostram que o aumento da expressão da iNOS pode causar redução da transmissão do sinal da insulina e conseqüentemente resistência à ação da insulina (Carvalho-Filho et al., 2005; Perreault e Marette, 2001; Sugita et al., 2005). A ativação da iNOS é acompanhada por aumento da S-nitrosação do IR/IRS-1 e da Akt (Carvalho-Filho et al., 2005), que é uma modificação pós-translacional que reduz a transmissão do sinal da insulina. A DH induziu o aumento da expressão da iNOS em cerca de 4 vezes em músculo ($P < 0,05$, Figura. 9A), em aproximadamente 2 vezes em tecido adiposo ($P < 0,05$, Figura. 9B) e em 2,7 vezes em fígado ($P < 0,05$, Figura. 9C) de animais controle, mas a expressão da iNOS não aumentou de forma significativa nos tecidos dos animais C3H/HeJ na mesma dieta (Figura. 9A-C).

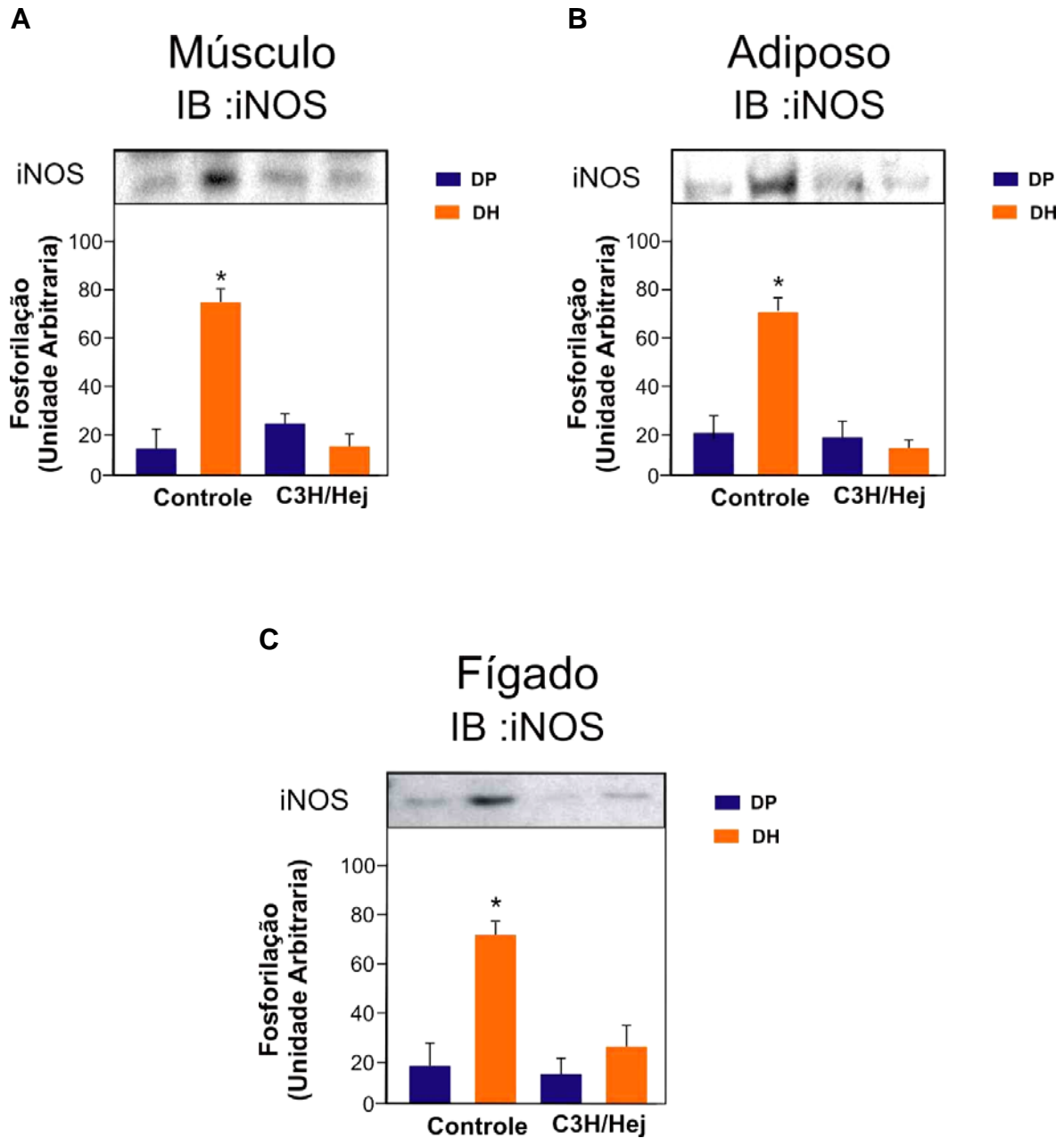


Figura 9- Efeitos da dieta hiperlipídica na ativação da iNOS em músculo (A), tecido adiposo (B) e fígado (C) de camundongos controles e C3H/HeJ em DH. $*P < 0,05$ (controles em DH vs todos os outros grupos). As barras representam a média de $n = 6-8$ camundongos por grupo.

Proteção contra a resistência à insulina induzida por palmitato, ácido láurico e ácido esteárico em músculo sóleo isolado de camundongos C3H/HeJ

Recentemente foi descrito que o TLR4 é ativado por ácidos graxos livres (Lee et al., 2001). Avaliou-se a captação de glicose e a síntese de glicogênio em músculos sóleos tratados com 100 μ M de palmitato por quatro horas. O tratamento com palmitato reduziu a captação de glicose (43 \pm 3%, $P < 0,05$) (Figura. 10A) e a síntese de glicogênio (41 \pm 6%, $P < 0,05$) (Figura. 10B) induzidas por insulina em músculos sóleos isolados de camundongos controle. Contudo, em músculos sóleos de animais C3H/HeJ não houve redução da captação de glicose e da síntese de glicogênio induzidas por (Figura. 10 A, 10B). Além disso, o palmitato induziu uma redução da fosforilação do IR (40%, $P < 0,05$), do IRS-1 (50%, $P < 0,05$) e da Akt (60%, $P < 0,05$) após estímulo com insulina em músculos isolados de controles, o que não ocorreu nos músculos dos C3H/HeJ (Figura. 10C-E). Foram investigados os efeitos de outros dois ácidos graxos saturados no metabolismo da glicose e sinalização da insulina em músculo isolado. A captação de glicose induzida por insulina reduziu-se em 40% ($P < 0,01$) e 20% ($P < 0,05$) após o tratamento com os ácidos esteárico e láurico, respectivamente, em músculos sóleos isolados de controles. Não se observou redução da captação de glicose induzida por insulina em músculos de animais C3H/HeJ tratados com os ácidos esteárico e láurico (Figura. 10F). Foi avaliada, em seguida, a sinalização da insulina em músculos isolados tratados com os ácidos esteárico e láurico. Houve uma redução da fosforilação em serina 473 da Akt de 40 \pm 4% ($P < 0,05$) e 63 \pm 7% ($P < 0,05$) em músculos de animais controle tratados com os ácidos láurico e esteárico, respectivamente, mas este efeito não ocorreu nos músculos de C3H/HeJ (Figura. 10G).

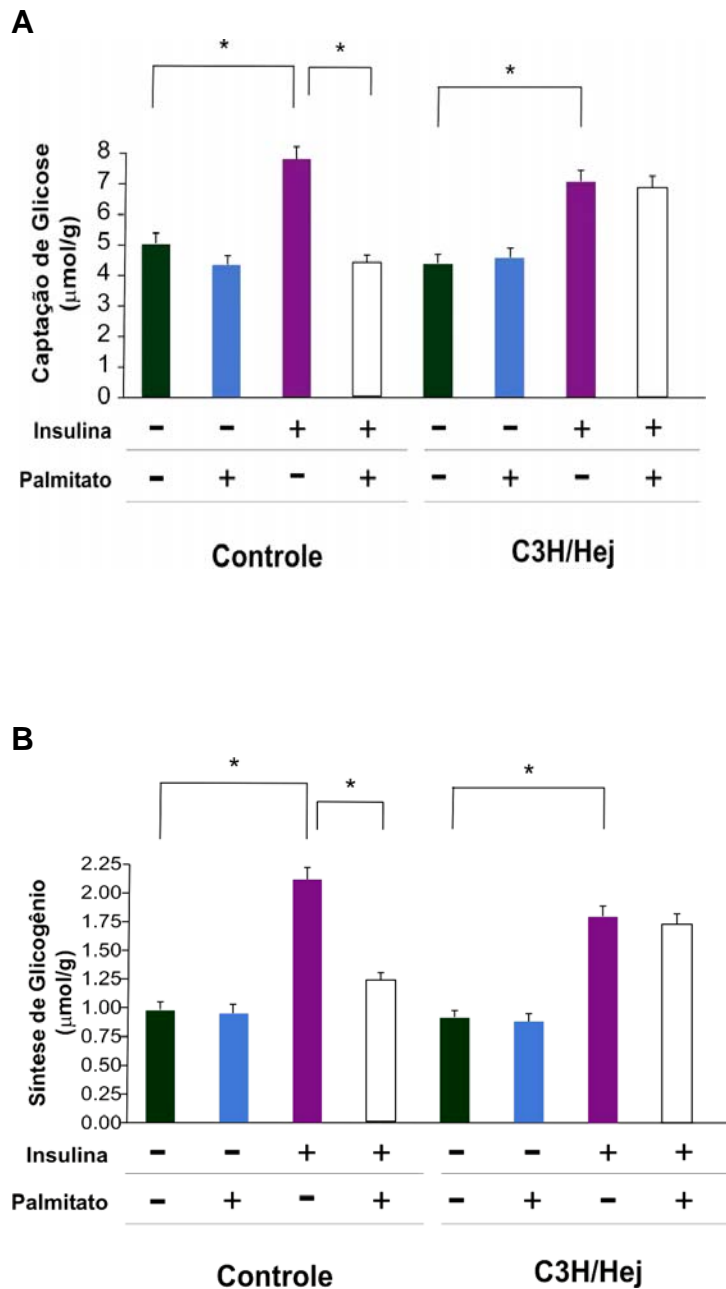


Figura 10- Proteção contra a resistência à insulina induzida por ácidos graxos em músculo isolado de C3H/HeJ. **(A)** Efeito do palmitato na captação de glicose induzida por insulina em músculo sóleo isolado de C3H/HeJ e controles. **(B)** Efeito do palmitato na síntese de glicogênio induzida por insulina em músculo isolado. * $P < 0,05$ entre os grupos, conforme indicado.

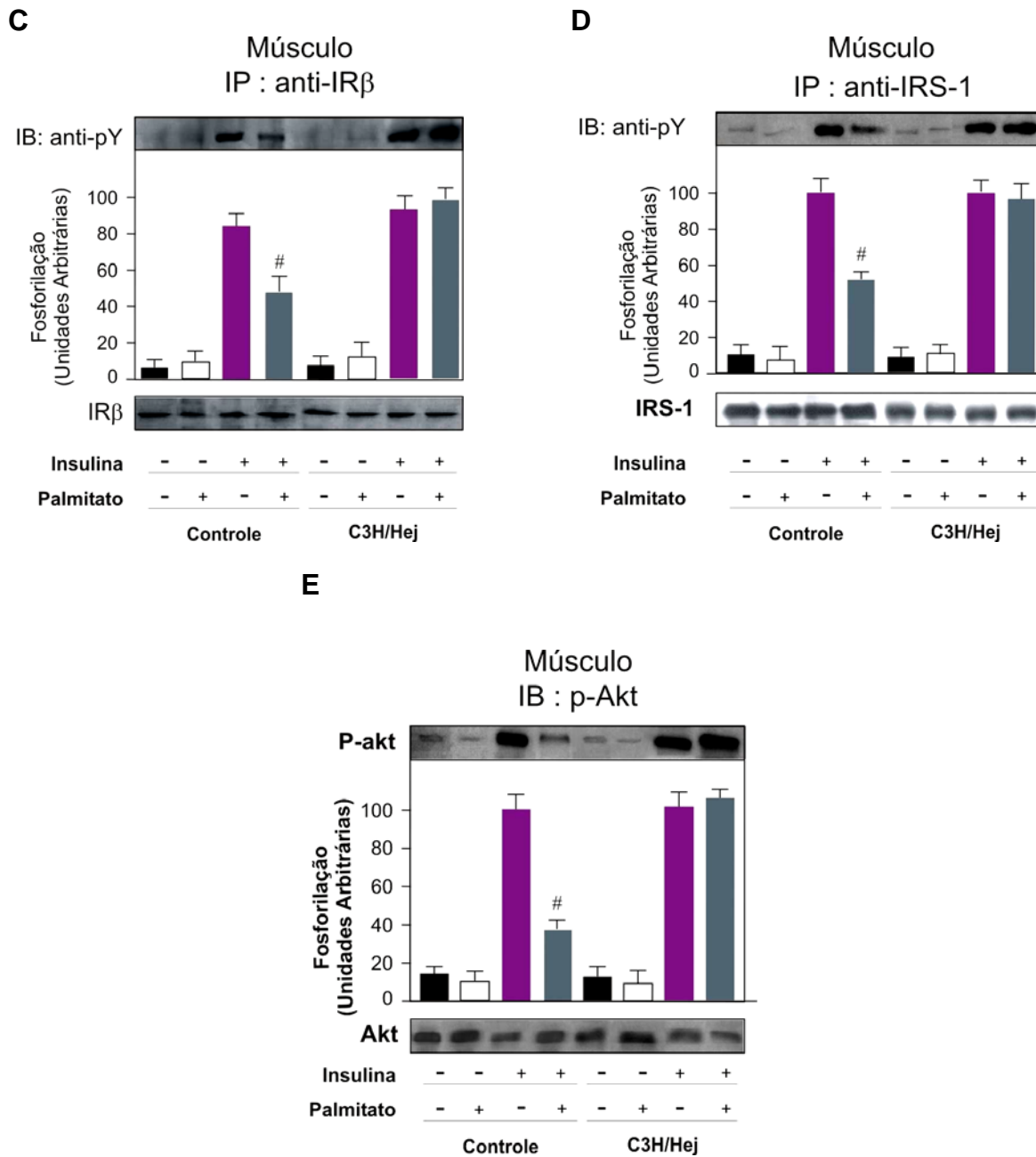


Figura 10- Proteção contra a resistência à insulina induzida por ácidos graxos em músculo isolado de C3H/HeJ. **(C-E)** Efeito do palmitato na fosforilação do IR **(C)**, do IRS-1 **(D)** e da Akt **(E)**, após estímulo com insulina em músculo sóleo isolado de C3H/HeJ e controles. # $P < 0,05$ (Insulina + Palmitato vs Insulina sozinha em controles). IB, Immunoblot; IP, Immunoprecipitado

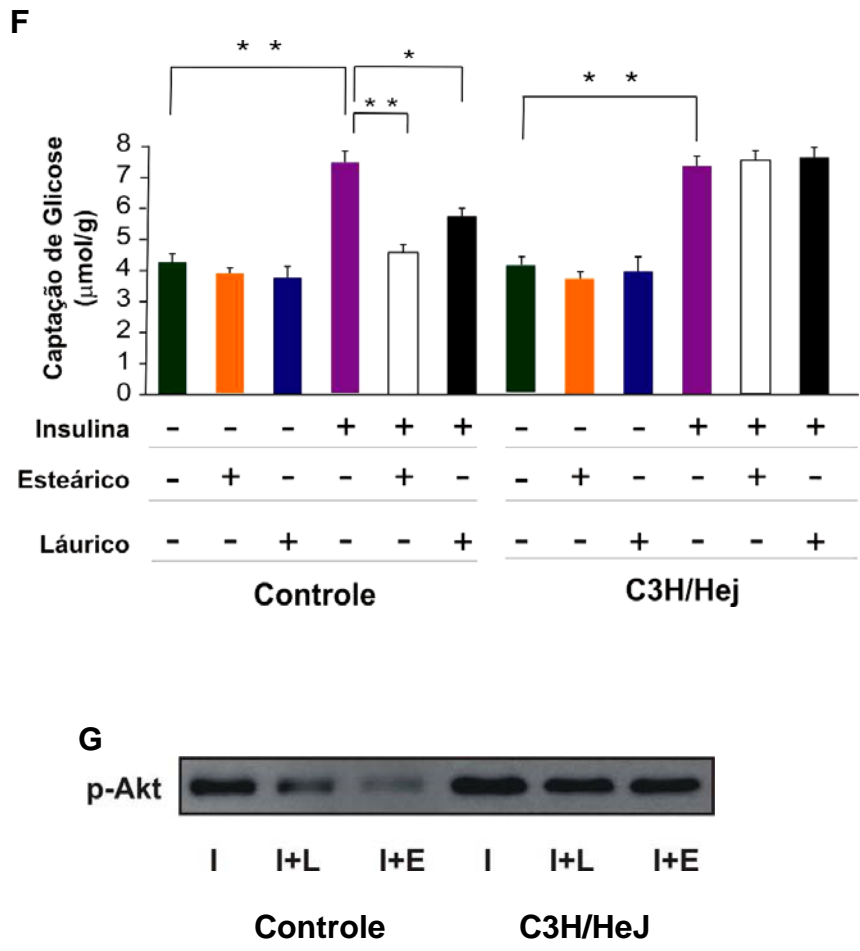


Figura 10- Proteção contra a resistência à insulina induzida por ácidos graxos em músculo isolado de C3H/HeJ. **(F)** Efeito dos ácidos esteárico e láurico na captação de glicose induzida por insulina em músculo sóleo isolado. **(G)** Efeito dos ácidos esteárico e láurico na fosforilação da Akt induzida por insulina. * $P < 0,05$ entre os grupos, conforme indicado. ** $P < 0,01$ entre os grupos, conforme indicado. I, Insulina; I+L, Insulina + ácido láurico; I+E, Insulina+ ácido esteárico.

Tratamento com palmitato ativa a sinalização do TLR4 em músculo isolado de camundongos controle

Pesquisou-se o efeito do palmitato na ativação do TLR4 em comparação com um agonista do TLR4, o LPS. Foi realizada a co-precipitação de TLR4 com a proteína adaptadora MyD88 e do MyD88 com o TLR4. A administração de palmitato, de forma semelhante ao LPS, induziu a associação do TLR4 com a proteína adaptadora MyD88 em músculos de controles, mas não nos músculos dos camundongos C3H/HeJ (Figura. 11A, 11B). O tratamento com palmitato induziu a degradação da $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ em 70% ($P < 0,05$, Figura. 11C), aumentou em cerca de 4 vezes ($P < 0,05$) a fosforilação da JNK (Figura. 11D) e em aproximadamente 3,7 vezes ($P < 0,05$) a fosforilação do IRS-1 em Ser^{307} (Figura. 11E) em músculo isolado de controles. Estes efeitos não foram observados em músculos isolados de camundongos C3H/HeJ (Figuras. 11C-E). O tratamento com palmitato ativou a subunidade p-50 do NF- κ B em músculos isolados de animais controle, mas a ativação da subunidade p-50 não ocorreu de forma significativa nos músculos de C3H/HeJ (Figura. 11F).

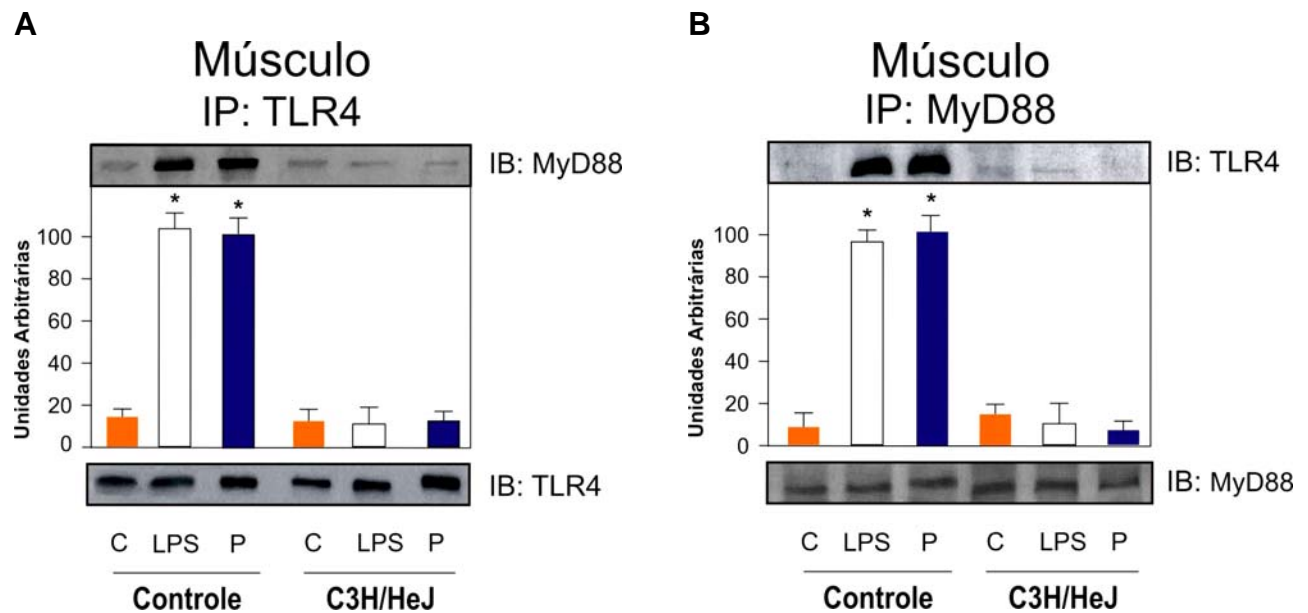


Figura 11- Proteção contra a ativação da via de sinalização do TLR4 em músculo isolado de C3H/HeJ. **(A)** Co-imunoprecipitação do MyD-88 com o TLR4 e **(B)** do TLR4 com o MyD88 em músculo isolado de camundongos C3H/HeJ e controles. * $P < 0,05$ (LPS ou Palmitato vs controle negativo em camundongos controles). IB, Immunoblot; IP, imunoprecipitado; C, controle negativo; P, Palmitato; LPS, lipopolissacarídeo.

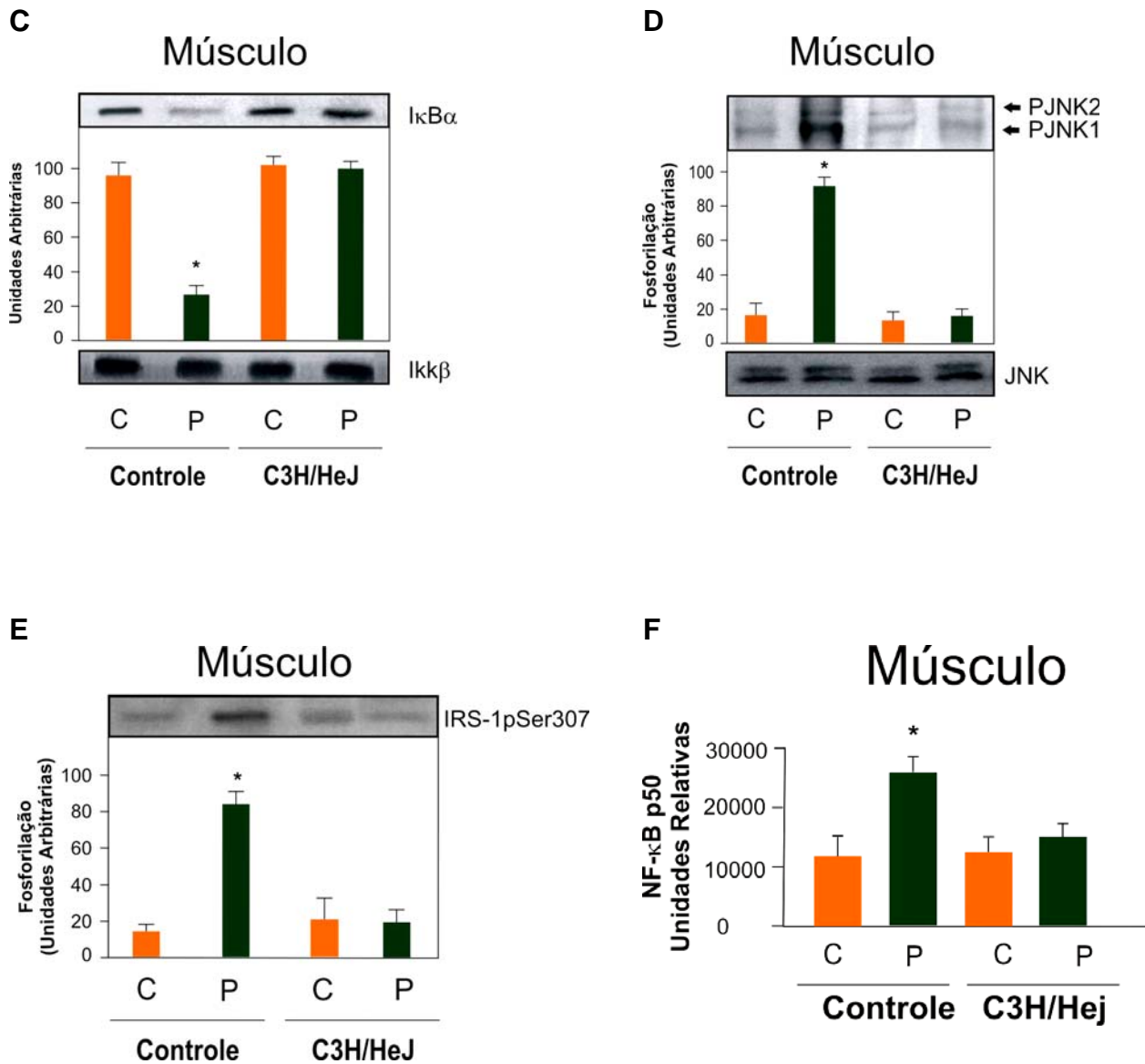


Figura 11- Proteção contra a ativação da via de sinalização do TLR4 em músculo isolado de C3H/HeJ. (C) Níveis protéicos de IκBα. (D) Fosforilação da JNK. (E) Fosforilação em Ser³⁰⁷ do IRS-1. (F) Ativação da subunidade p-50 do NF-κB em extratos nucleares de músculo sóleo isolado. *P<0,05 (Palmitato vs controle negativo em camundongos controles). C, controle negativo; P, Palmitato.

Anticorpo antagonista do TLR4 bloqueia a resistência à insulina induzida por palmitato em músculo sóleo isolado de camundongos controle

Avaliou-se se a inibição do TLR4, com um anticorpo monoclonal antagonista deste receptor, poderia reverter a resistência à insulina induzida por palmitato e LPS em músculos de animais controle. Músculos sóleos isolados foram pré-tratados com o anticorpo antagonista do TLR4, MTS510, por uma hora antes da exposição ao palmitato ou ao LPS. A captação de glicose induzida por insulina reduziu-se em $44 \pm 5\%$ ($P < 0,05$) em músculos de controles tratados com palmitato (Figura. 12A). O tratamento prévio dos músculos com o anticorpo MTS510 preveniu a redução da captação de glicose induzida por palmitato (Figura. 12A). A exposição dos músculos de animais controle ao LPS reduziu a fosforilação do IR em tirosina (85%, $P < 0,05$), a fosforilação em tirosina do IRS-1 (80%, $P < 0,05$) e a fosforilação em serina 473 da Akt (75%, $P < 0,05$) induzidas por insulina (Figura. 12B-D). O palmitato, de forma semelhante, reduziu a fosforilação do IR, do IRS-1 e da Akt induzidas por insulina. O tratamento com MTS510 impediu os efeitos deletérios do LPS e do palmitato na sinalização da insulina (Figura. 12B-D). O palmitato e o LPS induziram a degradação da $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e a ativação da JNK em músculos de animais controle. Em músculos pré-incubados com MTS510, houve uma diminuição da degradação da $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e da fosforilação da JNK induzidas palmitato e pelo LPS (Figura. 12E-F).

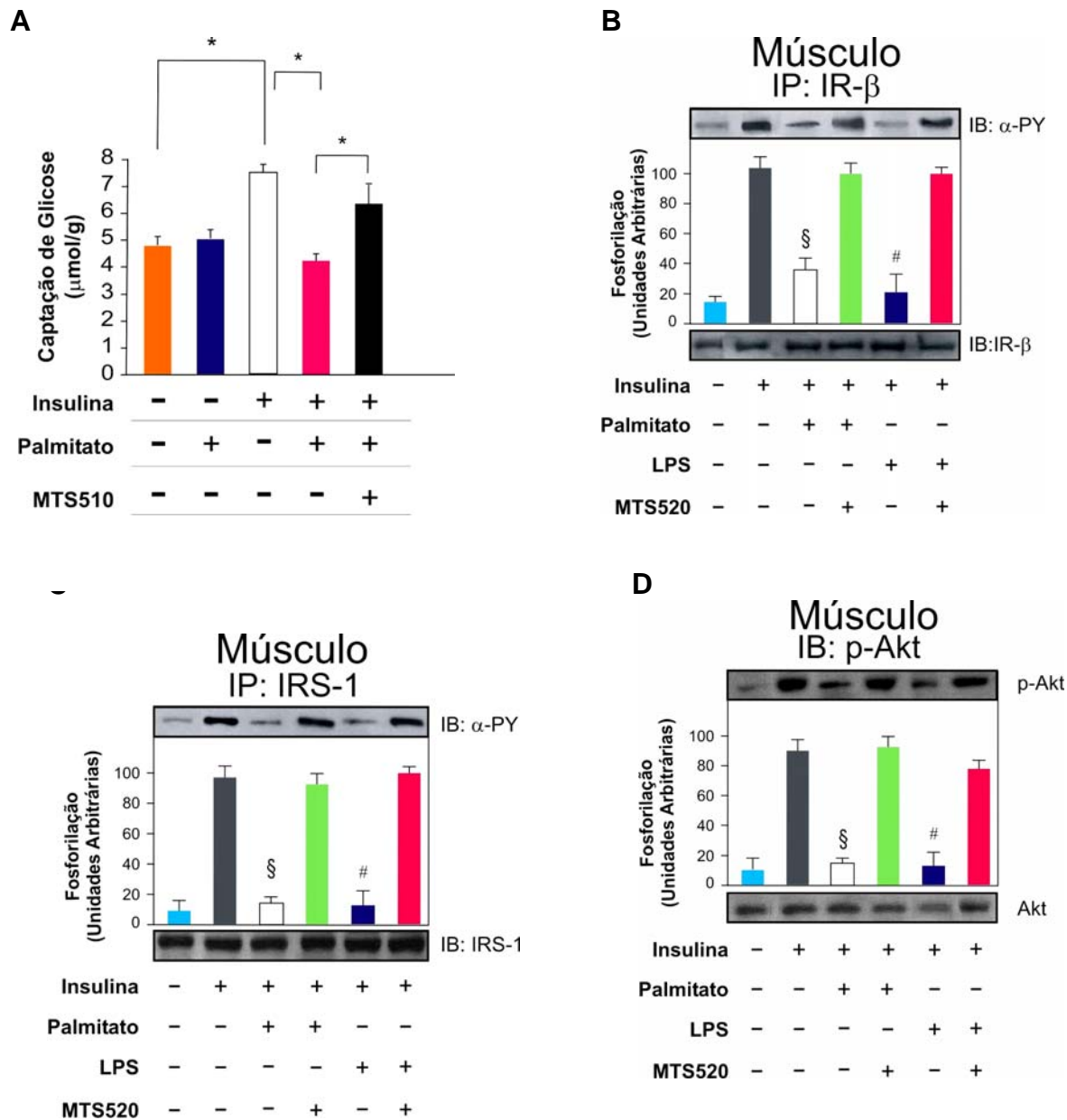


Figura 12- O anticorpo monoclonal antagonista do TLR4 (MTS510) bloqueia a resistência à insulina induzida por palmitato e a ativação de vias de sinalização ligadas ao TLR4 em músculo sóleo isolado de animais controles. **(A)** Efeito do palmitato na captação de glicose induzida pro insulina em músculo isolado pré-tratado com MTS510. Efeito do palmitato na fosforilação induzida por insulina do IR **(B)**, do IRS-1 **(C)** e da Akt **(D)** em músculo de controles pré-tratados com MTS510. * $P < 0,05$ entre os grupos, conforme indicado; § $P < 0,05$ (insulina + palmitato vs insulina); # $P < 0,05$ (insulina + LPS vs insulina). IB, Immunoblot; IP, imunoprecipitado.

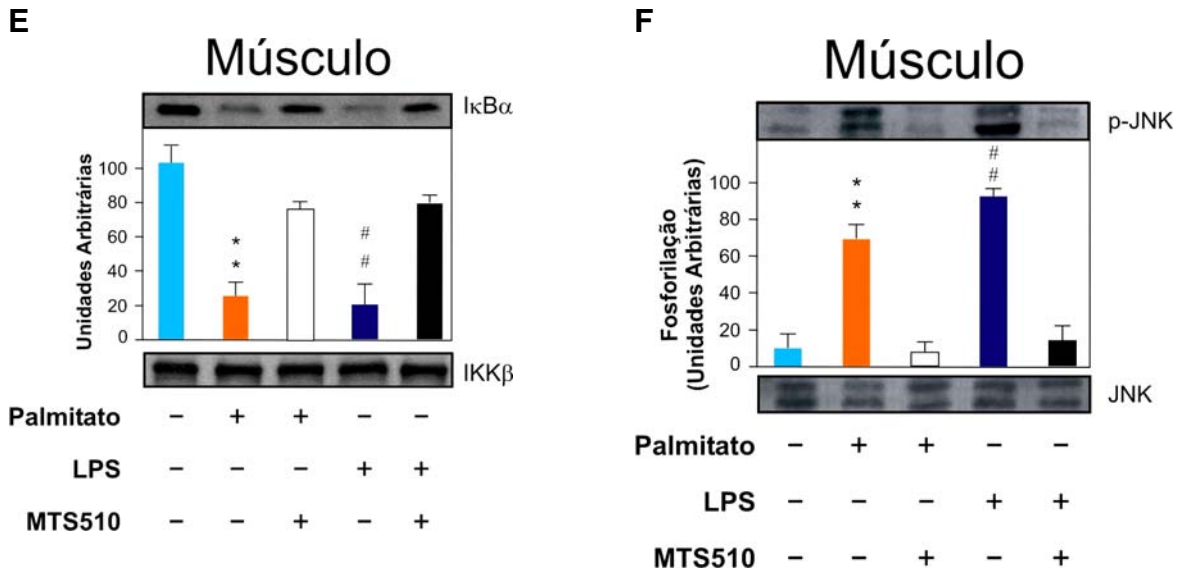


Figura 12- O anticorpo monoclonal antagonista do TLR4 (MTS510) bloqueia a resistência à insulina induzida por palmitato e a ativação de vias de sinalização ligadas ao TLR4 em músculo sóleo isolado de animais controles. **(E)** Níveis protéicos de $I\kappa B\alpha$. **(F)** Fosforilação da JNK. ** $P < 0,05$ (palmitato vs controle basal); ## $P < 0,05$ (LPS vs controle basal). IB, Immunoblot; IP, imunoprecipitado.

5- DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, ficou estabelecido que a resistência à insulina observada na obesidade e no diabetes mellitus tipo 2 está associada a um estado de inflamação crônica subclínica, caracterizado pela produção anormal de citocinas, aumento de proteínas de fase aguda e ativação de uma série de vias inflamatórias. Estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais correlacionam inflamação com o desenvolvimento de doenças metabólicas e suas complicações (Aguirre et al., 2000; Arkan et al., 2005; Cai et al., 2005; Fearnley et al., 1959; Feinstein et al., 1993; Ford, 2002; Hirosumi et al., 2002; Hotamisligil et al., 1993; Hotamisligil e Spiegelman, 1994; Ogston e McAndrew, 1964; Pradhan et al., 2001; Schmidt et al., 1999; Tataranni e Ortega, 2005; Yin et al., 1998).

Várias serina/treonina quinases são ativadas por estímulos inflamatórios ou por estresse e contribuem para a inibição da sinalização da insulina, como a JNK (Aguirre et al., 2000; Hirosumi et al., 2002) e a IKK β (Arkan et al., 2005; Cai et al., 2005; Yuan et al., 2001). Recentemente, demonstrou-se que estresse celular, incluindo estresse do retículo endoplasmático e espécies reativas de oxigênio podem ativar estas quinases (Furukawa et al., 2004; Hung et al., 2004; Lin et al., 2005; Nakatani et al., 2005; Ozawa et al., 2005; Ozcan et al., 2004). Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α ativam essas quinases através de mecanismos clássicos, envolvendo seus respectivos receptores (Shoelson et al., 2006). A JNK e a IKK β também podem ser ativadas na resposta imune inata pelos “Toll-like Receptors” (Akira et al., 2006). Muitos ligantes dos TLRs são conjugados lipídicos de microorganismos, o que levou à especulação de que lipídeos presentes na dieta também possam ativar um ou mais TLRs na obesidade e que os TLRs possam participar da interligação entre sistema imune inato, resistência à insulina e obesidade.

O TLR4 é um subtipo de TLR que é ativado pelo lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas e por ácidos graxos saturados (Lee et al., 2001). Anteriormente, demonstrou-se que o componente lipídico do LPS, um ácido graxo

de cadeia média, o ácido láurico, é capaz se ativar o TLR4 em macrófagos (Hwang, 2001; Lee et al., 2001; Lee et al., 2003).

Vários estudos correlacionam polimorfismos nos “Toll-like receptors” com o desenvolvimento de DM2 e aterosclerose. Dois polimorfismos no gene do TLR4 –Asp299Gly e Thr399Ile- foram os mais estudados. Alterações na sinalização do TLR4 e redução da resposta ao LPS inalado foram descritas em portadores desses dois alelos (Arbour et al., 2000; Kiechl et al., 2002). Estudos iniciais demonstraram que esses dois alelos estão associados com uma proteção contra a aterosclerose em carótida. Pacientes com esses polimorfismos têm um risco menor de desenvolver aterosclerose de carótida e apresentam uma menor espessura da íntima-média da carótida do que pacientes sem mutações no gene (Kiechl et al., 2002). Entretanto, estudos posteriores não confirmaram estes achados (Labrum et al., 2007). Alguns autores encontraram também uma correlação entre polimorfismos no TLR4 e uma maior incidência de DM2. Kolek et al (2004) verificaram que o polimorfismo Asp299Gly está associado a uma menor incidência de DM2 e uma menor incidência de doença coronariana detectada por angiografia. Illig et al (2003) não observaram associação entre o polimorfismo Asp299Gly do TLR4 com uma maior incidência de DM2.

No presente estudo, foi evidenciado que camundongos C3H/HeJ, que apresentam uma mutação inativadora do TLR4, estão protegidos da obesidade e da resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica. Além disso, músculos sóleos isolados de camundongos C3H/HeJ estão protegidos da resistência à insulina induzida por ácidos graxos.

Camundongos C3H/HeJ, machos, quando alimentados com dieta hiperlipídica, ganham menos peso e apresentam uma menor massa do tecido adiposo peri-epididimal do que animais controle. A ingestão calórica, entretanto, não é diferente entre os dois grupos. Além disso, o tecido adiposo peri-epididimal dos camundongos C3H/HeJ em DH apresenta um infiltrado por macrófagos menos intenso do que nos controles e o tamanho dos adipócitos é cerca de 30% menor nestes animais. Verificou-se que no tecido adiposo de controles em dieta

hiperlipídica, os macrófagos se agregam em CLS, que contém até 15 macrófagos em torno de adipócitos individuais. A formação das CLS é rara nos animais com inativação do TLR4. Recentemente, estudos demonstraram que tanto em humanos como em camundongos, o número de macrófagos no tecido adiposo tem correlação com a obesidade e com o tamanho dos adipócitos. Os macrófagos residentes no tecido adiposo são uma fonte adicional de citocinas pró-inflamatórias que podem modular a atividade secretória dos adipócitos e contribuir para indução de resistência à ação da insulina (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Xu et al (2003) evidenciaram que genes inflamatórios têm sua expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos geneticamente obesos ou com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Também observaram um infiltrado por macrófagos no tecido adiposo desses animais obesos, com sinais de lipólise e formação de células gigantes multinucleadas.

Na literatura existem resultados discrepantes em relação ao ganho de peso, massa do tecido adiposo, infiltração do tecido adiposo por macrófagos e ingestão alimentar de animais com inativação do TLR4. Shi et al (2006) demonstraram que fêmeas “knockout” do TLR4 (TLR4^{-/-}) apresentam um maior ganho de peso, maior massa de tecido adiposo e uma maior ingestão calórica em relação aos controles, quando alimentadas em dieta hiperlipídica ou dieta padrão. Poggi et al (2007) observaram que animais C3H/HeJ, machos, após 22 semanas de dieta hiperlipídica, apresentam peso semelhante em relação aos seus controles, porém com uma menor ingestão calórica. Além disso, evidenciaram um maior peso da gordura peri-epididimal associado com hipertrofia dos adipócitos nos camundongos C3H/HeJ. Os autores concluíram que os camundongos C3H/HeJ apresentam uma maior eficiência energética. Suganami et al (2007) não observaram diferença significativa do peso e do peso da gordura peri-epididimal e mesentérica entre machos C3H/HeJ e seus controles após tratamento com dieta hiperlipídica por 16 semanas. Os autores também avaliaram a infiltração por macrófagos no tecido adiposo dos animais em DH e não encontraram diferença entre os dois grupos. Outro estudo evidenciou que animais TLR4^{-/-}, machos, tratados com dieta hiperlipídica por 21 semanas, apresentam um menor ganho de

peso, um menor peso do tecido adiposo visceral e redução da esteatose hepática em relação aos controles submetidos à mesma dieta (Randi et al., 2008). O fenótipo dos camundongos C3H/HeJ foi anteriormente descrito como sendo caracterizado por ossos maiores e mais densos e por uma menor massa de tecido adiposo (Johnson et al., 2004). As razões para as diferenças observadas entre os trabalhos em relação ao peso, ingestão alimentar, massa do tecido adiposo e infiltração do tecido adiposo por macrófagos em animais com inativação do TLR4 não estão completamente elucidadas. Essas divergências podem ser justificadas, pelo menos em parte, pela diferença de linhagem, sexo, tipo de modificação genética no TLR4 e tempo de tratamento com dieta hiperlipídica. Algumas respostas podem ser discordantes em animais com inativação de um gene decorrente de mutações de ponto ou da remoção genética do gene (Murciano et al., 2006; Palliser et al., 2004) e pode-se pressupor que camundongos C3H/HeJ e TLR4^{-/-} possam não ter a mesma regulação da ingestão alimentar e/ou do gasto energético .

Além disso, pode-se aventar a hipótese que animais estudados por diferentes grupos, em diferentes locais, possam apresentar peculiaridades da flora intestinal, o que influenciaria no ganho de peso dos animais. A flora intestinal foi recentemente implicada como um fator ambiental envolvido no controle do peso e homeostase energética (Backhed et al., 2004; Backhed et al., 2007; Ley et al., 2005; Ley et al., 2006). Gordon e colaboradores demonstraram que a flora intestinal de animais e humanos obesos e magros é diferente (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006). As duas populações de bactérias predominantes no intestino humano e de camundongos são de dois grupos de bactérias denominadas *Firmicutus* e Bacteroidetes. Os autores observaram que animais e humanos obesos têm uma proporção maior de *Firmicutus* em sua flora intestinal. Além disso, a flora dos camundongos obesos é rica em genes que codificam enzimas que quebram polissacarídeos da dieta que normalmente não são digeríveis. Essas diferenças parecem ter conseqüências funcionais, pois os animais obesos têm mais produtos de fermentação e menos calorias remanescentes nas fezes do que os camundongos magros. A flora intestinal

parece, portanto, ajudar na extração de calorias extras dos alimentos ingeridos (Turnbaugh et al., 2006). Cani et al (2007) demonstraram que a dieta hiperlipídica aumenta a proporção de bactérias gram-negativas em relação à proporção de bactérias gram-positivas na flora intestinal e que, camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, apresentam aumento dos níveis de LPS no plasma associado com hiperglicemia de jejum, ganho de peso e inflamação no tecido adiposo. Os autores também observaram que camundongos submetidos à infusão crônica de LPS subcutâneo apresentam um maior ganho de peso e uma maior massa de tecido adiposo visceral e subcutâneo. Camundongos, com uma mutação inativadora da CD14 (molécula que participa no reconhecimento do LPS), apresentam-se parcialmente protegidos contra a obesidade, resistência à insulina e diabetes em resposta à DH (Cani et al., 2007).

Portanto, podemos pressupor que haja um predomínio de bactérias gram-negativas na flora intestinal dos nossos animais controle submetidos à DH e que haja um aumento da absorção do LPS, que contribuiria para induzir inflamação no tecido adiposo e hipertrofia deste tecido e poderia explicar o maior ganho de peso destes animais. Os animais C3H/HeJ, com inativação do TLR4, estariam protegidos da absorção do LPS, que envolve a presença de um TLR4 intacto nos capilares intestinais (Neal et al., 2006). A redução da absorção do LPS nestes animais em DH pode explicar, em parte, o menor ganho de peso e menor massa do tecido adiposo peri-epididimal. Entretanto, este ponto merece uma investigação mais detalhada em estudos futuros.

O menor ganho de peso nos camundongos C3H/HeJ em DH está associado a um maior gasto energético. Verificou-se que estes camundongos apresentam um maior consumo de oxigênio e menor quociente respiratório em relação aos controles, indicando que estes animais utilizam principalmente ácidos graxos como fonte energética. Paralelamente, observou-se que os níveis de adiponectina não se reduzem nos C3H/HeJ em DH, o que pode justificar a maior oxidação de ácidos graxos e o menor ganho de peso nestes animais. Outros autores verificaram que a expressão de RNAm (RNA mensageiro) de adiponectina

no tecido adiposo peri-epididimal de camundongos C3H/HeJ em DH não se reduz como ocorre no tecido adiposo de animais controle (Poggi et al., 2007; Suganami et al., 2007). Suganami et al (2007) também encontraram níveis séricos de adiponectina maiores nos C3H/HeJ em DH do que nos controles.

Investigou-se os níveis de algumas adipocitocinas que estão implicadas na resistência à ação da insulina observada na obesidade (Bastard et al., 2002; Boden, 1997; Hotamisligil et al., 1993; Senn et al., 2002; Uysal et al., 1997; Vozarova et al., 2001). Observou-se que a inativação do TLR4 está associada a uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α e de ácidos graxos livres no soro dos camundongos C3H/HeJ em DH, o que pode explicar parcialmente a preservação da sensibilidade à ação da insulina e da tolerância à glicose verificada nestes animais. Shi et al (2006) também evidenciaram uma menor expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo e no fígado de fêmeas TLR4^{-/-} tratadas com dieta hiperlipídica por 39 semanas. No tecido adiposo e no fígado de animais controles, estes autores encontraram um aumento da expressão de TNF- α , IL-6, SOCS-3, MCP-1 e do marcador de macrófagos F4/80. Suganami et al (2007) observaram uma menor expressão de TNF- α no tecido adiposo de C3H/HeJ em DH em relação aos controles. Entretanto, não encontraram diferença significativa da expressão de MCP-1 e F4-80 no tecido adiposo epididimal de C3H/HeJ e controles em DH por 16 semanas. Em outro estudo recente, os autores encontraram uma menor expressão de TNF- α e IL- β no tecido adiposo subcutâneo e epididimal de camundongos C3H/HeJ em DH em relação aos seus controles (Poggi et al., 2007). Os resultados obtidos no presente trabalho e os resultados de outros estudos (Poggi et al., 2007; Shi et al., 2006; Suganami et al., 2007) indicam que a inativação do TLR4 está associada a uma redução da expressão de genes pró-inflamatórios em tecidos insulino sensíveis, o que justifica parcialmente a manutenção da sensibilidade à insulina observada nos camundongos C3H/HeJ em DH.

Verificou-se, também, que a maior sensibilidade à ação da insulina, detectada no ITT dos camundongos C3H/HeJ em DH, tinha uma correlação com a manutenção da transmissão do sinal da insulina nos tecidos adiposo, hepático e muscular. Observou-se que os animais com inativação do TLR4 estavam protegidos da resistência à insulina induzida por DH e que, após estímulo com insulina, não havia redução da fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e da fosforilação da Akt, como ocorreu nos tecidos dos animais controle. Estudos recentes também evidenciaram uma preservação da sensibilidade à ação da insulina em animais com inativação do TLR4 (Shi et al., 2006; Suganami et al., 2007). Shi et al observaram que em animais controle submetidos à infusão lipídica por cinco horas e, posteriormente, submetidos ao “clamp” hiperinsulinêmico-euglicêmico, havia redução da taxa de infusão de glicose de 65% comparando com animais controle submetidos à infusão de salina. Contudo, em animais TLR4^{-/-} a infusão de lipídeos reduziu de forma menos evidente a taxa de infusão de glicose durante o “clamp”, indicando que estes animais estavam protegidos da resistência à ação da insulina induzida por lipídeos (Shi et al., 2006). Além disso, em outros experimentos, após infusão de lipídeos por oito horas, foi observada uma redução da fosforilação do IRS-1 em tirosina induzida por insulina em músculo esquelético de controles, mas este efeito foi prevenido em músculo de camundongos TLR4^{-/-} (Shi et al., 2006). Estes autores também verificaram que fêmeas TLR4^{-/-} tratadas com dieta hiperlipídica por 39 semanas, apresentam uma maior sensibilidade à insulina, avaliada pelo ITT, do que seus controles. Radin et al (2008), de forma semelhante, evidenciaram uma redução menos significativa da taxa de infusão de glicose no “clamp” hiperinsulinêmico-euglicêmico em camundongos TLR4^{-/-} submetidos à infusão de lipídeos por quatro horas em comparação com seus controles. Foi observado que a captação de glicose induzida por insulina em músculo era 40% maior em animais TLR4^{-/-} em relação aos controles (Radin et al). Em outro estudo, também foi evidenciada uma preservação da sensibilidade à insulina em animais com inativação do TLR4. Camundongos C3H/HeJ tratados com DH por 16 semanas

têm menores níveis glicêmicos e insulinêmicos em comparação com seus controles (Suganami et al., 2007).

A redução da transmissão do sinal da insulina nos tecidos muscular, adiposo e hepático dos animais controle em DH foi associada a um aumento da fosforilação do IRS-1 em serina 307 nesses tecidos. A fosforilação do IRS-1 em serina é sabidamente um indicador molecular de resistência à ação da insulina e uma forma inibitória do IRS-1 (Aguirre et al., 2002; Gao et al., 2002; Hirosumi et al., 2002; Lee et al., 2003). A inativação do TLR4 preveniu a fosforilação do IRS-1 em serina nos tecidos estudados.

Paralelamente a fosforilação do IRS-1 em serina 307 nos tecidos dos animais controle em DH, ocorreu uma redução da dos níveis teciduais de IRS-1. Entretanto, a expressão do IRS-1 não se modificou nos tecidos dos animais C3H/HeJ. A redução da expressão do IRS-1 pode ser decorrente de uma maior ativação da iNOS nos tecidos estudados. O tratamento dos animais controle com DH aumentou a expressão da iNOS em músculo, tecido adiposo e fígado destes animais, mas não nos tecidos dos animais C3H/HeJ. O IRS-1, como foi anteriormente descrito, pode sofrer nitrosação e, conseqüentemente, ser degradado (Carvalho-Filho et al., 2005). O aumento da nitrosação do IRS-1 nos tecidos dos animais controle em DH poderia justificar a redução dos níveis teciduais do IRS-1 nestes tecidos.

Estudos anteriores demonstram que as serinas quinases JNK e IKK β podem fosforilar o IRS-1 em serina, inibindo a sinalização da insulina (Hirosumi et al., 2002; Yuan et al., 2001). Observou-se que estas quinases estão ativadas nos tecidos dos animais controle submetidos à DH, o que pode se correlacionar com a fosforilação do IRS-1 em serina encontrada nos tecidos destes animais. A ativação do TLR4 desencadeia uma cascata sinalizatória que culmina com a ativação da JNK e da IKK β (Takeda et al., 2003b). Os resultados deste estudo demonstram que a inativação do TLR4, por uma mutação de ponto na região intracelular do receptor, previne a ativação da JNK e da IKK β nos tecidos estudados.

A proteção contra a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica nos animais com inativação do TLR4 correlaciona-se com a redução da massa de tecido adiposo, redução da infiltração do tecido adiposo por macrófagos e diminuição dos níveis de AGLs, IL-6 e TNF- α no soro destes animais. Entretanto, observou-se que há também um efeito direto da inativação do TLR4 na sensibilidade à insulina em tecido muscular. Os resultados aqui obtidos mostram que, músculos sóleos isolados de camundongos com inativação do TLR4, quando tratados com ácidos graxos saturados, ficam protegidos da resistência à insulina.

Avaliou-se, também, a ação do palmitato e dos ácidos esteárico e láurico, que são ácidos graxos saturados, na indução de resistência à insulina em músculo isolado de animais com inativação do TLR4. Os dados coletados nesta pesquisa mostram que o tratamento com palmitato reduz a captação de glicose induzida por insulina e a fosforilação da Akt após estímulo com insulina em músculo sóleo isolado de animais controle. Além disso, o tratamento prévio de músculo isolado de camundongos controle com palmitato induz a associação do TLR4 com a proteína adaptadora MyD88 e ativa serinas quinases da via do TLR4 como a IKK β e a JNK, indicando que o palmitato estimula a sinalização do TLR4 e pode induzir resistência à ação da insulina em músculo isolado por ativar a via do TLR4. Os resultados deste estudo indicam que, independentemente de mudanças no tecido adiposo e nos níveis circulantes de IL-6, TNF- α e AGLs, a inativação do TLR4 protege o músculo da resistência à insulina induzida por ácidos graxos saturados. Estudos recentes também demonstraram que o TLR4 e o TLR2 têm um papel importante na resistência à ação da insulina induzida por ácidos graxos saturados em miotúbulos e em adipócitos (Senn, 2006; Shi et al., 2006; Suganami et al., 2007). Shi et al (2006) mostraram que o palmitato pode ativar o TLR4 em macrófagos peritoneais de camundongos e induzir a degradação da I κ B α e ativar a JNK. Esses autores também verificaram que os AGLs podem ativar o TLR4 em adipócitos e macrófagos e, conseqüentemente, induzir uma sinalização inflamatória que suprime a sinalização da insulina (Shi et al., 2006). Outro estudo demonstrou que o palmitato ativa a via do NF- κ B em músculos sóleos isolados,

porém este efeito não ocorre em músculos sóleos isolados de animais TLR4^{-/-} (Randi et al., 2008).

O que se obteve, desta investigação, evidenciou que o LPS, um agonista do TLR4, pode ativar a mesma cascata sinalizatória ativada pelo palmitato, causando resistência à ação da insulina. Além disso, a inibição do TLR4 por um anticorpo monoclonal antagonista, MTS510, reverte a resistência à ação da insulina induzida por palmitato e LPS.

Os ácidos graxos livres, cujos níveis estão comumente elevados na obesidade, são implicados na resistência à insulina em diversos modelos (Boden, 2003; Boden et al., 2005; Dresner et al., 1999; Kim et al., 2004; Kim et al., 2001; Lam T.T., 2003; Yuan et al., 2001) e, vários estudos demonstram que os ácidos graxos livres podem induzir sinalização inflamatória em diferentes tecidos (Ajuwon e Spurlock, 2005; Boden et al., 2005; Gao et al., 2004; Itani et al., 2002; Nguyen et al., 2005; Sinha et al., 2004; Staiger et al., 2004; Weigert et al., 2004). Os AGLs causam resistência à insulina *in vivo* por reduzirem a capacidade da insulina de: ativar sua sinalização, reduzir a produção hepática de glicose e estimular a captação de glicose em músculo e tecido adiposo (Boden, 2003; Boden et al., 2005; Gao et al., 2004; Kim et al., 2001; Lam T.T., 2003; Nguyen et al., 2005; Van Epps-Fung et al., 1997). A ativação de várias vias intracelulares são correlacionadas com a indução de resistência à insulina pelos AGLs. Foi demonstrado que ácidos graxos livres ativam a JNK e a IKK β em adipócitos 3T3-L1 e em miotúbulos e estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 (Ajuwon e Spurlock, 2005; Gao et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Weigert et al., 2004). Entretanto, o mecanismo pelo qual os AGLs são ‘sentidos’ pelos adipócitos e por outros tecidos não está completamente elucidado. Os resultados obtidos neste estudo, mostrando que a inativação do TLR4 protege contra a resistência à ação da insulina por ácidos graxos saturados, indicam que o TLR4 pode agir como um sensor endógeno de lipídeos em tecido muscular e que sua ativação pode desencadear uma resposta inflamatória que induz resistência à insulina

Os sistemas imunes e metabólicos são indispensáveis para sobrevivência dos mamíferos e são altamente conservados ao longo da evolução. Esses sistemas são interdependentes e muitas citocinas, hormônios e fatores de transcrição podem ter funções imunes e metabólicas. O equilíbrio entre sistemas imune e metabólico é delicado e em condições de excesso de armazenamento de energia, como ocorre na obesidade, pode ocorrer uma ativação anormal do sistema imune que acarreta o surgimento de doenças metabólicas como o DM2. O TLR4 parece ser um importante elo entre sistema imune inato e metabólico e os nossos dados permitem inferir que nutrientes presentes na dieta, como os AGLs, possam ativar o TLR4, desencadeando uma resposta inflamatória que induz resistência à ação da insulina.

Em resumo, os dados deste trabalho mostram que a inativação do TLR4 previne a obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a ativação da JNK, da IKK β , da iNOS e a resistência à ação da insulina em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Além disso, a inativação do TLR4 previne a resistência à ação da insulina induzida por ácidos graxos saturados. Os resultados apresentados nesta dissertação indicam que o TLR4 estabelece uma conexão entre sistema imune e metabólico e talvez possa ser utilizado no futuro como um alvo terapêutico de doenças altamente prevalentes na população como o diabetes mellitus tipo 2 e a obesidade.

6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a inativação do TLR4:

- Protege contra a obesidade e a resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos.
- Preserva a transmissão do sinal da insulina em músculo, tecido adiposo e fígado em camundongos tratados com dieta hiperlipídica.
- Previne a ativação das serinas quinases IKK β e JNK, a ativação da iNOS e a fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷ nos tecidos muscular, adiposo e hepático de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.
- Protege da resistência à insulina induzida por ácidos graxos saturados em músculo sóleo isolado.
- O TLR4 é um elo entre os sistemas imune inato e metabólico.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M. F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275, 9047-9054.

Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., and White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531-1537.

Ajuwon, K. M., and Spurlock, M. E. (2005). Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 135, 1841-1846.

Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K. (2000). Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 164, 3471-3475.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., and Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25, 187-191.

Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11, 191-198.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., and Calderwood, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-15034.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15718-15723.

Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 979-984.

Bastard, J. P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., and Hainque, B. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2084-2089.

Bedard, S., Marcotte, B., and Marette, A. (1997). Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325 (Pt 2), 487-493.

Bertelli, D. F., Araujo, E. P., Cesquini, M., Stoppa, G. R., Gasparotto-Contessotto, M., Toyama, M. H., Felix, J. V., Carvalheira, J. B., Michelini, L. C., Chiavegatto, S., et al. (2006). Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 147, 5385-5399.

Beutler, B. (2004a). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.

Beutler, B. (2004b). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40, 845-859.

Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46, 3-10.

Boden, G. (2003). Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111, 121-124.

Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., and Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 54, 3458-3465.

Bonora, E., Manicardi, V., Zavaroni, I., Coscelli, C., and Butturini, U. (1987). Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabete Metab* 13, 116-121.

Bowie, A., and O'Neill, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67, 508-514.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11, 183-190.

Calle, E. E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4, 579-591.

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.

Carvalho, J. B., Siloto, R. M., Ignacchitti, I., Brenelli, S. L., Carvalho, C. R., Leite, A., Velloso, L. A., Gontijo, J. A., and Saad, M. J. (2001). Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500, 119-124.

Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Hirabara, S. M., Seabra, A. B., Carvalheira, J. B., de Oliveira, M. G., Velloso, L. A., Curi, R., and Saad, M. J. (2005). S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54, 959-967.

Challiss, R. A., Espinal, J., and Newsholme, E. A. (1983). Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. *Biosci Rep* 3, 675-679.

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-2355.

Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25, 4-7.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., et al. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103, 253-259.

Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D. J., Hotamisligil, G. S., and Van Obberghen, E. (2001). SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276, 47944-47949.

Fearnley, G. R., Vincent, C. T., and Chakrabarti, R. (1959). Reduction of blood fibrinolytic activity in diabetes mellitus by insulin. *Lancet* 2, 1067.

Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M. Z., Lunenfeld, B., and Karasik, A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268, 26055-26058.

Ford, E. S. (2002). Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national sample of US adults. *Am J Epidemiol* 155, 57-64.

Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 847-850.

Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., et al. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307, 426-430.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752-1761.

Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M. J., and Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277, 48115-48121.

Gao, Z., Zuberi, A., Quon, M. J., Dong, Z., and Ye, J. (2003). Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem* 278, 24944-24950.

Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, D., Quon, M. J., Lefevre, M., and Ye, J. (2004). Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18, 2024-2034.

Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L. J., Kraegen, E. W., White, M. F., and Shulman, G. I. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48, 1270-1274.

Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Haynes, L. M., Moore, D. D., Kurt-Jones, E. A., Finberg, R. W., Anderson, L. J., and Tripp, R. A. (2001). Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* 75, 10730-10737.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.

Hogan, P., Dall, T., and Nikolov, P. (2003). Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 26, 917-932.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.

Hotamisligil, G. S., and Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43, 1271-1278.

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., and Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409-2415.

Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., and Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.

- Howard, J. K., Cave, B. J., Oksanen, L. J., Tzamelis, I., Bjorbaek, C., and Flier, J. S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10, 734-738.
- Hundal, R. S., Petersen, K. F., Mayerson, A. B., Randhawa, P. S., Inzucchi, S., Shoelson, S. E., and Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 109, 1321-1326.
- Hung, J. H., Su, I. J., Lei, H. Y., Wang, H. C., Lin, W. C., Chang, W. T., Huang, W., Chang, W. C., Chang, Y. S., Chen, C. C., and Lai, M. D. (2004). Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279, 46384-46392.
- Hwang, D. (2001). Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *Faseb J* 15, 2556-2564.
- Illig, T., Bongardt, F., Schopfer, A., Holle, R., Muller, S., Rathmann, W., Koenig, W., Meisinger, C., Wichmann, H. E., and Kolb, H. (2003). The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes* 52, 2861-2864.
- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I kappa B-alpha. *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Johnson, G. B., Riggs, B. L., and Platt, J. L. (2004). A genetic basis for the "Adonis" phenotype of low adiposity and strong bones. *Faseb J* 18, 1282-1284.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., and Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-1505.

Kaneto, H., Nakatani, Y., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., Ichijo, H., Yamasaki, Y., and Hori, M. (2004). Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 10, 1128-1132.

Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C. H., and Marette, A. (1997). Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46, 1691-1700.

Kapur, S., Marcotte, B., and Marette, A. (1999). Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 276, E635-641.

Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R., and Simsolo, R. B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95, 2111-2119.

Kershaw, E. E., and Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.

Khovidhunkit, W., Kim, M. S., Memon, R. A., Shigenaga, J. K., Moser, A. H., Feingold, K. R., and Grunfeld, C. (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45, 1169-1196.

Kiechl, S., Lorenz, E., Reindl, M., Wiedermann, C. J., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Willeit, J., and Schwartz, D. A. (2002). Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347, 185-192.

Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z. W., Karin, M., Perret, P., et al. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108, 437-446.

Kim, J. K., Fillmore, J. J., Sunshine, M. J., Albrecht, B., Higashimori, T., Kim, D. W., Liu, Z. X., Soos, T. J., Cline, G. W., O'Brien, W. R., et al. (2004). PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114, 823-827.

Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., and Schwarz, P. M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500, 255-266.

Kolek, M. J., Carlquist, J. F., Muhlestein, J. B., Whiting, B. M., Horne, B. D., Bair, T. L., and Anderson, J. L. (2004). Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* 148, 1034-1040.

Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.

Labrum, R., Bevan, S., Sitzer, M., Lorenz, M., and Markus, H. S. (2007). Toll receptor polymorphisms and carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 38, 1179-1184.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lam T.T., V. d. W., G., Giacca A. (2003). Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E281 - E290.

Lazar, M. A. (2005). How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307, 373-375.

Leclerc, V., and Reichhart, J. M. (2004). The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* 198, 59-71.

Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H., and Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 16683-16689.

Lee, J. Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H. S., Lee, W. H., Zhao, L., Sizemore, N., and Hwang, D. H. (2003). Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 278, 37041-37051.

Lee, Y. H., Giraud, J., Davis, R. J., and White, M. F. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278, 2896-2902.

Leighton, B., and Cooper, G. J. (1988). Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. *Nature* 335, 632-635.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.

Levin, B. R., Lipsitch, M., and Bonhoeffer, S. (1999). Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283, 806-809.

Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11070-11075.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.

Lin, Y., Berg, A. H., Iyengar, P., Lam, T. K., Giacca, A., Combs, T. P., Rajala, M. W., Du, X., Rollman, B., Li, W., et al. (2005). The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280, 4617-4626.

Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.

Mannino, D. M., Mott, J., Ferdinands, J. M., Camargo, C. A., Friedman, M., Greves, H. M., and Redd, S. C. (2006). Boys with high body masses have an increased risk of developing asthma: findings from the National Longitudinal Survey of Youth (NLSY). *Int J Obes (Lond)* 30, 6-13.

Massao Hirabara, S., de Oliveira Carvalho, C. R., Mendonca, J. R., Piltcher Haber, E., Fernandes, L. C., and Curi, R. (2003). Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). *FEBS Lett* 541, 109-114.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997a). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997b). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.

Metze, K., and Andrade, L. A. (1991). Atypical stromal giant cells of cervix uteri--evidence of Schwann cell origin. *Pathol Res Pract* 187, 1031-1035; discussion 1036-1038.

Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., and Marks, J. S. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama* 289, 76-79.

Mooney, R. A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L. M., Shang, Y., and Furlanetto, R. W. (2001). Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276, 25889-25893.

Mori, H., Hanada, R., Hanada, T., Aki, D., Mashima, R., Nishinakamura, H., Torisu, T., Chien, K. R., Yasukawa, H., and Yoshimura, A. (2004). *Socs3* deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10, 739-743.

Murciano, C., Villamon, E., Gozalbo, D., Roig, P., O'Connor, J. E., and Gil, M. L. (2006). Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol* 44, 149-157.

Nagai, T., Tarumoto, T., Miyoshi, T., Ohmine, K., Muroi, K., Komatsu, N., Sassa, S., and Ozawa, K. (2003). Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. *Br J Haematol* 121, 657-661.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3, 667-672.

Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T. A., Ozawa, K., Ogawa, S., Hori, M., Yamasaki, Y., and Matsuhisa, M. (2005). Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 280, 847-851.

Neal, M. D., Leaphart, C., Levy, R., Prince, J., Billiar, T. R., Watkins, S., Li, J., Cetin, S., Ford, H., Schreiber, A., and Hackam, D. J. (2006). Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 176, 3070-3079.

Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14, 353-362.

Nguyen, M. T., Satoh, H., Favellyukis, S., Babendure, J. L., Imamura, T., Sbodio, J. I., Zalevsky, J., Dahiyat, B. I., Chi, N. W., and Olefsky, J. M. (2005). JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280, 35361-35371.

Ogston, D., and McAndrew, G. M. (1964). Fibrinolysis In Obesity. *Lancet* 2, 1205-1207.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., and Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4, 161-167.

Ozawa, K., Miyazaki, M., Matsuhisa, M., Takano, K., Nakatani, Y., Hatazaki, M., Tamatani, T., Yamagata, K., Miyagawa, J., Kitao, Y., et al. (2005). The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 657-663.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.

Palliser, D., Huang, Q., Hacohen, N., Lamontagne, S. P., Guillen, E., Young, R. A., and Eisen, H. N. (2004). A role for Toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8+ T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. *J Immunol* 172, 2885-2893.

Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., and Zick, Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 29911-29918.

Perreault, M., and Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7, 1138-1143.

Pickup, J. C. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 813-823.

Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., Iglesias, M. A., Gremeaux, T., Knauf, C., Peiretti, F., Verdier, M., Juhan-Vague, I., Tanti, J. F., et al. (2007). C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50, 1267-1276.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.

Prada, P. O., Zecchin, H. G., Gasparetti, A. L., Torsoni, M. A., Ueno, M., Hirata, A. E., Corezola do Amaral, M. E., Hoer, N. F., Boschero, A. C., and Saad, M. J. (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146, 1576-1587.

Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., and Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* 286, 327-334.

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189, 615-625.

Radin, M. S., Sinha, S., Bhatt, B. A., Dedousis, N., and O'Doherty, R. M. (2008). Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia* 51, 336-346.

Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudravalli, R., and Ross, S. R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2281-2286.

Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.

Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M. F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.

Saghizadeh, M., Ong, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R., and Kern, P. A. (1996). The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97, 1111-1116.

Saltiel, A. R., and Pessin, J. E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 12, 65-71.

Schenka, A. A., Machado, C. M., Grippo, M. C., Queiroz, L. S., Schenka, N. G., Chagas, C. A., Verinaud, L., Brousset, P., and Vassallo, J. (2005). Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 25, 929-941.

Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Sharrett, A. R., Lindberg, G., Savage, P. J., Offenbacher, S., Azambuja, M. I., Tracy, R. P., and Heiss, G. (1999). Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 353, 1649-1652.

Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., and Mooney, R. A. (2002). Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51, 3391-3399.

Senn, J. J. (2006). Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281, 26865-26875.

Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 3015-3025.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782.

Shoelson, S. E. (2002). Invited comment on W. Epstein: on the therapy of diabetes mellitus, in particular on the application of sodium salicylate. *J Mol Med* 80, 618-619.

Shoelson, S. E., Lee, J., and Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 1793-1801.

Sinha, S., Perdomo, G., Brown, N. F., and O'Doherty, R. M. (2004). Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 279, 41294-41301.

Smiley, S. T., King, J. A., and Hancock, W. W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 16, 2887-2894.

Sondergaard, L. (1993). Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet* 9, 193.

Song, M. J., Kim, K. H., Yoon, J. M., and Kim, J. B. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 739-745.

Staiger, H., Staiger, K., Stefan, N., Wahl, H. G., Machicao, F., Kellerer, M., and Haring, H. U. (2004). Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes* 53, 3209-3216.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.

Suganami, T., Mieda, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Kamei, Y., and Ogawa, Y. (2007). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 45-49.

Sugita, H., Fujimoto, M., Yasukawa, T., Shimizu, N., Sugita, M., Yasuhara, S., Martyn, J. A., and Kaneki, M. (2005). Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280, 14203-14211.

Takeda, K., and Akira, S. (2003a). Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5, 143-153.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003b). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.

Tataranni, P. A., and Ortega, E. (2005). A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? *Diabetes* 54, 917-927.

Tilg, H., and Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772-783.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.

Ueki, K., Kondo, T., and Kahn, C. R. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24, 5434-5446.

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., and Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389, 610-614.

Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D., and Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107-15112.

Van Epps-Fung, M., Williford, J., Wells, A., and Hardy, R. W. (1997). Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinology* 138, 4338-4345.

Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J., and Kahn, C. R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12490-12495.

Vojarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P. A., Bogardus, C., and Pratley, R. E. (2001). Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9, 414-417.

Vojarova, B., Weyer, C., Lindsay, R. S., Pratley, R. E., Bogardus, C., and Tataranni, P. A. (2002). High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 455-461.

Weigert, C., Brodbeck, K., Staiger, H., Kausch, C., Machicao, F., Haring, H. U., and Schleicher, E. D. (2004). Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 279, 23942-23952.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

Wellen, K. E., and Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119.

White, M. F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S2-17.

WHO (2002). *The World Health Report 2002 Reducing Risks, Promoting Healthy Life* (Geneva).

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169, 6668-6672.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946.

Yin, M. J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396, 77-80.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., and Shoelson, S. E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673-1677.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zimmet, P., Alberti, K. G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

Zimmet, P., and Thomas, C. R. (2003). Genotype, obesity and cardiovascular disease--has technical and social advancement outstripped evolution? *J Intern Med* 254, 114-125.

8- ANEXO

Original Article

Loss-of-Function Mutation in Toll-Like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance

Daniela M.L. Tsukumo,¹ Marco A. Carvalho-Filho,¹ José B.C. Carvalheira,¹ Patrícia O. Prada,¹ Sandro M. Hirabara,² André A. Schenka,³ Eliana P. Araújo,¹ José Vassallo,³ Rui Curi,² Lício A. Velloso,¹ and Mario J.A. Saad¹

Obesity is associated with insulin resistance and a state of abnormal inflammatory response. The Toll-like receptor (TLR4) has an important role in inflammation and immunity, and its expression has been reported in most tissues of the body, including the insulin-sensitive ones. Because it is activated by lipopolysaccharide and saturated fatty acids, which are inducers of insulin resistance, TLR4 may be a candidate for participation in the cross-talk between inflammatory and metabolic signals. Here, we show that C3H/HeJ mice, which have a loss-of-function mutation in TLR4, are protected against the development of diet-induced obesity. In addition, these mice demonstrate decreased adiposity, increased oxygen consumption, a decreased respiratory exchange ratio, improved insulin sensitivity, and enhanced insulin-signaling capacity in adipose tissue, muscle, and liver compared with control mice during high-fat feeding. Moreover, in these tissues, control mice fed a high-fat diet show an increase in I κ B kinase complex and c-Jun NH₂-terminal kinase activity, which is prevented in C3H/HeJ mice. In isolated muscles from C3H/HeJ mice, protection from saturated fatty acid-induced insulin resistance is observed. Thus, TLR4 appears to be an important mediator of obesity and insulin resistance and a potential target for the therapy of these highly prevalent medical conditions. *Diabetes* 56:1986–1998, 2007

Insulin resistance in obesity and type 2 diabetes is associated with an abnormal inflammatory state. In addition, during the last decade, we have seen great progress in this field attributable to the identification of several downstream mediators and signaling pathways that provide cross-talk between inflammatory and metabolic signaling (1–9).

Toll-like receptors (TLRs) play a critical role in the activation of innate immune responses in mammals by recognizing conserved pathogen-associated molecular patterns (10–12). To date, 13 members of the TLR family have been identified in mammals. TLR4 is a subclass of TLRs that can be activated by lipopolysaccharide (LPS) and by nonbacterial agonists, such as saturated fatty acids (13,14). The activation of TLR4 signaling induces upregulation of intracellular inflammatory pathways related to the induction of insulin resistance, such as c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and I κ B kinase complex (IKK β)/inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B α)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) (10). However, the role of TLR4 in the cross-talk between inflammatory and metabolic signaling has not yet been investigated. Here, we show that mice with a loss-of-function mutation in TLR4 (C3H/HeJ) are protected against the development of diet-induced obesity and insulin resistance and that, in isolated muscles from C3H/HeJ mice, there is a protection from saturated fatty acid-induced insulin resistance.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Male C3H/HeJ, C3H/HeN, and C57Black/10ScNC mice and their respective controls were obtained from The Jackson Laboratory and provided by the University of São Paulo. The mice were bred under specific pathogen-free conditions at the Central Breeding Center of University of Campinas. All antibodies were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), except anti-pAkt, which was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), anti-phospho-insulin receptor substrate-1 (IRS-1)^{S246/247} was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), and anti-F4/80 was from Abcam. Routine reagents were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO), unless otherwise specified.

All experiments were approved by the ethics committee at the State University of Campinas. Six-week-old male C3H/HeJ mice and their controls (C3H/HeN) were divided into two groups with similar body weights and assigned to receive two kinds of diet: a standard rodent chow and water ad libitum or a high-fat diet (HFD) consisting of 55% calories from fat, 29% from carbohydrate, and 16% from protein. Body weight and food intake were measured weekly. Glucose tolerance tests and insulin tolerance tests were performed on these mice after 5 weeks of consumption of the diets, as described previously (2,15).

Assays. Leptin, insulin, and adiponectin concentrations were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Linco). Serum free fatty acid (FFA) levels were analyzed using NEFA-kit-U (Wako Chemical, Neuss,

From the ¹Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil; the ²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and the ³Department of Pathology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Mario J.A. Saad, MD, Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13081-970. E-mail: msaad@fcm.unicamp.br.

Received for publication 14 November 2006 and accepted in revised form 18 May 2007.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 22 May 2007. DOI: 10.2337/db06-1565.

CLS, crown-like structure; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FFA, free fatty acid; HFD, high-fat diet; IGTT, intraperitoneal glucose tolerance test; I κ B α , inhibitor of nuclear factor- κ B; IKK β , I κ B kinase complex; IL, interleukin; IR, insulin receptor; IRS-1, insulin receptor substrate-1; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; RER, respiratory exchange ratio; TNF, tumor necrosis factor; TLR, Toll-like receptor; WAT, white adipose tissue.

© 2007 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Germany) with oleic acid as a standard. Glucose values were measured from whole venous blood with a glucose monitor (Glucometer; Bayer). We determined serum concentrations of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α using Mouse IL-6 ELISA and Mouse TNF- α ELISA (Pierce Endogen, Rockford, IL).

Light microscopy. Mice were fasted for 12 h and killed with an overdose of anesthetic (sodium thiopental). Epididymal white adipose tissue (WAT) depots were dissected and assessed by light microscopy, morphometry, and transmission electron microscopy. After dissection, WAT depots were fixed by immersion in 4% formaldehyde in 0.1 mmol/l phosphate buffer, pH 7.4, for <24 h, dehydrated, cleared, and then embedded in paraffin. Serial sections (5- μ m thick) were obtained and then stained by hematoxylin and eosin to assess morphology.

Morphometry. Tissue sections were observed with a Zeiss Axiophot light microscope using a $\times 40$ objective, and digital images were captured with a Canon PowerShot G5. Crown-like structure (CLS) density (average CLS within 10 high-power fields, per animal) and mean adipocyte surface area (average surface area of 30 randomly sorted adipocytes, per animal) were determined using ImageLab Analysis software (version 2.4), as described previously (16).

Electron microscopy. Ultrastructural examination followed standard procedures, as described elsewhere (17), with a Zeiss EM10 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Measurement of hepatic triglyceride content. Liver was homogenized and tissue triglyceride content was determined as described previously (18).

Isolation of the stroma vascular fraction and adipocyte fraction of adipose tissue. Epididymal fat pads were excised and isolation of the stroma vascular fraction and adipocyte fraction of adipose tissue was performed as described previously (19).

Real-time PCR. Total RNA was obtained from the adipocyte and stromal vascular fractions of WAT of the four groups of mice, according to methods published previously (8,20). Quantitative PCR was run to determine the expressions of TNF- α and IL-6 in each tissue fraction using primers supplied with the commercially available assays from Applied Biosystems (Mm00443258_m1 and Mm00446190_m1, respectively). The reference gene was GAPD (TaqMan, Applied Biosystems). Results are expressed as relative expression values, according to a method published previously (8).

Glucose uptake, glycogen synthesis, insulin signaling, and TLR-related signal transduction pathways in isolated soleus muscle. Soleus muscles from C3H/HeJ, C57BL/10ScNcr (TLR4 $^{-/-}$), and their respective control mice were isolated and incubated in the presence of palmitate for 4 h, as described previously (21). In some experiments, soleus muscles from C3H/HeJ mice and their controls were incubated in the presence of stearic and lauric acids for 4 h. In the basal state and 30 min after insulin treatment, glucose uptake and glycogen synthesis were measured. To investigate insulin signaling in these experiments, soleus muscles from C3H/HeJ and C57BL/10ScNcr (TLR4 $^{-/-}$) mice and their respective controls were incubated with insulin (10 mU/ml) for a further 5 min.

In some experiments, isolated soleus muscles from C3H/HeJ and C3H/HeN mice were incubated with LPS or palmitate for 1 h or preincubated in the absence (control group) or presence of 10 μ g/ml of an antagonist monoclonal antibody to TLR4 (MTS510) (22) and then in the absence or presence of LPS for 1 h or palmitate for 4 h. At the end of the incubation period, muscles were homogenized and then centrifuged, as described previously (21). The supernatants were used for immunoprecipitation and immunoblotting.

Oxygen consumption and respiratory exchange ratio determination. Oxygen consumption and respiratory exchange ratio (RER) were measured in fed animals through an indirect open circuit calorimeter (Oxymax Deluxe System; Columbus Instruments, Columbus, OH), as described previously (23).

Tissue extraction, immunoprecipitation, and immunoblotting. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium thiopental and used 10–15 min later, i.e., as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. Five minutes after the insulin injection (3.5 units/kg i.p.) muscle, adipose tissue, and liver were removed, minced coarsely, and homogenized immediately in extraction buffer, as described elsewhere (24). Extracts were then centrifuged at 15,000 rpm and 4°C for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for immunoprecipitation with α -insulin receptor (IR), IRS-1, and protein A-Sepharose 6MB (Pharmacia, Uppsala, Sweden). We performed immunoblotting on tissue extracts, as described previously (24).

Determination of NF- κ B activation. NF- κ B p50 activation was determined in nuclear extracts from muscle and adipose tissue by ELISA (90858; Pierce Biotechnology), according to the recommendations of the manufacturer.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SE, and the number of independent experiments is indicated. For statistical analysis, the groups were

compared using a two-way ANOVA with the Bonferroni test for post hoc comparisons. The level of significance adopted was $P < 0.05$.

RESULTS

Body weight, food intake, epididymal fat pad, and leptin levels of C3H/HeJ and control mice. Six-week-old male mice with a loss-of-function (Pro⁷¹²His) mutation in TLR4 (C3H/HeJ) and a strain-specific control (C3H/HeN) were fed a HFD, and control groups of each genotype were fed a standard mouse chow diet. Body weight after 8 weeks of the HFD was lower for the C3H/HeJ mice than for the control mice (Fig. 1A). After 8 months of the HFD diet, this difference was more evident. Eight-month-old C3H/HeJ mice fed a HFD weighed on average 15% less than HFD-fed control mice (Fig. 1B). Daily food intake was similar in control and C3H/HeJ mice, fed either a HFD or standard chow (Fig. 1C); however, 8-week cumulative food intake was higher for the HFD in both genotypes (data not shown). The epididymal fat pad weights of control and C3H/HeJ mice fed a chow diet were similar; however, when groups fed a HFD were compared, the average weight of epididymal fat depots was decreased by 40% in the C3H/HeJ mice (Fig. 1D). In addition, consumption of a HFD led to a 36% lower increase in blood leptin levels in C3H/HeJ than in control mice (Fig. 1E).

Adipose tissue morphology and ultrastructural features of adipose tissue of C3H/HeJ and control mice fed a HFD. We assessed whether these differences in HFD-induced weight gain were related to alterations in adiposity. Morphometric analysis (Fig. 1F–J) revealed that adipocytes from C3H/HeJ mice fed a HFD were consistently smaller than adipocytes from control mice fed a HFD with an average 30% decrease in size (Fig. 1J). In addition, the frequency and distribution of mature macrophages in fixed WAT differed among the groups. As described previously (25), macrophages were aggregated in CLSs, which contained up to 15 macrophages surrounding what appeared to be individual adipocytes. CLS formation was a rare event in control mice (1.0 ± 0.5) (Fig. 1F) or in C3H/HeJ mice (1.0 ± 0.5) (Fig. 1H) but was increased >100-fold (105.5 ± 7.8) in control mice fed a HFD (Fig. 1G) and only ~10-fold (11.5 ± 2.1) in C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 1I), indicating a much lower macrophage infiltration in WAT of the latter group. Ultrastructural analysis showed that CLSs were always composed of a dead adipocyte encircled by several typical macrophages. In control mice or C3H/HeJ mice fed a HFD, adipocyte death exhibited none of the classical features of apoptosis. Instead, in both groups, features consistent with necrosis (such as disruption of basal membranes, intracytoplasmic organelle degeneration, and cell debris) were commonly found, but necrosis was more evident in control mice fed a HFD (data not shown).

Increased metabolic rates in C3H/HeJ mice fed a HFD. We examined whether the decreased body weight in C3H/HeJ mice fed a HFD resulted from increased energy expenditure. The oxygen consumption rates of control and C3H/HeJ mice fed normal chow were similar (Fig. 2A). However, after 8 weeks of a HFD, C3H/HeJ mice exhibited significantly higher rates of O₂ consumption than control mice (Fig. 2A). The RERs of control and C3H/HeJ mice fed a chow diet were similar (Fig. 2B). In contrast, the RER was lower in C3H/HeJ mice fed a HFD than in control mice (Fig. 2B), indicating that these animals were largely using fatty acids as an energy source.

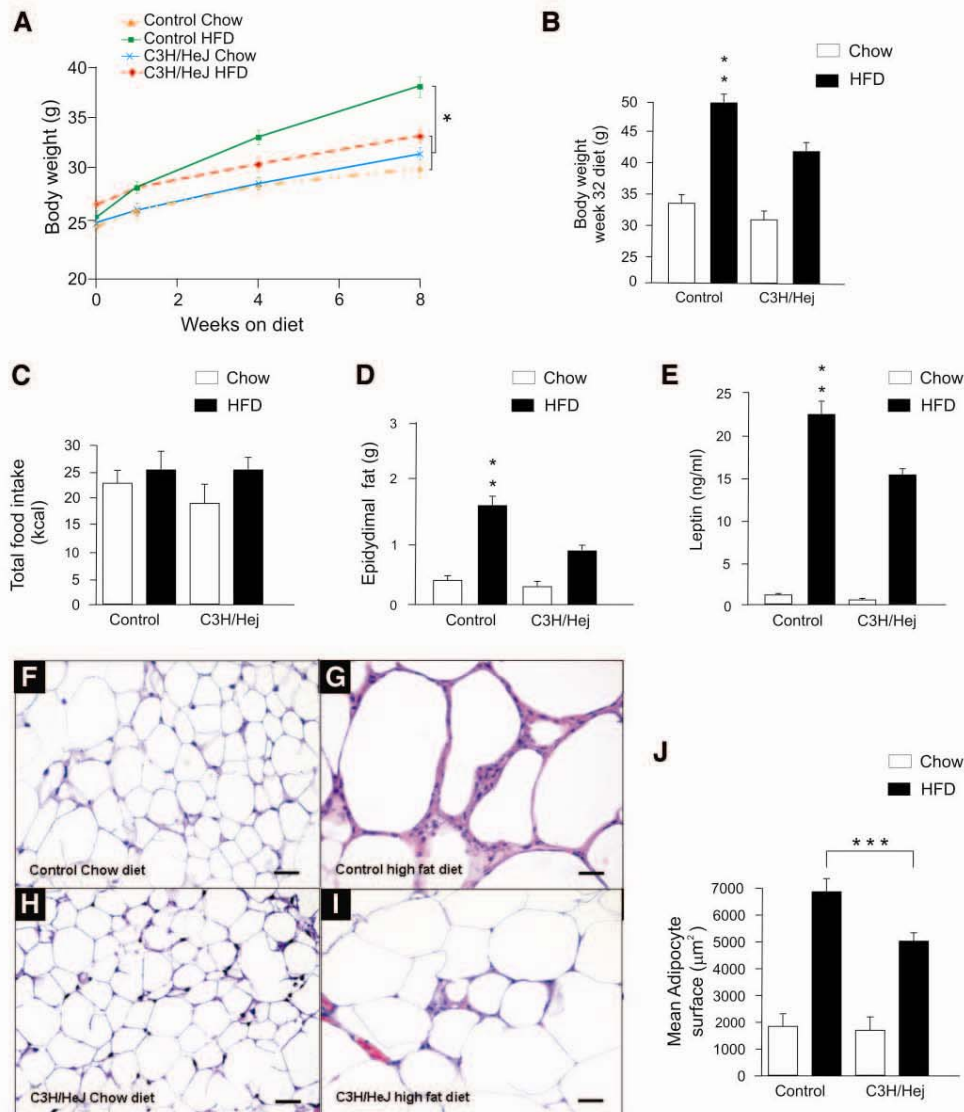


FIG. 1. Protection against diet-induced obesity in C3H/HeJ and adipose tissue morphology in control and C3H/HeJ mice. **A:** Body weight of C3H/HeJ and control mice fed a HFD and chow diet. **B:** Body weight of 8-month-old control and C3H/HeJ mice. **C:** Daily food intake with regular chow and a HFD. **D:** Epididymal fat pad weights. **E:** Week 8 fasting leptin concentrations. **F-I:** Histological sections of epididymal fat pads from control mice (**F**) and C3H/HeJ mice (**H**) fed on a chow diet and control mice (**G**) and C3H/HeJ mice (**I**) fed a HFD diet; 50-µm scale bar for all pictures. **J:** Mean adipocyte surface (square micrometers). Data are means \pm SE from six to eight mice per group. * $P < 0.05$ (control mice fed a HFD versus all others groups); ** $P < 0.01$ (control mice fed a HFD versus all others groups); *** $P < 0.01$ between groups, as indicated.

Serum FFA, TNF- α , IL-6, adiponectin, and hepatic triglyceride content in C3H/HeJ mice and control mice fed a HFD. We examined serum concentrations of adiponectin, IL-6, TNF- α , and FFAs, which have postulated roles in obesity and insulin action (26–34). Adiponectin

levels were comparable between control and C3H/HeJ mice fed a chow diet (Fig. 2C). In contrast, adiponectin levels were reduced in control mice fed a HFD, but not in C3H/HeJ mice fed the same diet (control + HFD 7.1 ± 0.4 vs. C3H/HeJ + HFD 9.5 ± 0.6 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.001$) (Fig. 2C).

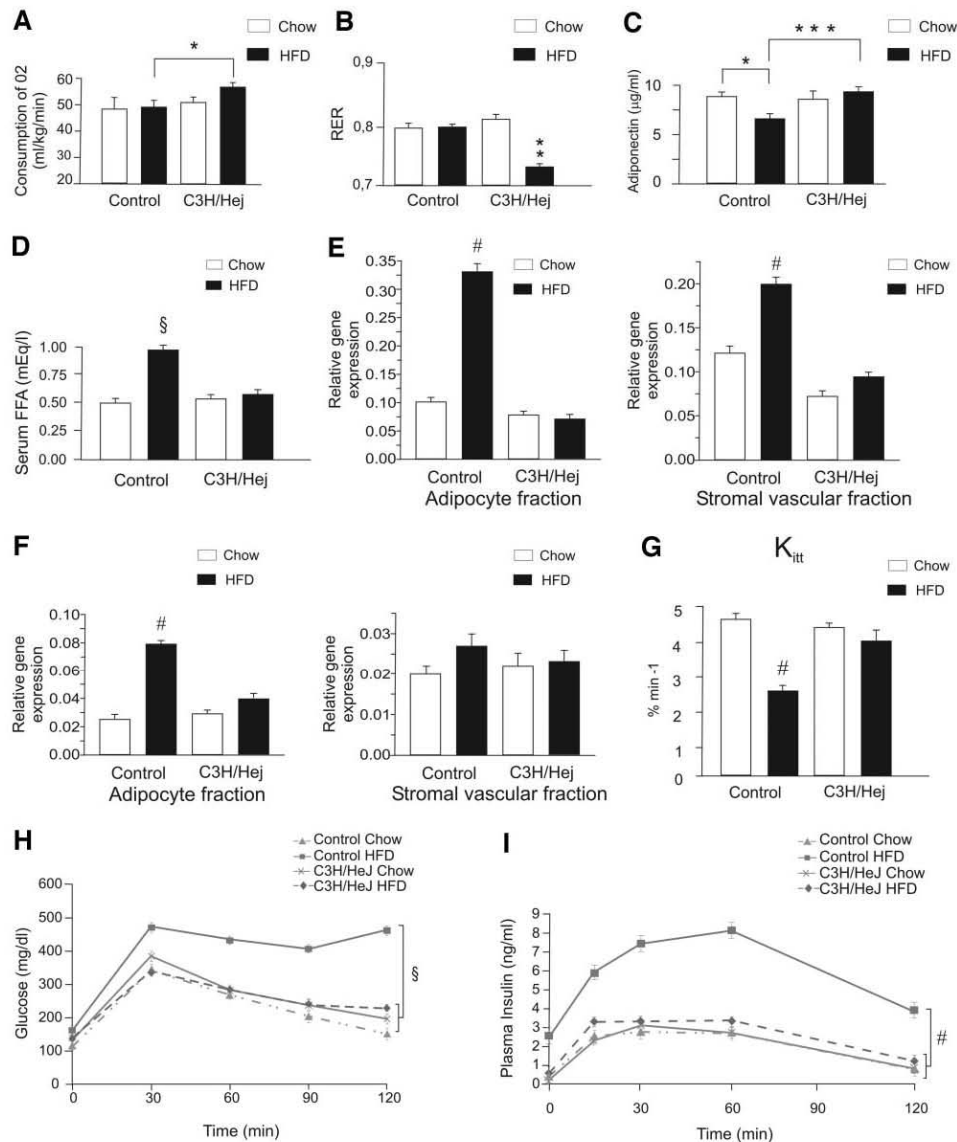


FIG. 2. Metabolic parameters, adipokines, insulin, and glucose tolerance in control and C3H/HeJ mice fed a chow or a HFD diet. **A:** Oxygen consumption. **B:** RER. **C:** Week 8 fasting adiponectin concentrations. **D:** Fasting FFA concentrations. **E:** Determination of the relative TNF- α mRNA expression by real-time PCR. **F:** Determination of the relative IL-6 mRNA expression by real-time PCR. **G:** Insulin tolerance test after 8 weeks of the diet. **H:** Glucose tolerance test after 8 weeks of the diet. **I:** Insulin response curve during the glucose tolerance test after 8 weeks of the diet. * $P < 0.05$ between groups, as indicated; ** $P < 0.001$ (C3H/HeJ mice fed a HFD versus all other groups); *** $P < 0.001$ (control mice fed a HFD versus C3H/HeJ mice fed a HFD); # $P < 0.05$ (control mice fed a HFD versus all other groups); § $P < 0.01$ (control mice fed a HFD versus all other groups). Data are means \pm SE from six to eight mice.

An analysis of FFAs showed no difference between control and C3H/HeJ mice fed the chow diet (Fig. 2D). In contrast, the increase in FFA levels observed in mice fed a HFD was

less pronounced in C3H/HeJ mice than in control mice (Fig. 2D). Serum TNF- α and IL-6 levels were only detectable in mice fed a HFD, and these levels were higher in the

control mice than in C3H/HeJ mice (TNF- α : control + HFD 467.71 \pm 87.8 vs. C3H/HeJ + HFD 115.2 \pm 73.11, $P < 0.001$; IL-6: control + HFD 249.43 \pm 55.12 vs. C3H/HeJ + HFD 47.54 \pm 42.25, $P < 0.001$). The relative amount of TNF- α transcript was significantly increased in the adipocyte and stromal vascular fractions of control mice fed a HFD compared with control and C3H/HeJ mice fed a chow diet and C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 2E). A significant increase of IL-6 expression was detected in the adipocyte but not stromal vascular fraction of control mice fed a HFD. This effect was absent in C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 2F). We next measured hepatic triglyceride content and found similar values between control and C3H/HeJ mice fed a chow diet. However, with the HFD, hepatic triglyceride increased more in the control than in the C3H/HeJ livers (35 \pm 7.5 vs. 22 \pm 6.2 mg/g, $P < 0.05$).

Improved glucose tolerance and insulin tolerance in C3H/HeJ mice. To investigate insulin and glucose tolerance, we performed an insulin tolerance test and an intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) and determined serum insulin levels at some time points during the IGTT. The glucose disappearance rate in response to insulin was lower in control than in C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 2G). This rate was indistinguishable between control and C3H/HeJ mice fed a chow diet (Fig. 2G). During the IGTT, after glucose infusion, the blood glucose levels of HFD-fed control mice were greater at all time points. In contrast, C3H/HeJ mice fed a HFD were protected against the development of glucose intolerance (Fig. 2H), as previously described (35). In addition, serum insulin levels at all time points during the IGTT in C3H/HeJ mice fed a HFD were significantly lower than those in control mice fed the same diet (Fig. 2D).

Insulin signaling in muscle and WAT of C3H/HeJ and control mice fed a HFD. In muscle, insulin-induced IR β , IRS-1 tyrosine phosphorylation, and Akt phosphorylation were reduced by 50–70% in control mice fed a HFD compared with C3H/HeJ mice fed the same diet (Fig. 3A–C), and these reductions were accompanied by a 50% reduction in IRS-1 protein content in the skeletal muscle (Fig. 3B). In WAT, insulin-mediated IR β , IRS-1 tyrosine phosphorylation, and Akt phosphorylation were reduced by 50–70% in control mice fed a HFD (Fig. 3D–F), and there was a 70% reduction in IRS-1 protein concentration (Fig. 3E). In contrast, high-fat feeding did not impair the stimulatory effect of insulin on IR β , IRS-1, and Akt phosphorylation in WAT of C3H/HeJ mice fed on a HFD (Fig. 3D–F).

Ser³⁰⁷ Phosphorylation of IRS-1 and activation of JNK and IKK β in muscle and WAT of high-fat-fed C3H/HeJ and control mice. We tested Ser³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1 in muscle and WAT of control and C3H/HeJ mice. Ser³⁰⁷ phosphorylation was induced by a HFD in both tissues of control mice but not in tissues of C3H/HeJ mice (Fig. 4A). IKK β activity was monitored using I κ B α protein abundance as described previously (36). I κ B α protein levels were reduced in muscle and adipose tissue of control but not C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 4B). We also measured NF- κ B nuclear subunit p50 activation and found an increase in the DNA binding of nuclear p50 in muscle and adipocytes of control mice fed a HFD but not in the other groups (Fig. 4C). JNK activation was determined by monitoring phosphorylation of JNK (Thr¹⁸³ and Tyr¹⁸⁵) and c-Jun (Ser⁶³), which is a substrate of JNK. In a similar fashion, JNK phosphorylation was

increased in adipose tissue and muscle of control but not C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 4D).

Insulin signaling and activation of JNK and IKK β in the liver of high-fat-fed C3H/HeJ and control mice. We next investigated insulin signaling in the livers of C3H/HeJ and control mice. We detected a 50% reduction in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation accompanied by a 30% reduction in IRS-1 protein content (Fig. 5A) and a 70% reduction in Akt phosphorylation (Fig. 5B) in the livers of control mice fed a HFD but not in C3H/HeJ mice fed the same diet. Ser³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1 and JNK phosphorylation were increased and I κ B α protein expression was decreased in the livers of control but not C3H/HeJ mice fed a HFD (Fig. 5C–E).

Protection from palmitate, stearic, and lauric acid-induced insulin resistance in isolated soleus muscle of C3H/HeJ and TLR4 knockout mice. It has recently been reported that TLR4 is activated by FFAs (37). We examined glucose uptake and glycogen synthesis in the presence of 100 μ M palmitate for 4 h. Palmitate treatment reduced insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis by 40–50% in isolated soleus muscle from control mice but not in isolated soleus muscle from C3H/HeJ mice (Fig. 6A and B). In accordance with this finding, palmitate induced a downregulation in insulin-induced IR (40%), IRS-1 (50%), and Akt (60%) phosphorylation in isolated soleus muscle of control mice but not in muscle of C3H/HeJ mice (Fig. 6C–E). We also investigated the effect of lauric and stearic acid on glucose metabolism and insulin signaling in isolated muscle. Stearic and lauric acid treatments reduced glucose uptake by ~40% and only 20%, respectively, in isolated soleus muscle from control mice but not in isolated soleus muscle from C3H/HeJ mice (Fig. 6F). We next investigated insulin signaling in isolated soleus muscle from control and C3H/HeJ mice after stearic and lauric acid treatments. We observed a downregulation in insulin-induced IR and IRS-1 tyrosine phosphorylation (data not shown) and Akt phosphorylation (reductions of 41 \pm 4 and 63 \pm 7%, respectively, for lauric and stearic acids) in isolated soleus muscle of control mice but not in the muscle of C3H/HeJ mice (Fig. 6G). Furthermore, we repeated the same protocol in isolated soleus muscle from TLR4^{-/-} and the respective control mice, and a protection from palmitate-induced insulin resistance related to glucose uptake, glycogen synthesis, and insulin signaling (data not shown) was also observed in isolated muscle from TLR4^{-/-} mice.

Palmitate treatment activates TLR4 signal transduction in isolated soleus muscle of control mice. We next examined the effect of palmitate treatment on TLR4 activation compared with that of a known TLR4 agonist, LPS. Similarly to LPS, palmitate administration induced the association of TLR4 with the adaptor protein, MyD88, in isolated muscle from control mice but not in muscle from C3H/HeJ mice (Fig. 7A and B). Palmitate treatment induced degradation of I κ B α and increased JNK phosphorylation and IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation in isolated muscle from control mice but not in isolated muscle from C3H/HeJ mice (Fig. 7C–E). We measured the NF- κ B nuclear subunit p50 activation after palmitate treatment and found an increase in the DNA binding of nuclear p50 in isolated muscle of control mice but not in muscle from C3H/HeJ mice (Fig. 7F).

Treatment of isolated soleus muscle of control mice with a TLR4 antagonistic antibody blocks palmitate-

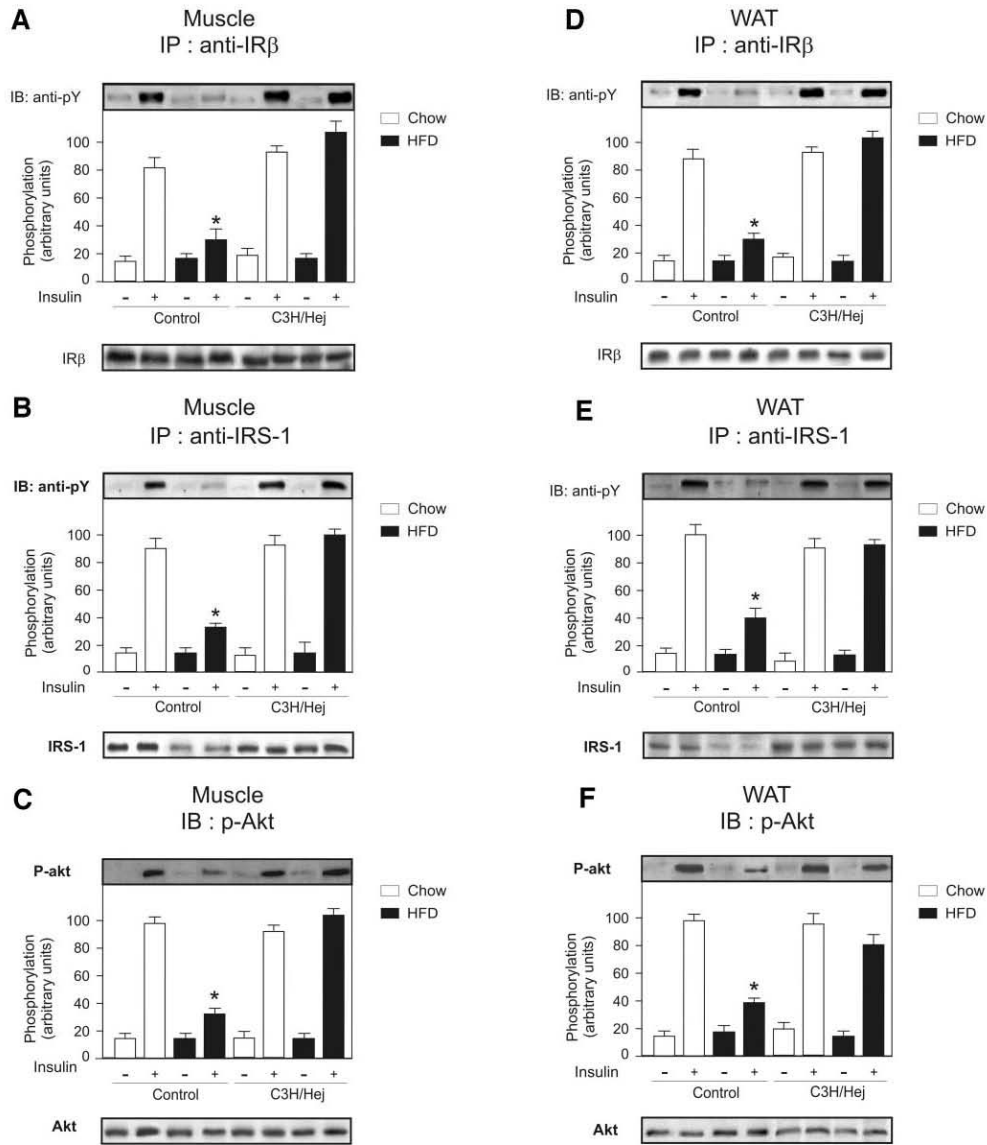


FIG. 3. Effects of high-fat feeding on insulin-signaling components in muscle and WAT of control and C3H/HeJ mice fed a 2-month diet. **A** and **D**: Insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR. **B** and **E**: Insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-1 protein level. **C** and **F**: Insulin-induced serine phosphorylation of Akt. Bars represent means \pm SE from six to eight mice. * $P < 0.05$ (insulin-stimulated control mice fed a HFD versus all others groups also stimulated with insulin). IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate.

induced insulin resistance. To reinforce the importance of TLR4 in the development of insulin resistance, we investigated whether the inhibition of TLR4, through the use of the TLR4 antagonist antibody MTS510, could reverse LPS- and palmitate-induced inhibition of insulin-induced IR/IRS-1 and Akt phosphorylation. Isolated soleus

muscles of control mice were pretreated with MTS510 for 1 h before exposure to 100 $\mu\text{mol/l}$ palmitate. The results showed that MTS510 treatment prevented palmitate-induced reduced insulin-stimulated glucose uptake (Fig. 8A) and glycogen synthesis (data not shown). In addition, we found that MTS510 treatment prevented the deleteri-

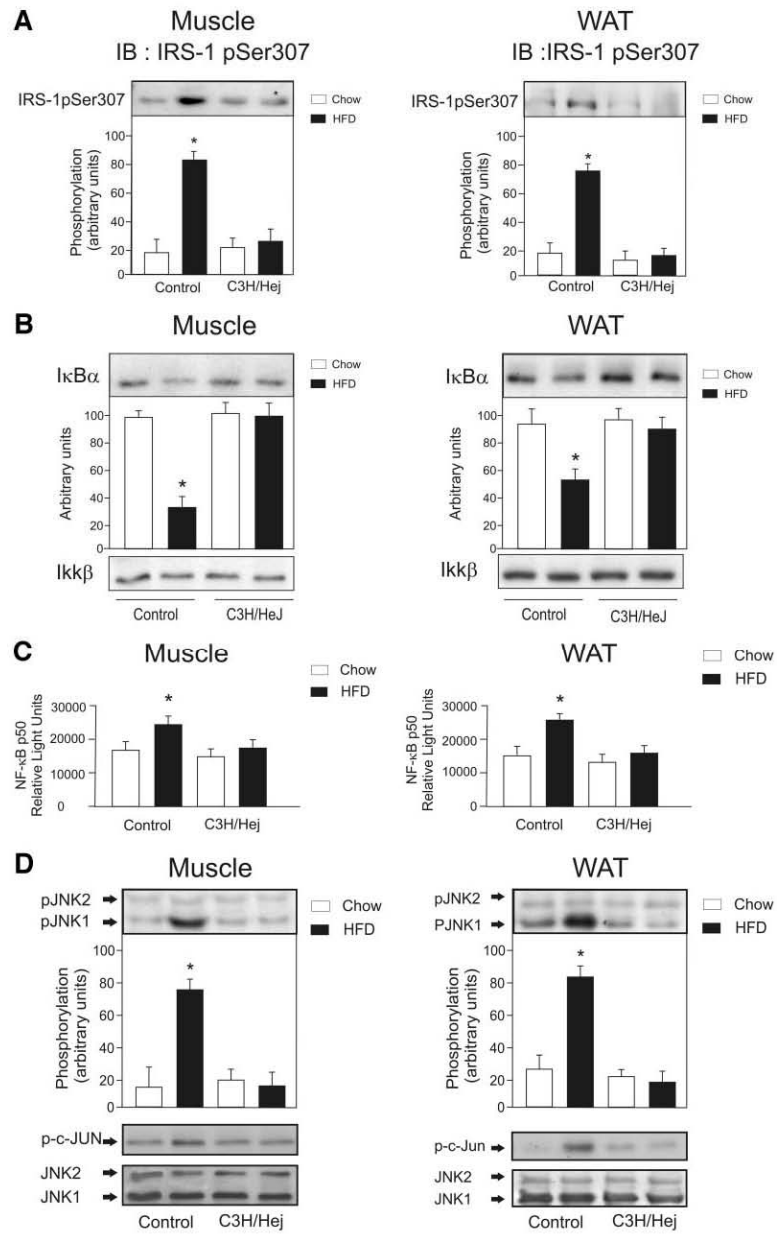


FIG. 4. Effects of high-fat feeding on Ser³⁰⁷ phosphorylation of IRS1 and reduced IKK β activity and JNK activation in muscle and WAT of C3H/HeJ mice fed a HFD compared with control mice. *A*: Ser³⁰⁷ phosphorylation of IRS1 in muscle and WAT. *B*: IKK β protein levels. *C*: Transcription factor binding assay of NF- κ B p50 nuclear extracts from muscle and WAT. *D*: Phosphorylation of JNK and Jun. Representative blots are shown from experiments that were repeated independently at least three times with similar results. * $P < 0.05$ (control mice fed a HFD versus all others groups).

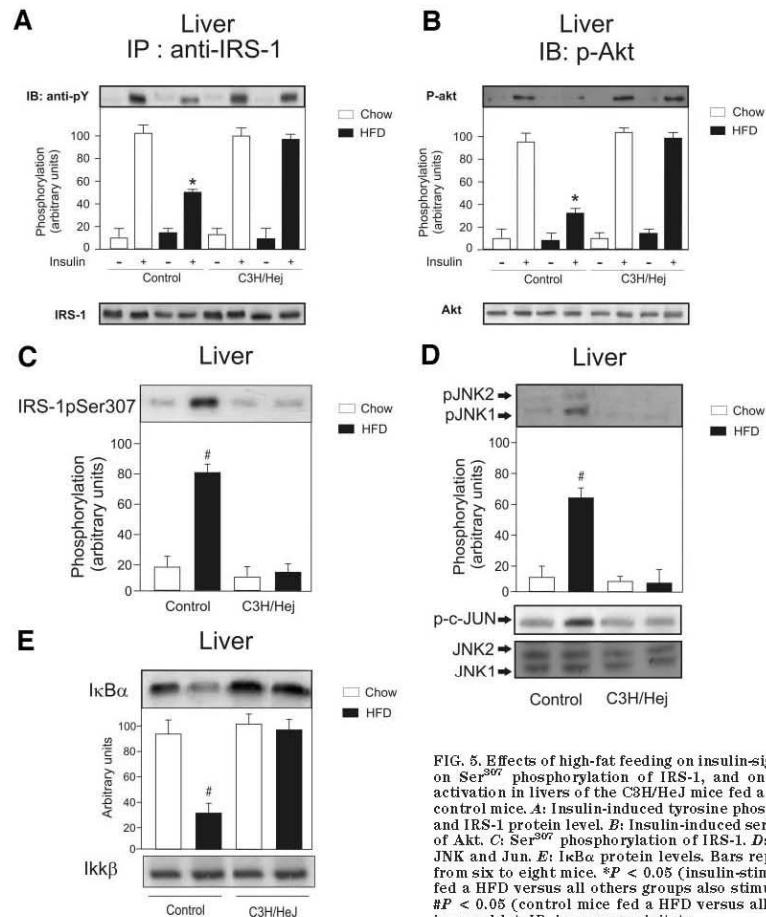


FIG. 5. Effects of high-fat feeding on insulin-signaling components, on Ser³⁹⁷ phosphorylation of IRS-1, and on JNK and on IKK β activation in livers of the C3H/HeJ mice fed a HFD compared with control mice. *A*: Insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-1 protein level. *B*: Insulin-induced serine phosphorylation of Akt. *C*: Ser³⁹⁷ phosphorylation of IRS-1. *D*: Phosphorylation of JNK and Jun. *E*: I κ B α protein levels. Bars represent means \pm SE from six to eight mice. * P < 0.05 (insulin-stimulated control mice fed a HFD versus all others groups also stimulated with insulin); # P < 0.05 (control mice fed a HFD versus all others groups). IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate.

ous effects of LPS and palmitate on insulin signaling (Fig. 8B–D). Furthermore, isolated muscle preincubated with MTS510 antibody demonstrated a significant decrease in palmitate-induced I κ B α degradation and JNK phosphorylation (Fig. 8E and F).

DISCUSSION

Here we show that C3H/HeJ mice, which have a loss-of-function mutation in TLR4, are protected against the development of diet-induced obesity and insulin resistance. In addition, in isolated muscles from C3H/HeJ mice, there was a protection from saturated fatty acid–induced insulin resistance.

The C3H/HeJ mice fed a HFD gain less weight without changing food intake, have a reduced adipose mass, and demonstrate a less pronounced increase in adipocyte size than their controls. Recently, Shi et al. (38) showed that female but not male TLR4^{−/−} mice fed a HFD had increased body weight, associated with increased food intake, compared with control mice. The reason for the

difference in body weight and food intake between female TLR4^{−/−} mice fed a HFD and HFD-fed C3H/HeJ mice, which have an inactivation mutation in TLR4 is not clear but may be related, at least in part, to sex, strain, and the type of genetic alteration in TLR4. In this regard, some responses may be different in animals with point mutations or in knockout animals, as described previously (39,40), and we may hypothesize that C3H/HeJ or TLR4^{−/−} mice may not have exactly the same regulation of food intake and/or energy expenditure; however, this point deserves further investigation.

The protection from diet-induced obesity in C3H/HeJ mice fed a HFD is linked to an increase in oxygen consumption and a decrease in RER, indicating that these animals were largely using fatty acids as an energy source. Taken together, these results demonstrate that the attenuation of diet-induced weight gain in C3H/HeJ mice is associated with a decreased adipocyte size, decreased macrophage infiltration in WAT, and increased energy expenditure and fat oxidation in the context of dietary

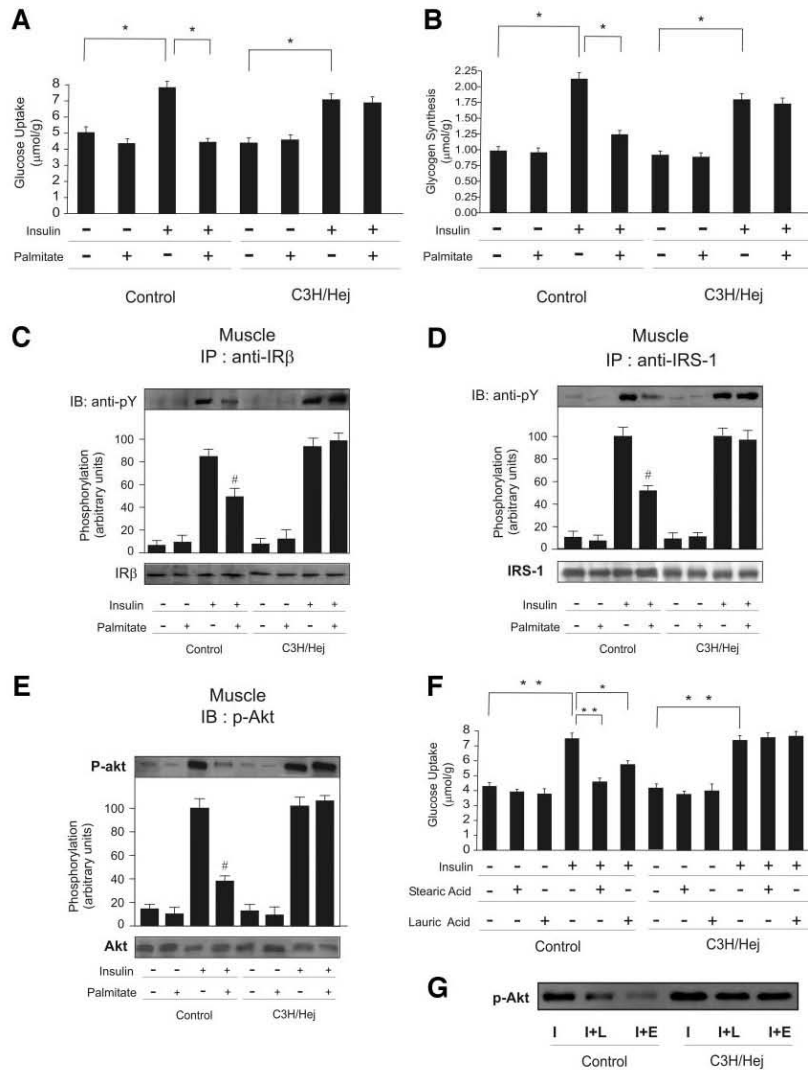


FIG. 6. Protection from saturated fatty acid-induced insulin resistance in isolated muscle of C3H/HeJ mice. **A:** Effect of palmitate on insulin-induced glucose uptake in isolated soleus muscle from control and C3H/HeJ mice. **B:** Effect of palmitate on insulin-induced glycogen synthesis in soleus muscles from control and C3H/HeJ mice. **C–E:** Effect of palmitate on insulin-stimulated phosphorylation of IR (**C**), IRS-1 (**D**), and Akt (**E**) in C3H/HeJ and control mice. **F:** Effect of stearic and lauric acids on insulin-induced glucose uptake in isolated soleus muscle from control and C3H/HeJ mice. **G:** Effect of stearic and lauric acids on insulin-stimulated phosphorylation of Akt. * $P < 0.05$ between groups, as indicated; ** $P < 0.01$ between groups, as indicated; # $P < 0.05$ (insulin + palmitate versus insulin alone in control mice). Representative blots are shown from experiments that were repeated independently at least three times with similar results. I, insulin; I+E, insulin + stearic acid; I+L, insulin + lauric acid; IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate.

obesity. In addition, the attenuated increase in FFAs, TNF- α , and IL-6 in C3H/HeJ mice fed a HFD was associated with protection from glucose intolerance and insulin resistance. During the preparation of this article, Suganami et al. (41) and Poggi et al. (42) also reported that C3H/HeJ mice have attenuated adipose tissue inflammation compared with control mice during feeding of a HFD.

The blunted insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation and phosphorylation of Akt in muscle, WAT, and liver of HFD-fed control mice was prevented in C3H/HeJ mice, providing a biochemical correlate for increased in vivo insulin sensitivity. Serine phosphorylation of IRS-1 has been proposed as a general mechanism of functional inhibition of the IRS-1 protein, and Ser³⁰⁷ phosphorylation

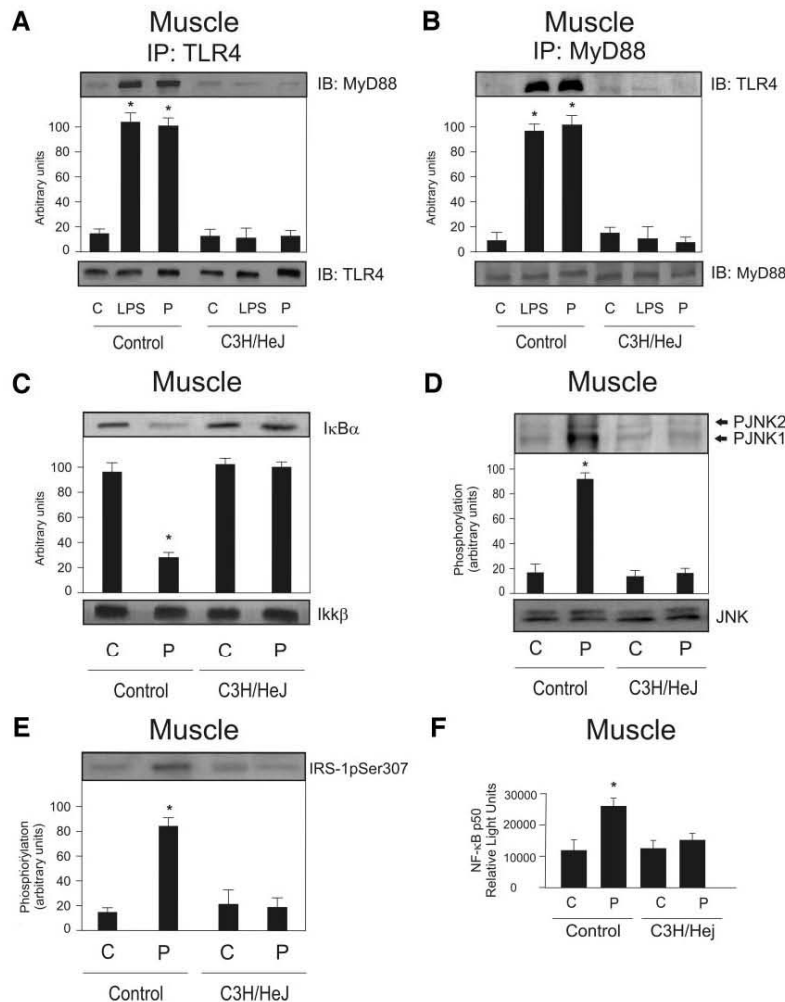


FIG. 7. Protection from palmitate activation of TLR-related signal transduction pathways in isolated muscle of C3H/HeJ mice. Coimmunoprecipitation of MyD88 with TLR4 receptor (A) and of TLR4 with MyD88 (B) in isolated muscles from C3H/HeJ and control mice. C: IkB α protein levels. D: phosphorylation of JNK. E: Ser³⁰⁷ phosphorylation of IRS1. F: Transcription factor binding assay of NF- κ B p50 nuclear extracts from isolated soleus muscle. * $P < 0.05$ (LPS or palmitate versus basal control in control mice). C, control; IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate; P, palmitate. Representative blots are shown from experiments that were repeated independently at least three times with similar results.

has become a molecular indicator of insulin resistance (3,4,43,44). Ser³⁰⁷ phosphorylation was induced by the HFD in tissues of HFD-fed control mice, accompanied by a reduction in IRS-1 protein expression in muscle, WAT, and liver and in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation levels. This regulation of IRS-1, induced by the HFD, was prevented in C3H/HeJ mice.

Ser³⁰⁷ is reported to be a phosphoacceptor of JNK and IKK β (43,44), and, as described previously (1,3), our results also show that these kinases are activated in

tissues of HFD-fed control mice. It is well known that the activation of TLR4 induces a complex signaling pathway that activates IKK β and JNK (10). Our data demonstrating that a point mutation in TLR4, which inactivates this receptor, prevents diet-induced obesity, activation of IKK β and JNK, and insulin resistance suggest that TLR4 is a key modulator in the cross-talk between inflammatory and metabolic pathways.

Despite the protection from diet-induced insulin resistance related to a reduction in adipose mass, a direct effect

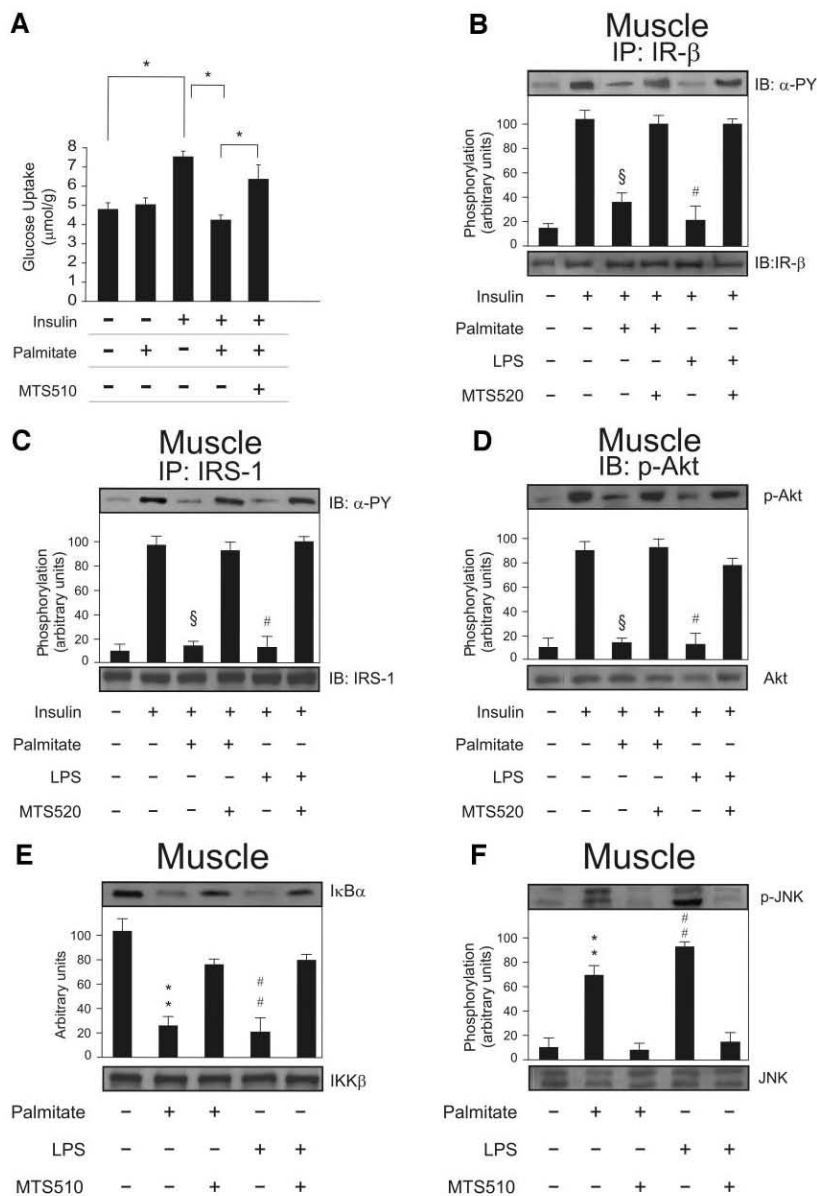


FIG. 8. The antagonist monoclonal TLR4 antibody (MTS510) inhibits palmitate-induced insulin resistance and activation of TLR4-related signal transduction pathways. **A**: Effect of palmitate on insulin-induced glucose uptake in isolated soleus muscle from control mice pretreated with MTS510. **B**: Effect of palmitate on insulin-induced phosphorylation of the IR (**B**), IRS-1 (**C**), and Akt (**D**) in isolated soleus muscle from control mice pretreated with MTS510. **E**: IκBα protein levels. **F**: Phosphorylation of JNK. **P* < 0.05 between groups, as indicated; §*P* < 0.05 (insulin + palmitate versus insulin alone); #*P* < 0.05 (insulin + LPS versus insulin alone); ***P* < 0.05 (palmitate versus basal control); ###*P* < 0.05 (LPS versus basal control). Representative blots are shown from experiments that were repeated independently at least three times with similar results. IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate.

of the TLR4 mutation on muscle tissue is also observed. Our data demonstrate that, in isolated muscle from control mice, palmitate induced the association of MyD88 with the TLR4 receptor, activated downstream kinases such as IKK β and JNK, weakened insulin signal transduction, and reduced glucose uptake and glycogen synthesis; however, this effect was not observed in isolated muscle from C3H/HeJ and TLR4^{-/-} mice. These data indicate that, independently of the changes in adipose tissue and in circulating FFAs, a loss of TLR4 function protects muscle from palmitate, stearic, and lauric acid-induced insulin resistance. In accordance with this finding, recent reports indicated that TLR2 or TLR4 is important for FFA-induced insulin resistance in myotubes or in adipocytes (38,45–47). In addition, it has been recently demonstrated by Shi et al. (38) that FFAs can act through TLR4 on adipose cells and macrophages to induce inflammatory signaling and suppress insulin signaling. Our data clearly show that palmitate and stearic acid, and to a lesser extent lauric acid, activate TLR4 signaling in muscle and that the capacity of these fatty acids to induce inflammatory signaling and to reduce insulin signaling and insulin-mediated glucose metabolism is blunted in muscle with a loss-of-function or absence of TLR4.

Our results also show that a known TLR4 ligand, LPS, is able to activate a pathway similar to those activated by palmitate treatment, inhibiting insulin signal transduction. In addition, the inhibition of TLR4, through the use of the TLR4 antagonist antibody, MTS510, could reverse LPS- and palmitate-induced inhibition of insulin-induced IR/IRS-1 and Akt phosphorylation. These data indicate that TLR4 activation by multiple factors may play an important role in the development of insulin resistance in sepsis and obesity and that the modulation of this receptor may prevent insulin resistance.

In summary, our data showing that a loss-of-function point mutation in TLR4 prevents diet-induced obesity, activation of IKK β , JNK, and insulin resistance in mice fed a HFD, and also saturated fatty acid-induced insulin resistance in isolated muscle, indicate that TLR4 is a key modulator in the cross-talk between inflammatory and metabolic pathways. We, therefore, suggest that a selective interference with TLR4 presents an attractive opportunity for the treatment of human obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes.

REFERENCES

- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 293:1673–1677, 2001
- Perreault M, Marette A: Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7:1138–1143, 2001
- Hirosumi J, Tuneman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333–336, 2002
- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF: c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278:2896–2902, 2003
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF: The c-Jun NH₂ terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser³⁰⁷. *J Biol Chem* 278:9047–9054, 2003
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M: IKK β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191–195, 2005
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE: Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med* 11:183–190, 2005
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1805, 2003
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821–1830, 2003
- Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335–376, 2003
- Beutler B: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257–263, 2004
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801, 2006
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085–2088, 1998
- Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH: Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 278:37041–37051, 2003
- Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ: S-Nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54:959–967, 2005
- Schenka AA, Machado CM, Grippo MC, Queiroz LS, Schenka NG, Chagas CA, Verinaud L, Brousseau P, Vassallo J: Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 25:929–941, 2005
- Metze K, Andrade LA: Atypical stromal giant cells of cervix uteri—evidence of Schwann cell origin. *Pathol Res Pract* 187:1031–1035; discussion 1036–1038, 1991
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494–1505, 2006
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175–184, 2007
- Bertelli DF, Araujo EP, Cesquini M, Stoppa GR, Gasparotto-Contessotto M, Toyama MH, Felix JV, Carvalheira JB, Michelini LC, Chiavegatto S, Bescbero AC, Saad MJ, Lopes-Cendes I, Velloso LA: Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositol trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 147:5385–5399, 2006
- Massao Hirabara S, de Oliveira Carvalho CR, Mendonca JR, Pilcher Haber E, Fernandes LC, Curi R: Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). *FEBS Lett* 541:109–114, 2003
- Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K: Cutting edge: Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 164:3471–3475, 2000
- Hirabara SM, Silveira LR, Alberici LC, Leandro CV, Lambertucci RH, Polimeno GC, Cury Boaventura MF, Procopio J, Vercesi AE, Curi R: Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1757:57–66, 2006
- Throne AC, Carvalheira JB, Hirata AE, Velloso LA, Saad MJ: Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology* 145:251–253, 2004
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347–2355, 2005
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327–334, 2001
- Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3–10, 1997
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610–614, 1997
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide

- T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946, 2001
31. Lassar MA: How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307:373-375, 2005
32. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B: Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084-2089, 2002
33. Senn JJ, Klover PJ, Nowak LA, Mooney RA: Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51:3391-3399, 2002
34. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE: Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9:414-417, 2001
35. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC: C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 136:17-24, 1998
36. Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J: Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem* 278:24944-24950, 2003
37. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D: Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:16683-16689, 2001
38. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025, 2006
39. Murciano C, Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Gil ML: Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol* 44:149-157, 2006
40. Palliser D, Huang Q, Hacohen N, Lamontagne SP, Guillen E, Young RA, Eisen HN: A role for Toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8⁺ T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. *J Immunol* 172:2585-2593, 2004
41. Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y: Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 354:45-49, 2007
42. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, Peiretti F, Verdier M, Juhan-Vague I, Tanti JF, Burcelin R, Alessi MC: C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50:1267-1276, 2007
43. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF: Phosphorylation of Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277:1531-1537, 2002
44. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J Biol Chem* 277:48115-48121, 2002
45. Senn JJ: Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281:26865-26875, 2006
46. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB: Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346:739-745, 2006
47. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y: Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:84-91, 2007