



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

SYNARA CAVALCANTE LOPES BRAGA

**EFEITO DA INTOXICAÇÃO POR METILMERCÚRIO NO PERFIL LIPÍDICO,
ALTERAÇÕES NO TECIDO ADIPOSE BRANCO EPIDIDIMÁRIO E FÍGADO DE
CAMUNDONGOS C57BL6/J APOE NOCAUTES**

FORTALEZA
2022

SYNARA CAVALCANTE LOPES BRAGA

EFEITO DA INTOXICAÇÃO POR METILMERCÚRIO NO PERFIL LIPÍDICO,
ALTERAÇÕES NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMÁRIO E FÍGADO DE
CAMUNDONGOS C57BL6/J APOE NOCAUTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Biomedicina. Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B795e Braga, Synara Cavalcante Lopes.

Efeito da intoxicação por metilmercúrio no perfil lipídico, alterações no tecido adiposo branco epididimário e fígado de camundongos c57bl6 apoe nocautes / Synara Cavalcante Lopes Braga. – 2022.

107 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. mercúrio. 2. compostos de metilmercúrio. 3. camundongos knockout para ApoE. 4. tecido adiposo branco. 5. doenças cardiovasculares. I. Título.

CDD 610

SYNARA CAVALCANTE LOPES BRAGA

EFEITO DA INTOXICAÇÃO POR METILMERCÚRIO NO PERFIL LIPÍDICO,
ALTERAÇÕES NO TECIDO ADIPOSE BRANCO EPIDIDIMÁRIO E FÍGADO DE
CAMUNDONGOS C57BL6/J APOE NOCAUTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Biomedicina. Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Aprovado em: ____ / ____ / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a. Dr^a. Carla Soraya Costa Maia
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

À Santíssima Trindade em primeiro lugar.
À Maria, intercessora e mãe do céu. À
minha família, meu esposo Francisco
Esio e meu filho Francisco Eduardo. Aos
meus pais, Alberto e Cecília.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pelo seu amor e onipresença.

Ao meu esposo Francisco Esio Moreira de Alencar Braga, pela paciência e cuidado com nosso filho Francisco Eduardo Lopes de Alencar Braga enquanto estive ausente na família para se fazer presente nas incontáveis experimentações científicas e escrita da tese.

Aos meus pais, Alberto Magno Vieira Lopes e Cecília de Fátima Cavalcante Lopes, pelo amor, pela base construída, cuidado, apoio incondicional e orações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela acolhida, confiança e todo o direcionamento.

Aos professores da banca, Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo, Prof^a. Dr^a. Carla Soraya Costa Maia, Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e Prof^a. Dr^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, por aceitarem fazer parte deste momento e por todas as contribuições.

À professora Dra. Jacqueline Alvarez Leite da Universidade de Minas Gerais e sua aluna Paola Caroline Lacerda Leocádio, pelas análises de mercúrio no pelo e estresse oxidativo.

À professora Dra. Maria Izabel Florindo Guedes da Universidade Estadual do Ceará e ao seu aluno Arnaldo Solheiro Bezerra, pelas análises de PCR.

Ao Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo, pela parceria NuBEx – LABICONTE, sem a qual a experimentação animal não teria ocorrido.

À professora Dra. Karuza Maria Alves Pereira, à colega Conceição da Silva Martins Rebouças (Josy) e à técnica Ludimila Gomes Pinheiro do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI), pelos cortes histológicos e para análise de morfometria do tecido adiposo e pela microscopia.

Ao Dr. Carlos Gustavo Hirth, patologista do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC, pelas análises de esteatose hepática.

Ao colega Gdayllon Cavalcante Meneses, do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da UFC, por toda a ajuda na análise de leptina plasmática por ELISA.

Aos colegas Paulo Iury Gomes Nunes e Gabrielle de Paula Freire, do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), pelas orientações quanto à coleta de tecido adiposo epididimário dos camundongos.

Aos colegas do LABICONTE, pela paciência e contribuição com este trabalho, em especial Daniel Vieira Pinto, Cássia Rodrigues Roque, Gabriella Araújo Matos e Ronaldo Dias.

Aos alunos de iniciação científica Carolyne Moreira, André Penha, Sofia Lima de Oliveira e Paulo Felipe Guimarães Silva, por toda a ajuda.

Aos colegas nutricionistas do Hospital Universitário Walter Cantídio, pelo apoio e torcida, em especial à chefe do Setor de Nutrição Priscila Taumaturgo Holanda Melo, pela compreensão nesta fase.

Aos residentes nutricionistas do Hospital Universitário Walter Cantídio, em especial aos residentes da área de Transplante: Valéria Silva de Lima, Elissa Maria do Nascimento Cardozo, Raquel Bezerra de Abreu e Samuel Alves da Silva, pela ajuda inestimável.

Às amigas Livia Aline de Araújo Batista, Natália Bitar da Cunha Olegário e Tanila Aguiar Andrade Coutinho, pela amizade compartilhada neste período que será estendida para a vida.

Ao meu trio preferido, Clarissa Eufrásio Gomes Parente, Sabrina Pinheiro Nogueira e Thályda Vieira Machado, pela torcida incondicional.

Aos meus irmãos Karina Cavalcante Lopes e Victor Cavalcante Lopes, pelo apoio de sempre.

Ao amigo Antônio Brazil Viana Junior, pelo apoio e orientações quanto à estatística.

Aos amigos da Gerência de Ensino e Pesquisa do HUWC, pelo apoio.

Às secretárias Ivone Mary Fontenele e Rita de Cássia Fernandes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas por toda disponibilidade e gentileza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, coordenação, secretaria e professores pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Ao Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e à Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), pelo incentivo à conclusão deste doutorado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo e fomento da pesquisa nacional.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal pesado e o terceiro elemento mais tóxico do planeta. A intoxicação mercurial é um problema de saúde pública em regiões endêmicas do Brasil, especialmente na região Amazônica. Recentemente, evidências apontam para um efeito da intoxicação mercurial no risco cardiovascular e aterosclerótico. Por outro lado, a pandemia da obesidade é uma preocupação mundial que afeta todas as faixas etárias, aumentando o risco cardiovascular e de doenças crônico-degenerativas. Neste estudo, objetivamos avaliar o efeito da intoxicação com metilmercúrio (MeHg) (20mg/L na água de beber por 20 dias) nas alterações estruturais e funcionais do tecido adiposo branco epididimário em camundongos machos ApoE nocautes (ApoE ko) e selvagens (25-30g de peso). Animais ApoE ko são dislipidêmicos, sendo utilizados em modelo experimental de doença cardiovascular. Foram investigados o delta e ganho de peso, peso do tecido adiposo epididimário e do fígado, nível plasmático de leptina, triglicerídeos e colesterol. Para avaliar lesão hepática, foram analisadas concentrações hepáticas de hidroperóxidos, superóxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e escore de esteatose hepática. Além disso, foi analisada expressão gênica de LCAT, NFκB, HMGCR, ApoA1, TNF-α e PPARγ e morfometria do tecido adiposo epididimário. A intoxicação com MeHg reduziu ganho de peso de animais selvagens intoxicados com MeHg quando comparados aos seus controles ($p < 0,05$). O peso do tecido adiposo epididimário e as concentrações plasmáticas de leptina foram menores nos animais ApoE ko controles e intoxicados, quando comparados aos selvagens controles ($p < 0,05$). As concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol total foram mais elevadas nos animais ApoE ko com ou sem intoxicação mercurial ($p < 0,05$). As concentrações plasmáticas de colesterol total foram significativamente mais elevadas em ApoE ko intoxicados quando comparadas com ApoE ko controles. O peso do fígado foi maior ($p < 0,05$) no grupo ApoE ko intoxicado quando comparado ao grupo controle selvagem. Esteatose hepática foi detectada em animais ApoE ko intoxicados quando comparados aos selvagens controles e foi aumentada em animais ApoE ko intoxicados em comparação com ApoE ko controles ($p < 0,05$). Os animais intoxicados apresentaram concentrações de TBARS mais elevadas independente da presença ou não da ApoE ($p < 0,05$). As concentrações de SOD foram significativamente maiores nos animais selvagens e ApoE ko intoxicados quando comparadas aos seus respectivos controles ($p < 0,05$). As concentrações de ALT e AST foram maiores nos animais ApoE ko independente da intoxicação mercurial. Não foram encontradas diferenças nas expressões gênicas de LCAT, NFκB, HMGCR, ApoA1, TNFα e PPARγ entre os grupos estudados. O diâmetro médio dos adipócitos foi menor em ApoE ko controles e intoxicados, quando comparados aos animais selvagens ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que a deficiência da ApoE e intoxicação mercurial afetam a estrutura e função do tecido adiposo e causam alterações hepáticas.

Palavras-chave: mercúrio; compostos de metilmercúrio; camundongos knockout para ApoE; tecido adiposo branco; doenças cardiovasculares; epidídimo; fígado gorduroso.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a heavy metal and the third most toxic element on the planet. Mercury intoxication is a public health problem in endemic regions of Brazil, especially in the Amazon region. Recently, evidence pointed to an effect of mercury intoxication on cardiovascular and atherosclerotic risk. On the other hand, the obesity pandemic is a global concern that affects all age groups, increasing the risk of cardiovascular and chronic-degenerative diseases. In this study, we evaluated the effect of methylmercury intoxication (MeHg) (20mg/L in drinking water for 20 days) on structural and functional changes in the epididymal white fat tissue in male ApoE knockout (ApoE ko) and wild-type (25-30 g weight) mice. ApoE ko animals are dyslipidemic, being used as experimental model of cardiovascular disease. Delta and weight gain, epididymal adipose tissue and liver weight, plasma concentrations of leptin, triglycerides, and cholesterol were investigated. To assess liver injury, liver assays of hydroperoxide, superoxide dismutation (SOD), thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and hepatic steatosis score were analyzed. In addition, gene expression of LCAT, NFκB, HMGCR, ApoA1, TNF-α, and PPAR and the epididymal adipose tissue morphometry were analyzed. MeHg intoxication reduced weight gain of MeHg-intoxicated wild-type animals when compared to their controls ($p<0.05$). Epididymal adipose tissue weight and leptin plasma concentrations were lower in ApoE ko control and in intoxicated mice when compared to wild-type controls ($p<0.05$). Plasma concentrations of triglycerides and total cholesterol were higher in ApoE ko mice with or without MeHg intoxication ($p<0.05$). Total cholesterol concentrations were significantly higher in ApoE ko intoxicated when compared to ApoE ko controls. Liver weight was higher ($p<0.05$) in the intoxicated ApoE ko group when compared to the wild-type control group. Hepatic steatosis was detected in intoxicated ApoE ko mice when compared to wild-type controls and was increased in intoxicated ApoE ko mice when compared to ApoE ko controls ($p<0.05$). Intoxicated animals showed higher concentrations of TBARS regardless of the presence or absence of ApoE ($p<0.05$). SOD concentrations were significantly higher in intoxicated wild-type and ApoE ko animals when compared to their respective controls ($p<0.05$). ALT and AST concentrations were higher in ApoE ko animals regardless of MeHg intoxication. No differences were found in gene expressions of LCAT, NFκB, HMGCR, ApoA1, TNFα, and PPARγ between the groups studied. The mean diameter of adipocytes was smaller in ApoE ko controls and intoxicated, when compared to wild-type animals ($p<0.05$). The results suggest that ApoE deficiency and MeHg intoxication affect the structure and function of adipose tissue and cause hepatic changes.

Keywords: mercury; methylmercury compounds; ApoE; adipose tissue; cardiovascular diseases; epididymis; fatty liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Uso médio de mercúrio em mineração de ouro artesanal e em pequena escala por anos (toneladas).....	17
Figura 2	Ciclo do Mercúrio.....	18
Figura 3	Distribuição geoespacial de emissões de Hg para o ar de fontes antropogênicas.	20
Figura 4	Tipos de tecido adiposo.....	24
Figura 5	Distribuição do tecido adiposo em humanos.....	26
Figura 6	Distribuição do tecido adiposo em camundongos.....	26
Figura 7	Localização do tecido adiposo mesentérico, inguinal, retroperitoneal e epididimário em camundongos.....	27
Figura 8	Participação da leptina e outros hormônios na regulação do apetite.....	31
Figura 9	Estágios do processo de adipogênese.....	35
Figura 10	Exposição ao mercúrio e sua influência na adipogênese.....	36
Figura 11	Metabolismo lipídico.....	38
Figura 12	Isoformas da ApoE.....	42
Figura 13	Evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	44
Figura 14	Desenho experimental do estudo.....	51
Figura 15	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias no ganho de peso de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	60
Figura 16	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no percentual de ganho de peso semanal de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	61
Figura 17	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no de peso do tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	62
Figura 18	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no de peso do fígado de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	63
Figura 19	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de MeHg no pelo de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	64
Figura 20	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração plasmática de triglicérides de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	65
Figura 21	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 30 dias na concentração plasmática de colesterol de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	66

Figura 22	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de hidroperóxidos no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	68
Figura 23	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de SOD no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	69
Figura 24	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de TBARs no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	70
Figura 25	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de ALT no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	71
Figura 26	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de AST no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	72
Figura 27	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de Leptina no plasma de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	73
Figura 28	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.....	74
Figura 29	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica do fator nuclear kappa B (NFkB) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.....	74
Figura 30	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica de hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.....	75
Figura 31	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica da apolipoproteína A1 (ApoA1) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.....	75
Figura 32	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.....	76
Figura 33	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.....	76
Figura 34	Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no diâmetro de adipócitos do tecido adiposo branco de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	78

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Principais fontes de emissão de mercúrio.....	19
Tabela 2	Mediadores secretados por adipócitos.	29
Tabela 3	Grupos experimentais para avaliar o impacto da intoxicação mercurial em animais ApoE ko e controles selvagens.....	49
Tabela 4	Efeitos da intoxicação por mercúrio (20 mg/L na água de beber) em escores histopatológicos no fígado de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.....	67
Tabela 5	Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias em camundongos C57BL6J selvagens e Apoe ko.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1
AC	Adenilil cilase
ACC1	Acetil-CoA carboxilase 1
Acetil-CoA	Aceti-coenzima A
AdipoR	Receptor de adiponectina
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácido graxo livre
AGRP	Proteína relaciona à Agouti
AGS	Ácido graxo sintase
ALT	alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
aP2	Proteína de ligação de ácidos graxos
APM	Alto peso molecular
Apo	Apolipoproteínas
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoB100	Apolipoproteína ApoB100
ApoB48	Apolipoproteína B48
ApoC-II	Apolipoproteína C-II
ApoE	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
ATGL	Lipase de triglicerídeos de adipócitos
ATP	Trifosfato de adenosina
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
BPM	Baixo peso molecular
BSA	Albumina do soro bovino
cAMP	AMP cíclico
CART	Fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente
Cd	Cádmio
CEBP α	Proteína alfa CCAAT/enhancer-binding
CHC	Carcinoma hepatocelular
Cols	Colaboradores
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DLP	Dislipidemia
DMA	Direct Mercury Analyzer
DNL	Lipogênese de novo
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPI	Equipamento de proteção Individual
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FABP4	Proteína de ligação de ácidos graxos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fe ⁻²	Ferro ferroso
Fe ⁻³	Ferro férrico
g	Gramas

GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H&E	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hg	Mercúrio
Hg ⁰	Mercúrio elementar
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
HMGCR	Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
HSPGs	Proteoglicanas de heparan sulfato
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
kDa	Quilodalton
ko	Nocaut
L	Litro
LCAT	Lecitina colesterol acil transferase
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de LDL
LEPR	Receptor de leptina
LPL	Lipoproteína lipase
LSH	Lipase sensível a hormônios
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MDA	malondialdeído
MeHg	Metilmercúrio
mg	Miligramas
MGL	Monoacilglicerol lipase
miRNA	Micro-RNA (ácido ribonucleico)
MPM	Moderado peso molecular
MTT	Brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NFκB	Fator nuclear kappa B
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
nm	Nanômetro
NPY	Neuropeptídeo Y
NuBEx	Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização mundial da saúde
PAI-1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação da cadeia da polimerase
pg	Picogramas
PKA	Proteína quinase A
PLIN1	Perilipina 1
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPARγ	Proliferadores do peroxissoma gama
QM	Quilomícrons
RI	Resistência à insulina
rpm	Rotações por minuto
RQM	Remanescentes de quilomícrons

RT-PCR	Real time - Reação da cadeia da polimerase
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SR-B1	Receptor scavenger classe B tipo 1
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABv	Tecido adiposo branco visceral
TAM	Tecido adiposo marrom
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRC	Transporte reverso de colesterol
TRG	Triglicérides
U	unidade
UCP1	Proteína desacopladora-1
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WT	Wild type
μg	Microgramas
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Contaminação do meio ambiente por mercúrio.....	16
1.2	Impacto da exposição ao mercúrio na saúde humana.....	21
1.3	Tecido adiposo.....	23
1.4	Mediadores endócrinos do tecido adiposo.....	28
1.4.1	Leptina.....	28
1.4.2	Adiponectina.....	32
1.5	Adipogênese.....	33
1.6	Tecido adiposo e exposição a metais pesados.....	36
1.7	Metabolismo das lipoproteínas.....	37
1.8	Apolipoproteína E.....	39
1.9	Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	43
2	JUSTIFICATIVA.....	46
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	Objetivo geral.....	47
3.2	Objetivos específicos.....	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	Experimentação animal.....	49
4.2	Intoxicação com mercúrio.....	50
4.3	Dosagem da concentração de mercúrio nos pelos.....	52
4.4	Avaliação do perfil lipídico.....	52
4.5	Esteatose hepática.....	53
4.6	Avaliação de estresse oxidativo no tecido hepático.....	53
4.6.1	Hidroperóxidos totais.....	53
4.6.2	Atividade de superóxido dismutase (SOD)	53
4.6.3	Avaliação da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	54
4.7	Enzimas hepáticas.....	54
4.7.1	Atividade de aspartato aminotransferase (AST)	54
4.7.2	Atividade de alanina aminotransferase (ALT)	55

4.8	Análise de leptina por ensaio imunoenzimático ELISA.....	54
4.9	Análise da expressão gênica.....	56
4.10	Morfometria do tecido adiposo.....	56
4.11	Equipamentos e Materiais.....	57
4.11.1	Reagentes e soluções.....	58
4.12	Análise estatística.....	59
4.13	Ética.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1	Peso dos animais.....	60
5.2	Peso do tecido adiposo epididimário e do fígado.....	61
5.3	Depósito de mercúrio no pelo.....	63
5.4	Lipídios sanguíneos.....	64
5.5	Esteatose hepática.....	66
5.6	Estresse oxidativo no tecido hepático.....	67
5.7	Enzimas hepáticas.....	70
5.9	Níveis de Leptina plasmática.....	72
5.10	Expressão gênica.....	73
5.11	Morfometria.....	77
6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSÃO.....	90
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9	ANEXOS.....	107

1. INTRODUÇÃO

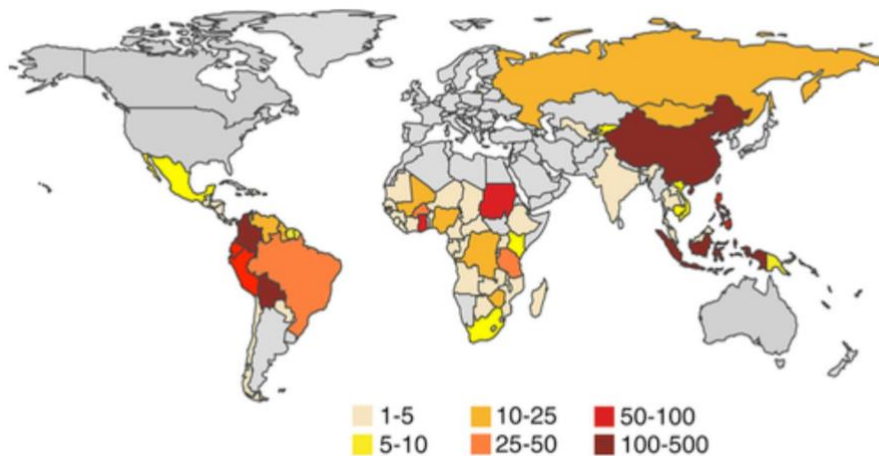
1.1 Contaminação do meio ambiente por mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal pesado e o terceiro elemento mais tóxico do planeta, de acordo com a Agência Governamental Americana para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (RICE et al., 2014). O mercúrio pode ser encontrado em três formas diferentes no meio ambiente: mercúrio elementar ou metálico (Hg⁰); mercúrio inorgânico (cloreto de mercúrio, HgCl₂); e mercúrio orgânico (metilmercúrio, MeHg) (BERNHOF, 2012). E de acordo com Crespo-López e cols. (2021), esse metal não tem função biológica conhecida, mas é essencial para a nossa sociedade devido aos seus diversos usos na indústria e tecnologia.

Os compostos de mercúrio no meio ambiente são poluentes bioacumulativos e tóxicos, e podem atingir os ecossistemas através de fenômenos naturais, como atividade vulcânica, erosão, volatilização do mercúrio presente no ambiente marinho, incêndios florestais e queima de biomassa ou devido a atividades antrópicas, incluindo a queima de combustíveis fósseis, indústrias do cloro, mineração e uso de carvão ou petróleo, o que pode resultar em exposição das populações ao Hg (AZEVEDO et al., 2012; LUO et al., 2020).

A maior fonte de contaminação por mercúrio nos dias atuais é a atividade mineradora artesanal, que utiliza o Hg para separar o ouro de outros materiais durante a mineração (HUDELSON et al., 2020) (Figura 1). Comunidades adjacentes aos locais de mineração de ouro apresentam elevada ingestão de mercúrio, atingindo várias vezes o nível de referência da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO) (1,6µg de MeHg/kg) (JECFA, 2004; SHEEHAN et al., 2014). A atividade de mineração leva ao acúmulo de mercúrio no leito dos rios, nos quais, o Hg sofre metilação por bactérias presentes em algas, formando o metilmercúrio (MeHg) (RAPOSO et al., 2020), uma forma excessivamente tóxica (HUDELSON et al., 2020) (Figura 2).

Figura 1: Uso médio de mercúrio em mineração de ouro artesanal e em pequena escala por anos (toneladas).

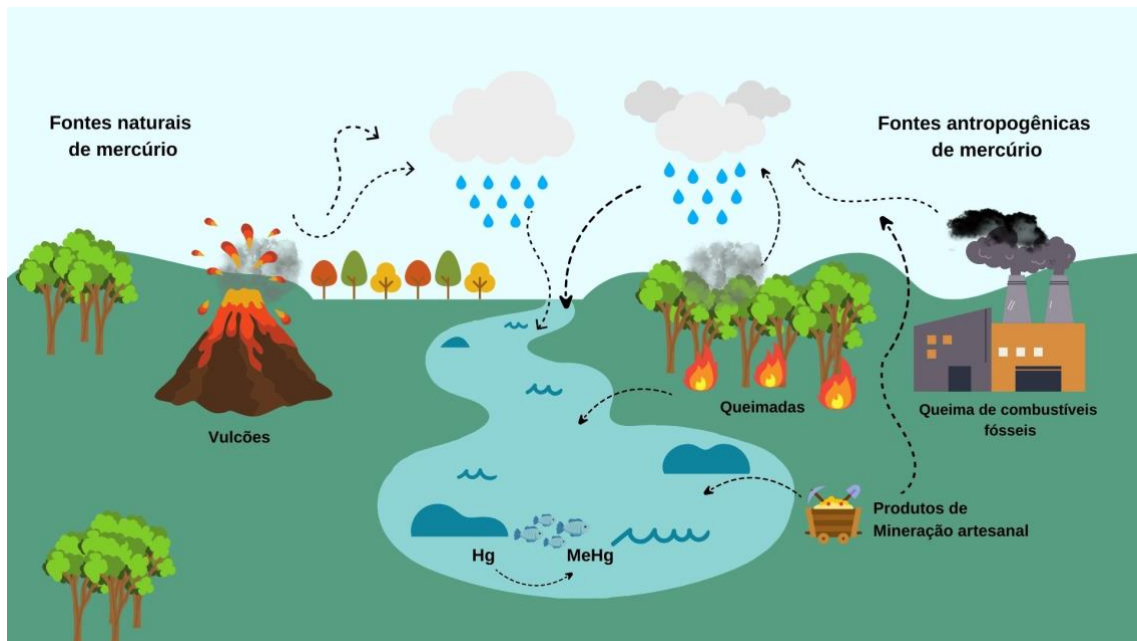


Fonte: Adaptado de LI; MA; ZHANG, 2020.

Formas orgânicas de mercúrio, como o MeHg, são particularmente tóxicas para os seres humanos, pois suas características toxicocinéticas possibilitam sua passagem pelas barreiras celulares. O MeHg consumido é rapidamente absorvido pelo organismo, amplamente distribuído para todos os tecidos e lentamente excretado (CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; 2009). Uma vez consumido, o MeHg atravessa barreiras celulares, incluindo as barreiras hematoencefálica e placentária, com fácil acesso ao sistema nervoso central (SNC) e ao feto, respectivamente (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009).

No *ranking* das emissões de mercúrio, a mineração artesanal vem seguida da queima de combustíveis fósseis, produção de metais não ferrosos, produção de cimento, lixo industrial, monômeros de cloreto de vinil, queima de biomassa, produção de metais ferrosos, produção de cloro-álcalis, queima de lixo, refinamento e combustão de óleo e gás e cremação (UNEP, 2019) (Tabela 1).

Figura 2: Ciclo do Mercúrio.



Fonte: própria.

As emissões de mercúrio podem resultar de fontes naturais, como incêndios florestais e vulcões, ou de fontes antropogênicas, como a queima de combustíveis fósseis, atividade mineradora artesanal e outras. Na forma de vapor, o MeHg alcança a circulação atmosférica sendo transportado e distribuído até se combinar com vapores de água e se precipitar sobre a terra. Assim, Hg pode infiltrar os solos e se acumular. Quando atinge o leito dos rios, o Hg sofre metilação por bactérias presentes em algas, formando o MeHg, forma excessivamente tóxica (HUDELSON et al., 2020).

Embora as emissões de mercúrio tenham reduzido recentemente em algumas regiões do planeta, mundialmente permanecem 450% maiores do que os níveis pré-industriais e consistem em ameaça constante à saúde humana (UNEP, 2019) (Figura 3). O impacto ambiental é enorme, uma vez que o mercúrio apresenta longa vida atmosférica (0,5 a 2 anos) e transporte de longas distâncias devido à sua elevada volatilidade, baixa atividade química e baixa solubilidade (ROOS-BARRACOUGH et al., 2002). O mercúrio conduzido a longas distâncias pode contaminar a natureza depositando-se em turfeiras, lagos, geleiras, marismas e sedimentos pelágicos (SCHUSTER et al., 2002; TANG et al., 2012; DONOVAN et al., 2013; GUÉDRON et al., 2018; KIM et al., 2019).

Desastres ambientais naturais e antropogênicos podem aumentar drasticamente a exposição das populações humanas à intoxicação por mercúrio (RAPOSO et al., 2020), representando um alto risco para a saúde e tornando-se uma preocupação global (GIANG; SELIN, 2016; WANG et al., 2018). Muitos acidentes

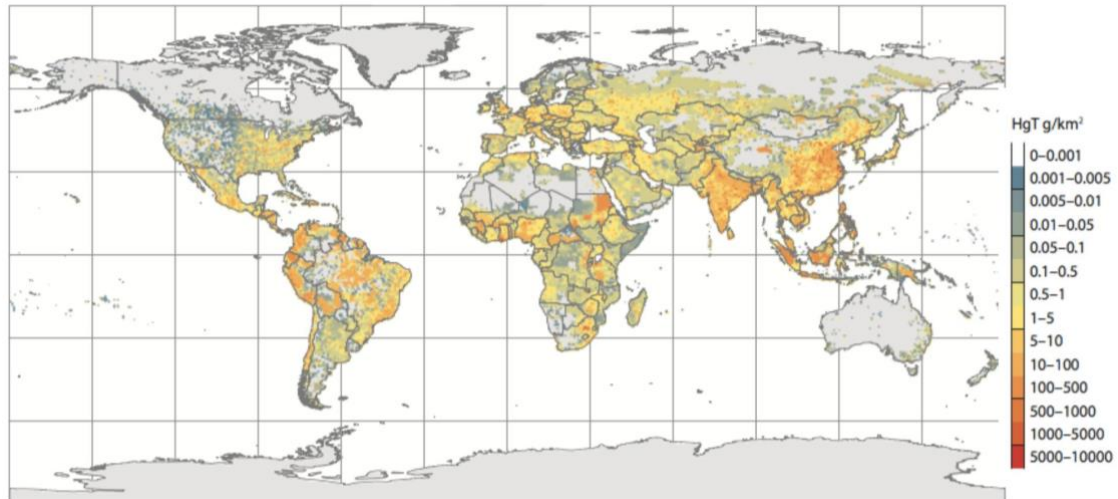
ocorridos no mundo já foram registrados, tanto pela utilização do mercúrio como pelo consumo de peixes e outros alimentos contaminados. Desastres de intensa magnitude ocorreram na baía de Minamata e Niigata, no Japão, no nordeste do Iraque, Suécia, Guatemala e em Alamogordo, no Novo México (ROLDÃO, 2007).

Tabela 1: Principais fontes de emissão de mercúrio.

Fonte	Quantidade (Kg)
Mineração artesanal e de pequena escala	837,6
Combustão estacionária de carvão	473,7
Produção de metais não ferrosos	326,6
Produção de cimento	233,1
Resíduos de produtos	146,9
Monômero de cloro de vinil	58,2
Queima de biomassa	51,8
Produção de metais ferrosos	39,9
Produção de cloro-álcalis	15,1
Incineração de resíduos	14,9
Refino de petróleo	14,3
Combustão de petróleo e gás	7,1
Cremação	3,7

Fonte: UNEP, 2019.

Figura 3. Distribuição geoespacial de emissões de Hg para o ar de fontes antropogênicas.



Fonte: Adaptado de UNEP, 2019.

No Brasil, dois importantes desastres ambientais ocasionaram o rompimento de grandes barragens de mineração, causando o deslocamento dos resíduos para as populações ribeirinhas das cidades de Mariana e Brumadinho, em Minas Gerais (ALMEIDA et al., 2019; DAVILA et al., 2020). Ambos levaram à exposição de uma imensa extensão de território, incluindo sua fauna e flora, aos rejeitos de mineração, apresentando elevados riscos biológicos como a presença exponencial de mercúrio (HATJE et al., 2017; FREITAS et al., 2019).

A população geral está exposta principalmente ao MeHg, por meio do consumo de peixes e mariscos, e o nível de Hg em peixes tem aumentado constantemente (DREVNICK; LAMBORG; HORGAN, 2015). Populações que têm como base da alimentação pescados de áreas contaminadas podem sofrer consequências, como relatado no estudo de Costa Júnior et al. (2018) em comunidades ribeirinhas da Amazônia, no Brasil. Esse estudo demonstrou níveis elevados de mercúrio total no cabelo ($10,8\mu\text{g/g}$) de indivíduos com alto consumo de pescado na região de Tapajós, valor acima do recomendado pela Organização Mundial da Saúde ($6,0\mu\text{g/g}$).

Na Amazônia brasileira, a mineração ilegal de ouro ameaça florestas, povos indígenas e a conservação da biodiversidade em áreas protegidas. A maioria das

áreas de mineração artesanal ou de pequena escala e especialmente as áreas de mineração ilegal são abandonadas após o esgotamento das reservas, sem a devida reabilitação, aumentando o risco de contaminação por mercúrio das comunidades adjacentes (SIQUEIRA-GAY; SÁNCHEZ, 2021).

O consumo excessivo de peixes com altos níveis de mercúrio orgânico, pode causar intoxicação por metilmercúrio e uma variedade de sintomas anormais relacionados ao sistema nervoso central, como parestesia, ataxia, deficiência auditiva e constrição progressiva dos campos visuais (NAKAMURA et al., 2014; YE et al., 2016; PARK et al., 2017).

1.2 Impacto da exposição ao mercúrio na saúde humana

A toxicidade do mercúrio ao homem depende da forma, bem como da via e cronicidade da exposição (JOHNSON-ARBOR; TEFERA; FARRELL, 2021). Os sinais e sintomas da intoxicação por mercúrio elementar são diferentes dos efeitos clínicos de outras formas de intoxicação. A toxicidade do mercúrio inorgânico resulta em sintomas gastrointestinais e neurológicos, enquanto a exposição ao dimetilmercúrio orgânico está associada a danos cerebelares tardios, muitas vezes fatais (NIERENBERG et al., 1998; CHAN, 2011).

A OMS indica que o máximo de ingestão semanal aceitável de 1,6 µg de MeHg por quilograma de peso corporal (JECFA, 2004). Entretanto, muitas populações susceptíveis em todo o mundo consomem com frequência quantidades superiores a esse limite (CRESPO-LÓPEZ, 2021). A dose ingerida de mercúrio, bem como o tempo e a frequência de exposição, além da via de exposição e faixa etária do indivíduo (ou estágio de desenvolvimento), são fatores que determinam o grau dos danos ocasionados pelo mercúrio e quais sistemas orgânicos são mais afetados (DÍEZ-GIL et al., 2008).

A OMS (1976) estabeleceu que efeitos neurológicos da exposição ao MeHg podem ser encontrados em 5% dos adultos que ingerem por dia de 3 a 7µg de MeHg por quilograma de peso corporal. Esta dose de ingestão diária corresponde a níveis de 200 µg/L no sangue ou 50 µg/g no cabelo. Esses índices são constantemente

revisados e atualizados como resultado de novas tecnologias e pesquisas atuais realizadas em diferentes partes do mundo (OLIVEIRA et al., 2021).

A cidade de Minamata no Japão é conhecida internacionalmente pela “doença de Minamata”, um distúrbio neurológico ocasionado pela ingestão de MeHg contido em alimentos. O desastre de Minamata, ocorrido na década de 1950, foi uma catástrofe ecológica na qual um envenenamento em massa foi causado por descarte de produtos químicos industriais na região. A via de exposição ao MeHg foi através do consumo de peixes e mariscos contaminados, as principais fontes alimentares da população local. Os sintomas da doença incluem movimentos descontrolados dos membros, funções motoras e fala prejudicadas, dificuldades visuais e auditivas (SAKAMOTO, 2018; JAMES et al., 2020). Em 2013, 92 países firmaram a Convenção de Minamata sobre o mercúrio, um acordo que unifica esforços internacionais para diminuir a contaminação do meio ambiente com o metal e prevenir e tratar casos de intoxicação (CRESPO-LÓPEZ, 2021).

Após o desastre de Minamata, a comunidade científica internacional concordou que o principal alvo do MeHg é o sistema nervoso central e já está bem estabelecido na literatura que a exposição crônica de populações ao MeHg pode levar ao aparecimento precoce de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer, bem como a esclerose múltipla (CAROCCI et al., 2014; CARICCIO et al., 2019).

A intoxicação por metais pesados não atinge apenas o SNC, acredita-se que esses metais de maneira geral, contribuam para o desenvolvimento da obesidade e suas consequências (WANG et al. 2018). Estudos nas últimas décadas mostraram que a exposição a poluentes ambientais, dentre eles o mercúrio, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de doenças metabólicas devido ao seu papel como disruptores endócrinos (TRASANDE et al., 2018). Sabe-se que exposição a metais como mercúrio ou chumbo pode aumentar o acúmulo de lipídios nos adipócitos 3T3-L1 através da indução de C/EBP β e apoia associações encontradas entre exposição e obesidade em estudos epidemiológicos (TINKOV et al. 2021).

O tecido adiposo parece ser alvo para a toxicidade de metais pesados, contudo, os efeitos desses compostos sobre a gordura não foram completamente explorados (EGGER et al. 2019; FREIRE et al. 2020). Como parte das consequências

metabólicas da poluição podem ser atribuídas aos metais pesados, é possível que tais substâncias possam exercer ações diretas sobre o tecido adiposo (FRANCIS et al., 2021).

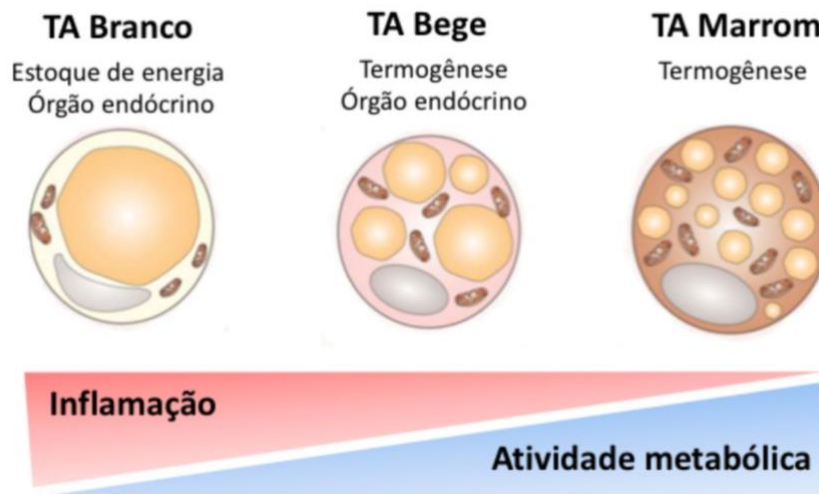
1.3 Tecido adiposo

Há dois tipos principais de tecido adiposo (Figura 4), o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB), com funções e morfologias diferentes (FRONTINI; CINTI, 2010; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). Ambos os tipos podem ser divididos em vários depósitos dependendo de onde estão localizados no corpo: subcutâneo, visceral, periaórtico, entre outros, que apresentam composição celular, capacidade secretora, vascularização e inervação distintas (VAZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008).

O TAM contém gotículas lipídicas multiloculares e alto número de mitocôndrias, e apresenta função principal de dissipação de energia armazenada na forma de calor. Anteriormente sabia-se que em humanos, o TAM estava restrito a um depósito interescapular em bebês e adultos cronicamente expostos ao frio extremo, porém, evidências posteriores sugeriram que adipócitos marrons podem ser mais comuns em adultos do que se entendia antes (WANG; SEALE, 2016).

O TAM gasta energia através da termogênese sem tremores, um processo que envolve dispersão do calor gerado através do desacoplamento da respiração mitocondrial mediada pela proteína desacopladora-1 (UCP1) (AQUILA; LINK; KLINGENBERG, 1985). As UCPs estão localizadas na membrana mitocondrial interna e desacoplam a oxidação dos substratos na mitocôndria da síntese de ATP, dissipando a energia do potencial de membrana e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial. Este desacoplamento está associado a funções como regulação do gasto energético e do metabolismo de ácidos graxos livres e diminuição da secreção de insulina e da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHOUCHANI et al., 2019).

Figura 4: Tipos de tecido adiposo.



Fonte: Adaptado de CORRÊA; HEYN; MAGALHÃES, 2019.

Há dois principais tipos de tecido adiposo, o primeiro deles é o tecido adiposo branco, que está envolvido na regulação do estoque de energia do organismo, apresenta poucas mitocôndrias, é considerado um órgão endócrino e pode apresentar elevado grau de inflamação. O segundo principal tipo é o tecido adiposo marrom, que apresenta relação com a termogênese, muitas mitocôndrias, baixo grau de inflamação e importante atividade metabólica. Entre os dois, há o tecido adiposo bege, com características similares ao branco e ao marrom, mas que apresenta uma assinatura molecular própria.

As células de gordura marrom geralmente crescem até 15 a 50 μm , enquanto as células de gordura branca têm uma maior capacidade de armazenamento de lipídios e podem se expandir para quase 100 μm de diâmetro (CINTI, 2012). Morfologicamente, os adipócitos brancos têm gotículas lipídicas uniloculares, menos mitocôndrias e nenhuma expressão de UCP1. Por outro lado, adipócitos bege geralmente aparecem nos depósitos de TAB em resposta a estímulos externos, como exposição ao frio, exercício ou estimulação adrenérgica. Embora semelhantes aos adipócitos brancos, eles apresentam baixa expressão de UCP1, com estímulos externos podem ser ativados para aumentar tanto a expressão de UCP1 quanto a taxa de respiração. Além disso, eles apresentam identidade molecular distinta dos adipócitos brancos ou marrons (WU et al., 2012).

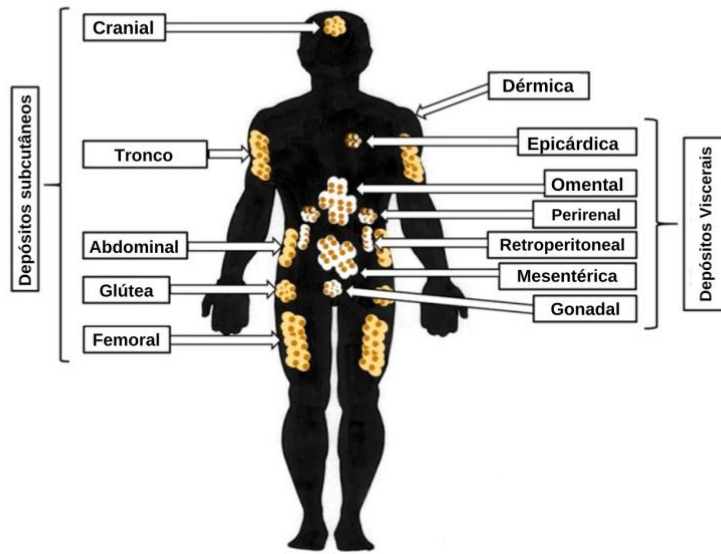
A maioria do tecido adiposo em mamíferos, incluindo humanos adultos, é composta de TAB, formado principalmente por adipócitos que abrigam uma única gota lipídica, apresentando um grande vacúolo de gordura (90% do volume celular), onde

os ácidos graxos (AG) são armazenados principalmente como triglicérides (TRG), que podem ser mobilizados e distribuídos para diferentes tecidos quando necessário (CINTI, 2005; ZWICK et al., 2018). O TAB desempenha um papel essencial na regulação do armazenamento e gasto de energia, mantendo a homeostase e controlando a resposta imune, pressão arterial e função reprodutiva (TRAYHURN, 2005).

O TAB é distribuído por todo o corpo em depósitos subcutâneos (TABs) e viscerais (TABv). O tecido adiposo branco subcutâneo está localizado em vários locais sob a pele e, em humanos, existem aglomerados de TABs nas regiões superior (abdome profundo e superficial) e inferior (glúteofemoral) do corpo (KWOK; LAM; XU, 2016). O tecido adiposo branco visceral (TABv) em humanos inclui TAB omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal, perirenal e epicárdio (WAJCHENBERG, 2000) (Figura 5).

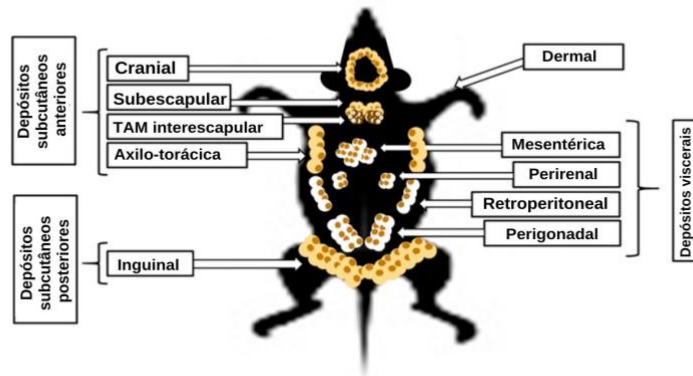
A maioria dos estudos em camundongos utiliza o tecido adiposo inguinal e epididimário como referências para os tecidos adiposos abdominal subcutâneo e visceral, respectivamente. O tecido adiposo inguinal tem correlação anatômica com o tecido subcutâneo gluteofemoral em humanos, enquanto o tecido adiposo epididimário é um tecido intraperitoneal, análogo ao tecido adiposo gonadal em humanos e que está presente mesmo em camundongos magros, por estes motivos é utilizado como representativo de tecido visceral (CHUSYD et al. 2016) (Figuras 6 e 7).

Figura 5: Distribuição do tecido adiposo em humanos.



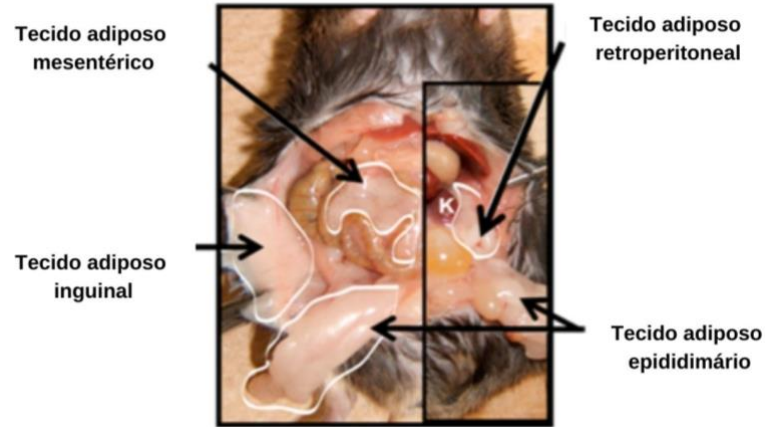
Fonte: Adaptado de RICHARD et al., 2020.

Figura 6: Distribuição do tecido adiposo em camundongos.



Fonte: Adaptado de RICHARD et al., 2020.

Figura 7: Localização do tecido adiposo mesentérico, inguinal, retroperitoneal e epididimário em camundongos.



Fonte: Adaptado de BERRYMAN; LIST, 2017.

O tecido adiposo permaneceu pouco estudado por décadas devido ao equívoco de que era simplesmente um depósito de armazenamento de energia na forma de triglicérides, mas descobertas posteriores do papel mais amplo do TA na sinalização celular e de todo o corpo criaram um renascimento científico neste campo (RICHARD et al., 2020). A partir da década de 1980, descobriu-se que o tecido adiposo atua como um importante órgão endócrino e participa da homeostase metabólica (CINTI, 2018).

O conceito de que o TA poderia funcionar como um órgão endócrino só foi confirmado após o achado de que as células adiposas são fontes importantes de uma diversidade de produtos proteicos, incluindo hormônios endócrinos. A descoberta de seus dois produtos de secreção mais característicos, leptina e adiponectina (FUNCKE; SCHERER, 2019), adipocinas que podem atuar de forma autócrina, parácrina ou endócrina, estabelecendo uma complexa comunicação entre o tecido adiposo e outros órgãos, consolidou a ideia (VAZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008).

1.4 Mediadores endócrinos do tecido adiposo

O papel do tecido adiposo é reconhecido não apenas pelo seu papel como reservatório lipídico, mas também pela modulação da adipogênese, secreção de adipocinas, envolvimento na regulação central do apetite e saciedade, bem como a capacidade de regular a termogênese via formação de adipócitos bege (ZHU et al., 2019). As células adiposas secretam diversos mediadores (Tabela 2), incluindo exossomos, miRNA, lipídios, citocinas inflamatórias e hormônios peptídicos que atuam de modo autócrino, parácrino e endócrino, ações essas altamente complexas (FASSHAUER; BLÜHER, 2015).

Três dos hormônios peptídicos produzidos pelo TA (leptina, adiponectina e resistina) são quase exclusivamente produzidas nos adipócitos e atuam regulando a ingestão de alimentos, o eixo reprodutivo, a sensibilidade à insulina e as respostas imunes. Vale ressaltar que os padrões associados à secreção de adipocinas podem variar dependendo do estado do tecido adiposo (LIU et al., 2022). Assim, a disfunção dos adipócitos pode resultar em perturbações na secreção de suas adipocinas (LONGO et al., 2019), com conseqüente prejuízo metabólico sistêmico, bem como envolvimento na patogênese de doenças metabólicas crônicas e alguns tipos de câncer (RICHARD et al., 2020).

1.4.1 Leptina

Leptina é um hormônio peptídico de 16 kDa que compreende 167 aminoácidos e apresenta uma estrutura terciária globular, semelhante aos membros da família de citocinas de cadeia longa (ZHANG et al, 1994; MUNZBERG; MORRISON, 2015). A leptina é um hormônio genuinamente derivado de adipócitos que atua não apenas como um sinal aferente regulando a massa de gordura corporal e a ingestão de alimentos junto aos centros cerebrais centrais na regulação do peso corporal (ZHANG et al., 1994), mas também possui ações periféricas que incluem reprodução, homeostase da glicose, hematopoiese e função imunológica (PARK; AHIMA, 2015; RAMOS-LOBO; DONATO, 2017).

Tabela 2: Mediadores secretados por adipócitos.

Adipocinas/mediadores	Relevância
Leptina	Marcador de massa gorda corporal. Usada no tratamento da lipodistrofia e da deficiência genética de leptina
Adiponectina	Marcador de sensibilidade à insulina e função do TA
Resistina	Correlação com inflamação sistêmica e RI
Visfatina	Estímulo à célula beta-pancreática
Apelina	Melhora do metabolismo da glicose
Omentina	Marcador de massa gorda visceral Promove a função endotelial
Vaspina	Melhora no metabolismo da glicose Redução da ingestão alimentar
Proteína 4 de ligação ao retinol (RBP4)	Marcador de sensibilidade à insulina e distribuição de gordura visceral
Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)	Formação de osso e cartilagem e outras funções
Inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)	Inibidor do ativador tecidual do plasminogênio
MicroRNA (miRNA)	Silenciador pós-transcricional. Pareia-se com mRNAs específicos e regula sua estabilidade e tradução
Ácido graxo livre (AGL)	Produto da quebra de triglicerídeos
Ácido palmítico e outros lipídios	Lipídios
Fator de crescimento de fibroblastos	Estimula a proliferação celular, a produção de colágeno e de outros elementos da matriz celular

Fontes: BLÜHER, 2012; RICHARD et al., 2020.

O principal local de produção da leptina é o tecido adiposo, embora outros tecidos, incluindo células endócrinas do sistema gastrointestinal, músculo e cérebro também tenham demonstrado expressar esse hormônio (CINTI et al., 2000; JIN et al., 2000). Leptina é predominantemente secretada da gordura visceral em roedores (TRAYHURN et al, 1995) e da gordura subcutânea em humanos (HUBE et al., 1996). A produção mais proeminente de leptina ocorre no tecido adiposo branco em relação ao marrom e suas concentrações séricas se correlacionam com a massa corporal de tecido adiposo, indicando ser um bom biomarcador para o conteúdo de gordura corporal (ZHANG et al., 2017).

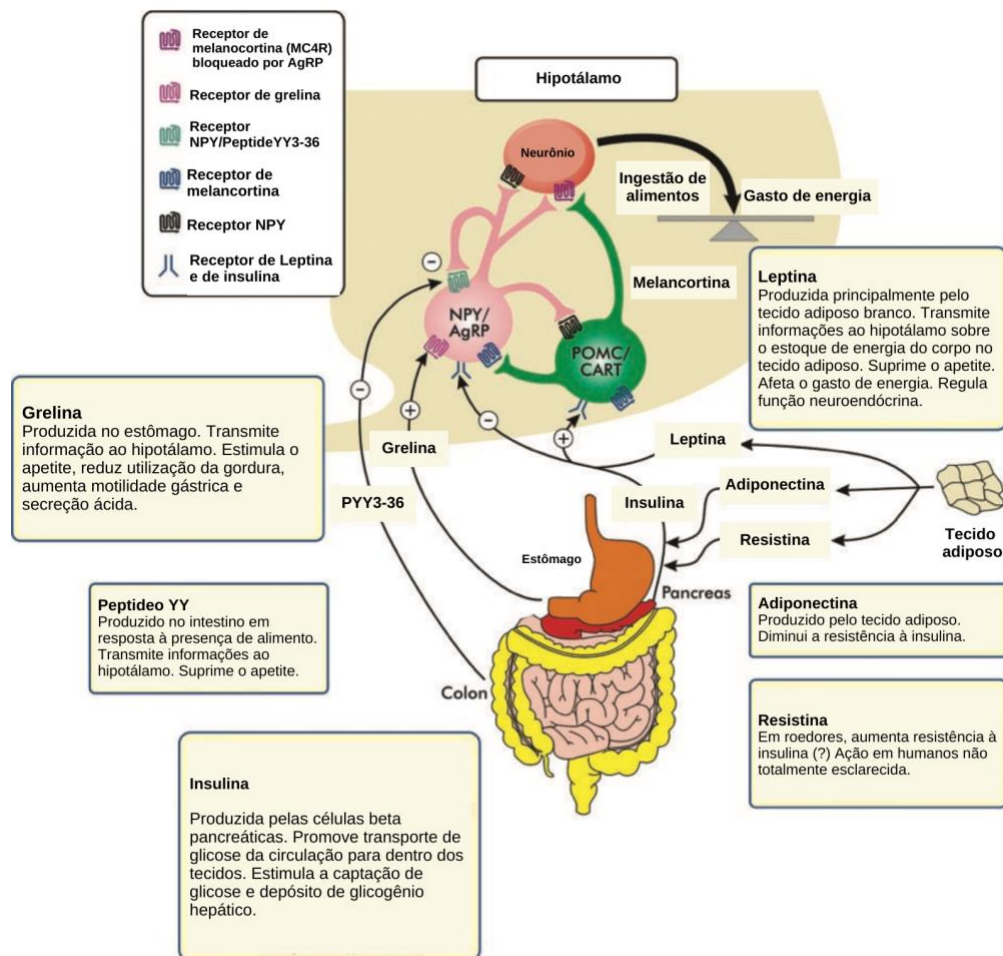
É o gene *ob* que codifica a leptina e a expressão desse gene varia de acordo com o local de armazenamento do TAB. Em seres humanos, a expressão do gene *ob* parece ser mais pronunciada no tecido subcutâneo do que no visceral. Em roedores, a expressão da leptina pode ser menor no tecido subcutâneo do que nos depósitos de gordura mais internos, e os níveis mais elevados são encontrados na gordura epididimal e perirenal (HUBE et al, 1996).

A leptina atua por meio de seu receptor específico, que apresenta ampla distribuição no sistema nervoso central e órgãos periféricos. O receptor específico de leptina é codificado pelo gene LEPR (ou OBR) e pertence à família de citocinas classe 1 (TARTAGLIA, 1997). Seis isoformas do receptor foram identificadas, que apresentam um domínio comum de ligação à leptina, mas diferem no comprimento do domínio intracelular C-terminal (WADA, 2014). As razões pelas quais formas distintas de receptores de leptina são produzidas e suas respectivas funções ainda não estão claras.

Um conjunto complexo de sinais endócrinos, neuroendócrinos e parácrinos comanda a produção e secreção de leptina (FRIED et al., 2000). A leptina produzida pelo tecido adiposo atua como um sinal aferente em uma alça de retroalimentação negativa no controle homeostático da adiposidade (FRIEDMAN, 2019), influenciando os centros neuronais de apetite e saciedade (TINKOV, 2021). Ressalta-se que a forma de sinalização do receptor de leptina é expressa principalmente no cérebro, e a maioria dos efeitos da leptina nos órgãos-alvo são indiretos através do SNC (FRIEDMAN, 2019). Assim, a principal função da leptina é fornecer sinalização ao SNC sobre o estado energético de longo prazo do corpo (SCHWARTZ et al. 2000).

O hipotálamo é o principal local de interação entre diversos fatores de origem central e periférica para a regulação da homeostase energética. Essa regulação envolve uma série de peptídeos orexígenos e anorexígenos, responsáveis pela sinalização do apetite (SCHWATZ et al, 2000). A leptina regula a ingestão energética e o peso corpóreo em grande parte estimulando neurônios que expressam o neuropeptídeo anorexígeno pró-opiomelanocortina (POMC) e o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART) e inibindo neurônios que expressam o neuropeptídeo Y e a proteína relacionada à Agouti (NPY/AGRP) no núcleo arqueado do hipotálamo (FRIEDMAN; HALAAS, 1998) (Figura 8).

Figura 8: Participação da leptina e outros hormônios na regulação do apetite.



Fonte: Adaptado de GALE et al., 2004.

Os níveis circulantes de leptina respondem ao estado nutricional ou aos padrões de alimentação, aumentando após a alimentação, quando os níveis de insulina são aumentados e diminuindo em condições de jejum ou perda de peso (LEE et al., 2007; ELIMAM; MARCUS, 2002). A leptina funciona como um sinal de adiposidade, com uma função crítica na manutenção da massa de tecido adiposo para garantir a sobrevivência em condições de balanço energético negativo, protegendo assim os indivíduos dos riscos associados de ter tanto um déficit quanto excesso de adiposidade (FRIEDMAN, 2019).

1.4.2 Adiponectina

A adiponectina é uma proteína de 224 aminoácidos, secretada pelo tecido adiposo e apresenta efeitos protetores contra a inflamação, podendo modular positivamente a liberação de outros hormônios, aumentando a sensibilidade à insulina (KIM et al., 2010; ZHAO et al., 2014). Do ponto de vista molecular, a adiponectina pode ser encontrada em três isoformas, com atividades distintas: uma forma com baixo peso molecular (BPM), com moderado peso molecular (MPM) e outra de alto peso molecular (APM) (TORRE-VILLALVAZO et al., 2018).

A adiponectina se liga a 3 receptores, AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina. AdipoR1 e AdipoR2 são proteínas de superfície com sete domínios transmembrana (TORRE-VILLALVAZO et al., 2018). AdipoR1 é amplamente expresso no músculo esquelético, fibroblastos sinoviais, células endoteliais e atriais, e AdipoR2 é mais restrito ao fígado (WANG et al., 2017; YANG et al., 2018). AdipoR1 é descrito relacionado principalmente à ativação de vias AMPK que regulam a inibição da gliconeogênese e aumento da oxidação dos ácidos graxos, enquanto o AdipoR2 está mais envolvido na ativação das vias PPAR, que estimulam a dissipação de energia através do aumento da oxidação de ácidos graxos, inibem o estresse oxidativo e inflamação (CAPEAU, 2007).

T-caderina é uma molécula de adesão celular, possui uma âncora GPI com domínio transmembranar e intracelular (KITA; MAEDA; SHIMOMURA, 2019). Apesar de cada vez mais clara a importância da T-caderina, os detalhes moleculares de interações deste receptor com a adiponectina ainda são pouco conhecidos por receber relativamente menos atenção do que as interações propostas com AdipoR1 e AdipoR2 (PASCOLUTTI et al., 2020).

Adiponectina tem ação pleiotrópica, sendo relacionada a uma série de funções no organismo, promove a sensibilidade à insulina, apoptose em células cancerígenas e possui efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (KHORAMIPOUR et al., 2021). Tais ações podem resultar em diferentes efeitos em diferentes órgãos, a adiponectina é capaz de entrar no cérebro através da circulação periférica e controlar funções cerebrais, como homeostase energética, neurogênese hipocampal e plasticidade

sináptica. A adiponectina também controla o peso corporal e inativa as células gliais no cérebro e, portanto, previne inflamação (SUN et al., 2018).

No fígado, a adiponectina contribui para controlar a captação de glicose e o metabolismo das gorduras, reduzindo a neoglicogênese e aumentando a utilização da glicose e a oxidação de ácidos graxos (MANDAL; PRITCHARD; NAGY, 2010). No músculo esquelético, adiponectina promove sensibilidade à insulina (ALEIDI et al., 2015), oxidação de ácidos graxos através da ativação de AMPK, p38-MAPK e PPAR- α , e aumenta a captação de glicose (YAMAUCHI et al., 2002). Os níveis de adiponectina são negativamente correlacionados com câncer, doenças cardiovasculares e diabetes, e demonstraram ser afetados pela nutrição (KHORAMIPOUR et al., 2021).

1.5 Adipogênese

Os adipócitos acumulam lipídios através de dois processos. No primeiro, em condições normais de alimentação, os adipócitos captam as gorduras dietéticas na circulação na forma de ácidos graxos livres (AGL) liberados dos TRG circulantes pela ação da lipoproteína lipase (LPL) (KERSTEN, 2014). A função da LPL é catalisar a hidrólise de AGL a partir de lipoproteínas séricas circulantes ricas em triglicerídeos (FRAYN, 2002), como quilomícrons produzidos no intestino delgado e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) sintetizadas pelo fígado (LUO; LIU, 2016).

O segundo processo pelo qual as células adiposas acumulam gordura é a lipogênese *de novo* (DNL), dentro dos próprios adipócitos, podendo ocorrer tanto no estado de jejum quanto pós-prandial. A lipogênese compreende tanto a síntese de ácidos graxos a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) quanto a esterificação desses ácidos graxos para um esqueleto de glicerol produzindo TRG (LUO; LIU, 2016). No estado alimentado, especialmente após refeição rica em carboidratos, a oxidação de glicose em excesso produz acetil-CoA em níveis aumentados, que se tornam substrato para gerar AG. As enzimas acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1) e ácido graxo sintase (AGS) participam desse processo convertendo acetil-CoA em palmitato, que pode então ser alongado e dessaturado para dar origem a outros AG (SONG; XIAOLI; YANG, 2018).

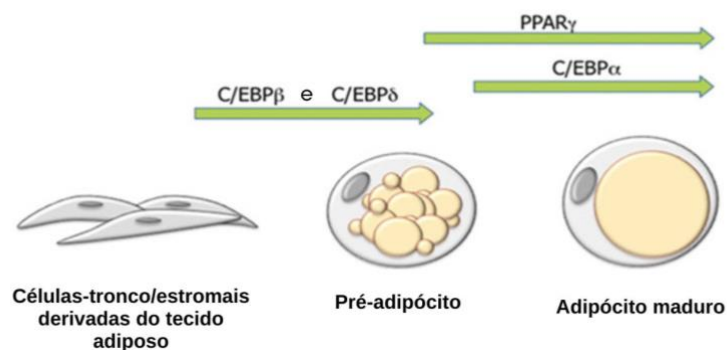
Em condições como jejum, exercício e exposição ao frio, nas quais os combustíveis metabólicos estão reduzidos e/ou a demanda energética está aumentada, os adipócitos mobilizam seus estoques de TRG através do processo de lipólise para fornecer combustível aos tecidos periféricos (BRAUN et al., 2018). O processo catabólico de lipólise gera glicerol e AGLs a partir da clivagem enzimática de TRG pela ação de lipases. Os TRG são decompostos em diacilgliceróis (DAGs) e monoacilgliceróis (MAGs) pela ação sequencial da lipase de triglicerídeos de adipócitos, lipase sensível a hormônios (LSH) e monoacilglicerol lipase (MGL). Em cada etapa, um único AGL é liberado e, na etapa final, o MGL libera o esqueleto de glicerol do último AGL (LUO; LIU, 2016).

A lipólise é regulada por diversos hormônios. Um deles é a noradrenalina, estimulando receptores β -adrenérgicos, que, por sua vez, ativam a proteína quinase A (PKA) através da produção mediada por adenilil ciclase (AC) de AMP cíclico (cAMP). PKA ativa as enzimas lipolíticas, fosforilando diretamente LSH e ativando ATGL indiretamente pela fosforilação de perilipina 1 (PLIN1), uma proteína associada a gotículas lipídicas (STRÅLFORS; BJÖRGELL; BELFRAGE, 1984; GREENBERG et al., 1991; NIELSEN et al., 2014). Estímulos lipolíticos não adrenérgicos incluem glicocorticoides, peptídeos natriuréticos, hormônio do crescimento e TNF α (NIELSEN et al., 2014). Os produtos oriundos da lipólise podem ser reesterificados dentro do adipócito ou liberados na circulação para serem usados por outros tecidos, como pelo fígado para gliconeogênese (glicerol) e pelo músculo para fosforilação oxidativa (KURIYAMA et al., 2002).

De acordo com Choe e cols. (2016), as mudanças na quantidade e tamanho das células adiposas são dependentes do equilíbrio entre enzimas lipogênicas e lipolíticas e dessa forma, a remodelação do tecido adiposo também está associada à modulação da adipogênese (CHOE et al., 2016). A adipogênese é um processo iniciado durante o desenvolvimento e continua ao longo da vida, sendo extremamente controlado e regulado por condições fisiológicas e ambientais (GESTA; TSENG; KAHN., 2007; GONZÁLEZ-CASANOVA et al., 2020). Corresponde à diferenciação dos adipócitos basicamente em duas etapas: na primeira, células-tronco mesenquimais são remodeladas para formar o pré-adipócito, enquanto a segunda etapa consiste na maturação do pré-adipócito em um adipócito funcional (FARMER, 2006; VISHVANATH; Gupta, 2019).

O primeiro estágio no processo de adipogênese abrange diversas substâncias e vias metabólicas, incluindo a via da MAP quinase (MAPK), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), Wnt, e vias Hedgehog, que desempenham funções, como programação de células-tronco, proliferação celular e regulação de estados metabólicos (VISHVANATH; GUPTA, 2019). Enquanto o segundo estágio da adipogênese é guiado por dois fatores de transcrição principais, PPAR γ e CEBP α , que conduzem de forma coordenada o processo de diferenciação e controlam a ativação transcripcional de diversos marcadores para células adiposas maduras, como receptor de insulina, adiponectina e a proteína de ligação de ácidos graxos (FABP4, também conhecida como aP2) (FARMER, 2006) (Figura 9).

Figura 9: Estágios do processo de adipogênese.



Fonte: Adaptado de VILLIERS et al., 2017.

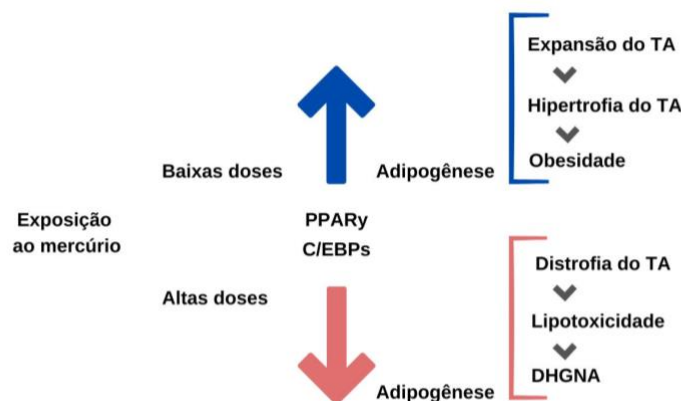
Determinados fatores podem perturbar as inúmeras vias da adipogênese, ocasionando desregulação desse mecanismo. Exemplos desses fatores são os chamados disruptores endócrinos, dentre os quais estão os metais pesados, capazes de modificar o metabolismo lipídico e interferir no processo de adipogênese. Há evidências em modelos com linhagens de células, células mesenquimais humanas e em roedores que apontam que fatores obesogênicos podem ter como alvos moléculas-chave do processo de adipogênese, como C/EBP α e PPAR γ (GONZÁLEZ-CASANOVA et al., 2020).

1.6 Tecido adiposo e exposição a metais pesados

Achados nas últimas décadas demonstraram que a exposição a poluentes ambientais pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de doenças metabólicas devido ao seu papel como disruptores endócrinos (TRASANDE; BLUMBERG, 2018). Disruptores endócrinos podem ser considerados obesogênicos e entre essas substâncias estão os compostos metálicos, fenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, amidas, ésteres, compostos halogenados, poluentes do ar e agentes aromatizantes (EGUSQUIZA; BLUMBERG, 2020).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que os metais pesados afetam a massa e a função do tecido adiposo através da modulação da adipogênese (via C/EBP α e PPAR γ), indicando os efeitos “adipotrópicos” desses metais. É proposto que os efeitos da exposição a metais no tecido adiposo sejam bifásicos, variando desde o aumento da adipogênese na exposição a baixas doses, com regulação dos principais fatores adipogênicos C/EBPs e PPAR γ e promovendo adipogênese excessiva, até a inibição da diferenciação do tecido adiposo em doses mais altas, através da regulação negativa de C/EBPs e PPAR γ , que pode estar associada a efeitos tóxicos dos metais devido à atividade pró-inflamatória e pró-oxidante (Figura 9). A redução da capacidade adipogênica pode resultar em lipotoxicidade, inclusive na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (TINKOV et al., 2021).

Figura 10: Exposição ao mercúrio e sua influência na adipogênese.



Fonte: Adaptado de TINKOV et al., 2021.

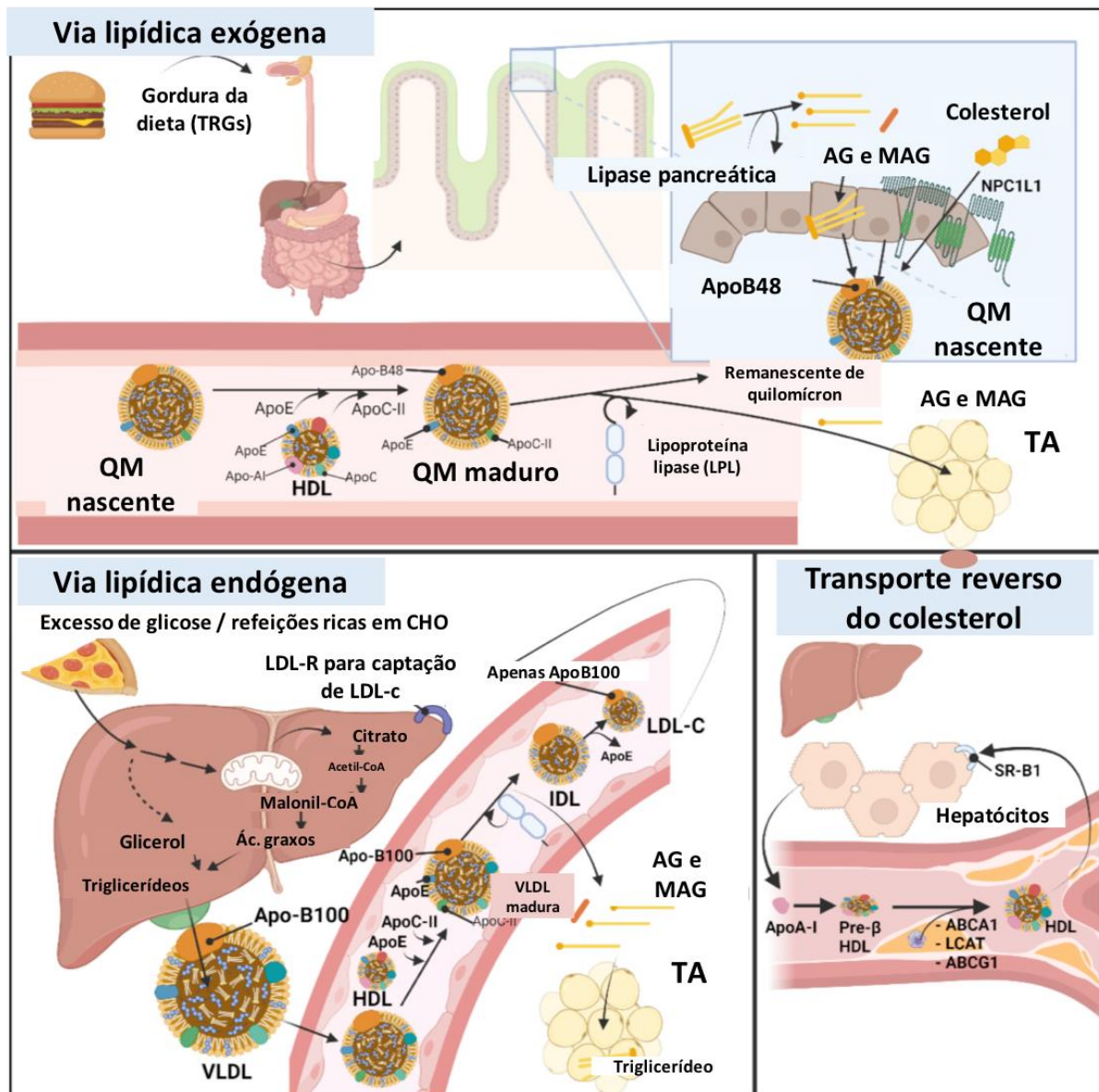
Tanto a estimulação quanto o bloqueio da adipogênese em resposta à exposição a metais pesados, entre eles o mercúrio, podem contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos. Sabe-se que a inibição da diferenciação das células adiposas diminui a capacidade de armazenamento de lipídios no tecido adiposo, levando ao acúmulo de gordura ectópica (BOSY-WESTPHAL et al., 2019). Alguns estudos demonstram que o Hg desempenha um papel na indução ou exacerbação de doenças metabólicas crônicas, como diabetes mellitus e síndrome metabólica (EOM et al., 2014; HE et al., 2013), enquanto outros relatam resultados conflitantes (LEE; KIM, 2013; LU, 2014).

1.7 Metabolismo das lipoproteínas

As lipoproteínas circulantes no plasma são moléculas compostas por um núcleo lipídico com diferentes concentrações de triglicerídeos e ésteres de colesterol empacotados dentro de uma monocamada de fosfolipídios com colesterol livre disperso e apolipoproteínas de superfície (HELKIN et al., 2016). O conteúdo dentro das lipoproteínas pode ter origem exógena ou endógena. (Figura 11). Os lipídios exógenos correspondem àqueles absorvidos a partir da dieta. Para solubilizar as gorduras dietéticas (TRG, ésteres de colesterol e AGL), as células intestinais as empacotam em quilomícrons (QM), uma lipoproteína contendo apolipoproteína B48 (Apo-B48) e então os QM são liberados na linfa e na circulação (XIAO et al., 2019). Na circulação, os QM são transformados pela ação do HDL em moléculas maduras, a partir das quais a enzima lipoproteína lipase (LPL) passa a extrair AGL, resultando em remanescentes de quilomícrons (RQM), que serão decompostos nos hepatócitos com a participação da apolipoproteína E (ApoE) (COOPER, 1997).

O conteúdo de origem endógena é formado sob influência da insulina (SANDERS; GRIFFIN, 2016). TRG endógenos e outros lipídios são liberados pelo fígado como lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), que possuem apolipoproteína B100 (ApoB100) em sua superfície (SPARKS; SPARKS; ADELI, 2012). A LPL presente na superfície do endotélio atua sobre a VLDL somente após maturação por HDL, para então liberar ácidos graxos para os tecidos periféricos (WANG; ECKEL, 2009). Essa maturação ocorre através da ação da HDL ao fornecer as apolipoproteínas C-II (ApoC-II) e E (ApoE) à VLDL (WOLSKA et al., 2017).

Figura 11. Metabolismo lipídico.



Fonte: Adaptado de Zwartjes; Gerdes; Nieuwdorp (2021).

Após a transferência de TRG da VLDL para os tecidos, a molécula ApoC-II retorna ao HDL e com isso se forma a lipoproteína de densidade intermediária (IDL), remanescente da VLDL, com cerca de 70-80% de seus triglicerídeos perdidos, mas com a maioria dos ésteres de colesterol retidos (HELKIN et al., 2016). IDL pode seguir dois caminhos: perder mais triglicerídeos através da ação da lipase hepática (LH), formando a lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) ou ser decomposta dentro dos hepatócitos pela ligação com o LDL-R à ApoE da superfície da IDL. O LDL-C tem

níveis mais baixos de ApoE expressos, mas ainda tem ApoB-100 de superfície expressa. Paralelamente à remoção de TRG da VLDL por LPL e/ou formação de IDL ou LDL, a proteína de colesterol éster transferase (CETP) também pode atuar sobre a VLDL e trocar ésteres de colesterol, retinil éster, fosfolipídios e triglicerídeos entre VLDL, HDL e LDL (HELKIN et al., 2016).

O transporte reverso do colesterol (TRC) compreende o outro braço do metabolismo das lipoproteínas. O TRC é mediado em parte por partículas HDL contendo ApoA1, que captam colesterol dos tecidos periféricos, além de macrófagos e células espumosas nas paredes dos vasos sanguíneos. Assim, a HDL leva o colesterol ao fígado para excreção na bile e nas fezes (OUIOMET; BARRETT; FISHER, 2019). A síntese de HDL se inicia pela produção de ApoA1 no fígado e enterócitos, inicialmente desprovida de lipídios (pré- β -HDL). Em seguida, ABCA1, proteína transmembrana responsável pelo efluxo celular de colesterol e fosfatidilcolina garante esses lipídios para formar HDL em formato discoide (TALL et al., 2008).

A lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), com a ajuda do cofator ApoA1, atua sequestrando o colesterol dos tecidos periféricos para o núcleo lipídico da HDL, o que modifica a configuração dessa lipoproteína para sua forma esférica madura (OUIOMET; BARRETT; FISHER, 2019). O HDL continua circulando e captando colesterol dos tecidos periféricos pela ação da LCAT, ABCA1 e posteriormente, o HDL devolve o colesterol ao fígado pela ação do receptor scavenger classe B tipo 1 (SR-B1) (ZANNIS; CHRONI; KRIEGER, 2006).

1.8 Apolipoproteína E

As apolipoproteínas são o componente proteico das lipoproteínas como quilomícrons (QM), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (ARRIFANO et al., 2018a). As apolipoproteínas solubilizam os lipídios e facilitam o transporte dessas moléculas hidrofóbicas em um meio aquoso, como o plasma (VANACE; HAYASHI, 2010). Como parte das lipoproteínas, as apolipoproteínas podem estar localizadas periféricamente na superfície da molécula (apolipoproteínas A, C e E) ou de forma transmembrana, atingindo o núcleo lipídico

da lipoproteína (apolipoproteína B) (LIMA; CARVALHO; SOUSA, 2007; VANCE; HAYASHI, 2010).

A apolipoproteína E (ApoE) é uma das mais importantes apolipoproteínas envolvidas no metabolismo das gorduras, além de participar de diversas funções cerebrais, crescimento axonal, formação sináptica e reparo neuronal (XU et al., 2014; Arrifano et al., 2018). Estudos em ratos e humanos mostraram que os hepatócitos são os principais locais de síntese de ApoE. A produção de ApoE também é prontamente detectada no cérebro, tecido adiposo, glândula adrenal, testículos, pele, rim, baço, macrófagos em uma variedade de tecidos (HUANG; MAHLEY, 2014; TUDORACHE; TRUSCA; GAFENCU, 2017). ApoE circula no sangue como um componente de VLDL, quilomícrons e uma subclasse de HDL. No líquido cefalorraquidiano (LCR) e no SNC, circula como pequenas partículas ou discos que se assemelham ao componente HDL periférico (MAHLEY; HUANG, 2012).

Regulador chave dos níveis de lipídios plasmáticos, ApoE participa do controle homeostático do conteúdo lipídico do plasma e dos tecidos. Isso é realizado em parte porque essa apolipoproteína se liga com alta afinidade aos receptores de lipoproteínas da superfície celular. ApoE medeia a interação de lipoproteínas nas quais ela está contida com o receptor de LDL (LDLR), o receptor de VLDL, o receptor de ApoE-2 e a gp330 (HUANG; MAHLEY, 2014).

ApoE humana possui três isoformas (E2, E3 e E4) que diferem em sua capacidade de interagir com os receptores e embora outros mamíferos expressem ApoE, essa variação alélica só é encontrada em humanos (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2020). ApoE se liga a proteoglicanas de heparano sulfato (HSPGs) da superfície celular com diferenças específicas entre suas isoformas quanto à afinidade de ligação. A interação com HSPGs parece atrair e sequestrar lipoproteínas contendo ApoE nas superfícies celulares e facilitar sua interação com o LDLR e possivelmente outros receptores. HSPGs sozinhos também podem mediar diretamente a internalização das partículas de lipoproteínas contendo ApoE (MAHLEY; HUANG, 2007).

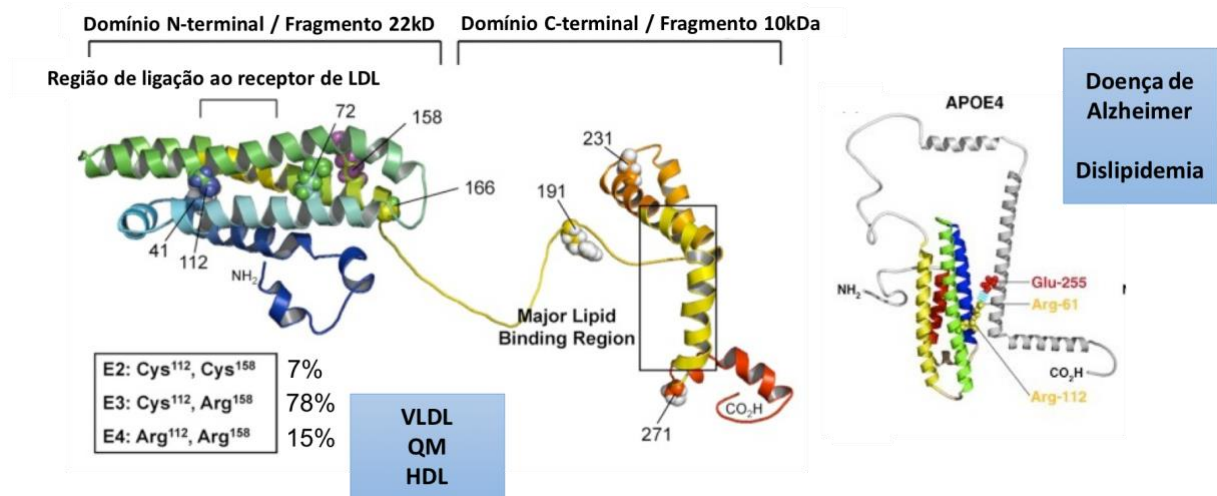
As isoformas da ApoE (Figura 12) se diferenciam molecularmente de acordo com a ocorrência de arginina e cisteína nas posições 112 e 158 da proteína (MAHLEY et al., 2009; ARRIFANO et al., 2018). ApoE 2 tem uma cisteína em ambas as posições, ApoE 3 tem uma cisteína em 112 e uma arginina em 158, e ApoE 4 tem uma arginina

em ambas as posições (WEISGRABER, 1994). A isoforma mais comumente encontrada é a ApoE 3, com frequência alélica populacional de 78%, seguida da ApoE 4 (15%) e ApoE 2, que apresenta menor frequência alélica (7%) (EISENBERG; KUZAWA; HAYES, 2010). A substituição dos aminoácidos dificulta o local de reconhecimento do LDLR resultando em baixa afinidade de ligação para esse receptor e depuração prejudicada de partículas remanescentes de lipoproteínas ricas em triglicérides (PHILLIPS, 2014).

ApoE é uma proteína com domínios N-terminal e C-terminal ligados por uma região de dobradiça central. O domínio N-terminal contém o domínio de ligação ao receptor, e o domínio C-terminal contém a região de ligação lipídica. Acredita-se que a cisteína na posição 158 (C158) na ApoE 2 cause uma ligação deficiente ao receptor, enquanto a arginina na posição 112 (R112) na ApoE 4 altera a conformação de todo o domínio, de modo que R61 é exposto e interage com C255 no domínio C-terminal (Figura 12). Essa “interação de domínio” parece ser a base biofísica para diferenças na função ApoE 4 em comparação com as outras duas isoformas; por exemplo, preferência por VLDL sobre HDL. Na ApoE 3 e ApoE 2, que possuem C112 no lugar de R112, o R61 não é exposto e não existe essa interação de domínio (FERNANDEZ et al., 2019).

Entre as várias lipoproteínas plasmáticas, ApoE 4 tem preferência por partículas grandes de VLDL ricas em triglicérides, enquanto ApoE 3 e ApoE 2 associam-se preferencialmente às pequenas HDL ricas em fosfolipídios (Huang; Mahley, 2014). ApoE 4 é o principal gene de suscetibilidade relacionado ao aparecimento da doença de Alzheimer (LIU et al., 2013) e também está associado à dislipidemia (Heeren; Beisiegel; Grewal, 2006) bem como à doença arterial coronariana (DAC) (SCHMITZ et al., 2007). Arrifano et al. (2018b) sugerem em seu estudo que ApoE 4, além de um possível efeito farmacodinâmico, pode influenciar farmacocineticamente a exposição ao mercúrio causando uma maior bioacumulação desse metal, o que pode levar a doenças neurodegenerativas posteriores com o envelhecimento.

Figura 12: Isoformas da ApoE.



Fonte: Adaptado de CHOU et al., 2019.

As isoformas da ApoE diferem de acordo com os aminoácidos presentes nas posições 112 e 158. ApoE 2 possui uma cisteína na posição 112 e 158, ApoE 3 possui uma cisteína na posição 112 e uma arginina na posição 158, e a ApoE 4 possui uma arginina em ambas as posições. A arginina na posição 158 na ApoE 4 expõe a arginina na posição 61, o que promove uma ligação com o ácido glutâmico na posição 255, mudando a conformação da molécula. Essa mudança de conformação leva a diferenças na afinidade da ApoE 4 por seus ligantes. Assim, ApoE 2 e 3 possuem maior afinidade aos quilomícrons e algumas formas de HDL e ApoE 4 apresenta maior afinidade pela VLDL. ApoE 4 está relacionada à doença de Alzheimer e à dislipidemia.

Historicamente, a maioria dos estudos sobre ApoE destacou o seu importante papel na modulação do risco de doença cardiovascular e doença de Alzheimer. Entretanto, os efeitos dessa molécula pleiotrópica vão além dessas condições de saúde, com participação em diversas situações biológicas, como função do tecido adiposo e excesso de peso, síndrome metabólica, diabetes mellitus, fertilidade, longevidade, função imunológica, e doenças infecciosas (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2020).

O tecido adiposo é o terceiro maior produtor de ApoE, ficando atrás do fígado e do cérebro (ZECHNER et al., 1991). A produção endógena da ApoE nas células adiposas parece ser regulada por fatores relacionados à sensibilidade à insulina. Seus níveis reduzem em resposta ao excesso de peso, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e angiotensina II, e aumentam em resposta a agonistas do PPAR γ , jejum e perda de peso (HUANG et al., 2007; YUE et al., 2004). Huang e cols. (2007) sugerem que ApoE

protege contra oscilações do estado nutricional, preservando o balanço energético e a funcionalidade do tecido adiposo através de sua participação na captação de gorduras.

Adipócitos sem expressão de ApoE têm dificuldade para aquisição de lipídios a partir da partícula de VLDL circulante. Há pelo menos duas formas pelas quais isso pode ocorrer, a primeira corresponde à menor internalização de partículas de VLDL através da via endocítica devido à expressão reduzida de proteínas da família do receptor de LDL (HUANG et al., 2009). E a segunda diz respeito a prejuízos no acúmulo de TRG dependente da lipoproteína lipase em adipócitos ApoE ko devido ao transporte reduzido de ácidos graxos através da membrana do adipócito, provavelmente em consequência à expressão reduzida de caveolina-1 e balsas lipídicas na membrana plasmática (HUANG et al., 2009).

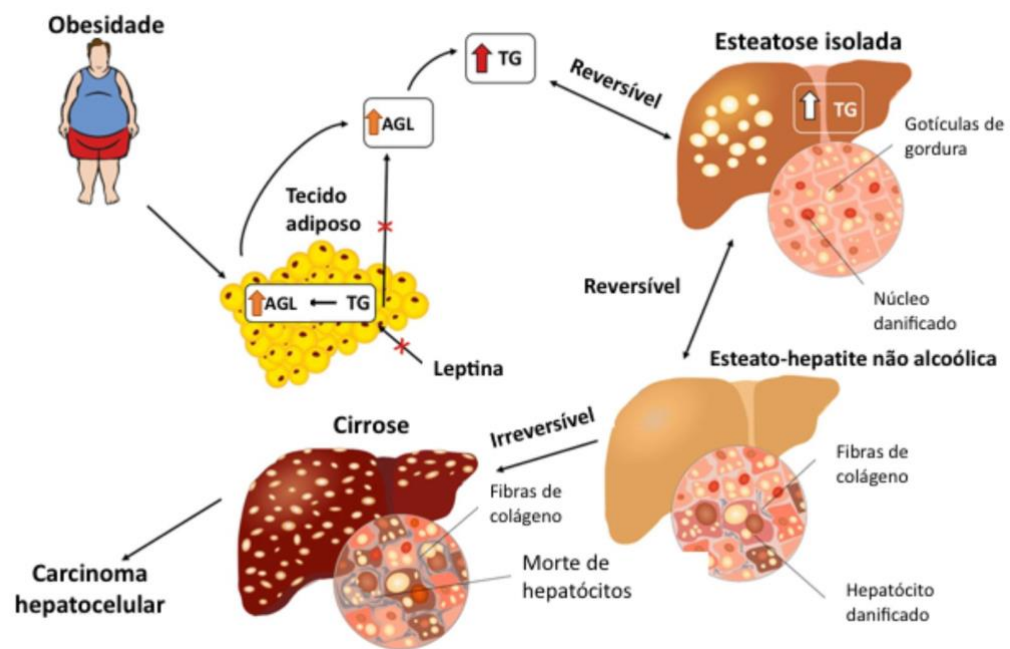
1.8 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Em todo o mundo, cerca de 2 milhões de pessoas morrem por ano como consequência de doenças hepáticas, sendo a cirrose uma causa comum de mortalidade, causando aproximadamente 1,16 milhão dessas mortes. Nos países industrializados ocidentais, as principais causas de cirrose são a ingestão crônica de álcool e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), enquanto a hepatite B ainda é uma das principais causas em muitos países asiáticos (ASRANI et al., 2019).

DHGNA (Figura 13) é uma doença hepática crônica e cada vez mais comum entre indivíduos adultos no mundo ocidental (CHALASANI et al., 2018; EASL, 2016). É caracterizada pela infiltração gordurosa do fígado, em indivíduos sem histórico de ingestão significativa de álcool ou de outras doenças hepáticas (COTRIM et al., 2016) e subdividida em fígado gorduroso não alcoólico e esteato-hepatite não alcoólica, do inglês *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH) (CORDEIRO et al., 2020). Histologicamente, DHGNA é categorizada em fígado gorduroso não alcoólico, com grau de esteatose hepática $\geq 5\%$ sem evidência de lesão de células hepáticas e sem fibrose e NASH, definida como $\geq 5\%$ de esteatose hepática incluindo inflamação e lesão de hepatócitos com ou sem fibrose, embora a fibrose seja tipicamente observada (CHALASANI et al., 2018).

NASH está relacionada à elevação do risco de cirrose hepática, carcinoma hepatocelular (CHC) e mortalidade relacionada a doenças do fígado, principalmente quando há fibrose associada (TAKAHASHI; FUKUSATO, 2014). O progresso da fibrose amplia significativamente o risco de morte relacionada à doença hepática (DULAI et al., 2017).

Figura 13: Evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)



Fonte: Adaptado de KOŘÍNKOVÁ et al., 2020.

O acúmulo de gordura no tecido adiposo e no fígado resulta em esteatose hepática isolada, com gotículas de gorduras acumuladas nos hepatócitos e danos ao núcleo das células. A esteatose pode evoluir reversivelmente para esteato-hepatite não alcoólica, que apresenta deposição de fibras de colágeno no tecido hepático e danos aos hepatócitos. Por sua vez, a esteato-hepatite, quando não tratada, pode evoluir para cirrose hepática de modo irreversível, podendo chegar ao carcinoma hepatocelular.

Diversas vias estão envolvidas na patogênese da DHGNA, como o acúmulo de ácidos graxos e triglicérides que ocorre devido à resistência à insulina tanto hepática quanto no tecido adiposo e no músculo esquelético. De acordo com Donelly e col. (2005), na DHGNA as fontes de triglicérides intra-hepáticos foram atribuídas principalmente a ácidos graxos circulantes (59%), ácidos graxos dietéticos (15%) e lipogênese de novo (DNL) (26%). DNL é a síntese de ácidos graxos a partir de

subunidades de acetil-CoA produzidas durante a glicólise no metabolismo dos carboidratos (SMITH; TSAI, 2007). Estima-se que a DNL seja três vezes maior na DHGNA em comparação com indivíduos saudáveis (TER HORST; SERLIE, 2017).

DHGNA está associada de modo bidirecional com componentes da síndrome metabólica (SM) (BYRNE; TARGHER, 2015; YOUNOSSI et al., 2016), sendo acompanhada por uma série de alterações fisiopatológicas: resistência à insulina, elevação da lipogênese e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); diminuição da oxidação de ácidos graxos no fígado; lipólise desordenada no tecido adiposo ocasionando lipotoxicidade; e redução da supressão da glicogenólise e gliconeogênese hepáticas mediada pela insulina, resultando em esteatose, hipertrigliceridemia e hiperglicemia (VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010; YKI-JARVINEN, 2014; KOLIAKI et al., 2015).

Os níveis de exposição a metais pesados também foram relacionados a índices de doença hepática gordurosa não alcoólica e alterações em enzimas hepáticas (NGUYEN; KIM, 2022) e de acordo com esses autores, as principais vias moleculares implicadas na patogênese da DHGNA gerada pela combinação de metais pesados incluem estresse oxidativo ativado, metabolismo lipídico alterado e aumento de citocinas e resposta inflamatória.

2 JUSTIFICATIVA

A intoxicação mercurial é um problema de saúde pública em regiões endêmicas do Brasil, especialmente na região Amazônica. Recentemente, evidências apontam para um efeito da intoxicação por mercúrio no risco cardiovascular e aterosclerótico.

A pandemia da obesidade é uma preocupação mundial, afetando todas as idades, aumentando o risco cardiovascular e doenças crônico-degenerativas. Esse impacto a longo prazo pode determinar gastos excessivos em saúde pública e risco de incapacitação e óbito precoce.

Em países em desenvolvimento como o Brasil, está havendo um processo de transição nutricional, onde há uma dupla carga de má nutrição, com ocorrência de obesidade e desnutrição proteica em populações vivendo em áreas carentes.

O entendimento da fisiopatologia do tecido adiposo e de sua plasticidade em condições de intoxicação mercurial em populações com dislipidemia é, portanto, de caráter estratégico para políticas de saúde pública no Brasil.

No nosso estudo, avaliamos o efeito da intoxicação mercurial (20mg/L na água de beber por 20 dias) nas alterações estruturais e funcionais do tecido adiposo branco epididimário em camundongos ApoE nocautes, animais que apresentam dislipidemia e representam modelo experimental para doença cardiovascular.

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que investigou nesses animais o impacto da intoxicação mercurial no tecido adiposo. Os resultados do nosso estudo poderão contribuir para descoberta de alvos farmacológicos para intervenção em populações vulneráveis com o intuito de melhorar a função anti-obesogênica e antiinflamatória do tecido adiposo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da intoxicação induzida por metilmercúrio - MeHg (20 mg/L) por 20 dias na plasticidade do tecido adiposo unilocular e na concentração de marcadores inflamatórios sistêmicos e peroxidação lipídica em camundongos jovens C57BL6J APOE nocautes.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da intoxicação por MeHg (20 mg/L) por 20 dias na água de beber em camundongos jovens C57BL6J.
- Avaliar o efeito da ausência de ApoE em camundongos jovens C57BL6J.
- Investigar a existência de sinergismo entre a ação do MeHg (20 mg/L) e ausência de ApoE em camundongos jovens C57BL6J.
- Avaliar a ação do MeHg no modelo de dislipidemia (ApoE ko), em camundongos jovens C57BL6J.

Serão avaliados os seguintes aspectos:

- Ganho e delta de peso corporal
- Peso do tecido adiposo epididimário
- Peso do tecido hepático
- Dosagem de mercúrio no pelo
- Concentração plasmática de colesterol total e triacilgliceróis
- Concentração plasmática de enzimas hepáticas AST e ALT
- Peroxidação lipídica através das concentrações de malondialdeído (MDA), hidroperóxidos e superóxido dismutase no tecido hepático
- Expressão gênica de LCAT, APOA1, HMGCR, NF κ B-p65, TNF α , PPAR γ no tecido adiposo epididimário
- Esteatose hepática e grau de balonização

- Concentração dos níveis de leptina no plasma
- Morfometria do tecido adiposo epididimário com medida de diâmetro dos adipócitos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimentação animal

Foram utilizados 97 camundongos C57BL6J (59 selvagens e 38 ApoE ko) após desmame, com idade de 21 dias e peso entre 8 e 10 gramas. Quatro desses animais morreram durante a fase de experimentação. Os animais foram provenientes do biotério de produção do Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR (NuBEx), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), com protocolo de aprovação por comitê de ética: 2073110618 de 2018. O biotério do NuBEx é classificado como NB1 e dispõe da linhagem C57BL6J, mantidos sob rigoroso controle sanitário e genético.

Tabela 3: Grupos experimentais para avaliar o impacto da intoxicação mercurial em animais ApoE ko e controles selvagens.

Linhagem	Tratamento	Denominação
Selvagens	Água	CT
Selvagens	MeHg	MeHg
ApoE ko	Água	ApoE ko CT
ApoE ko	MeHg	ApoE ko MeHg

Os animais foram mantidos em microisoladores dispostos em rack com ventilação forçada; com temperatura, luminosidade, umidade do ar e frequência de trocas gasosas controladas. Em cada microisolador foram dispostos no máximo cinco animais, com livre acesso a água e comida. Todos os animais receberam uma marcação na cauda, que permaneceu com eles até a data da eutanásia. A pesagem ocorreu semanalmente. O valor inicial do peso de cada animal foi considerado como seu valor absoluto (100%). As demais pesagens foram convertidas para valores percentuais relativos ao absoluto. Os resultados foram apresentados com gráfico de

ganho de peso ao longo do tempo e delta de ganho de peso [peso final – peso inicial (g)].

Os microisoladores, maravalha, ração e água desses animais foram desinfetados a cada troca pela equipe treinada do próprio biotério. Todas as pesagens foram feitas em cabines de biossegurança com fluxo de ar, a fim de evitar a contaminação dos animais. Mantendo as barreiras sanitárias ideais para o nível de segurança do biotério.

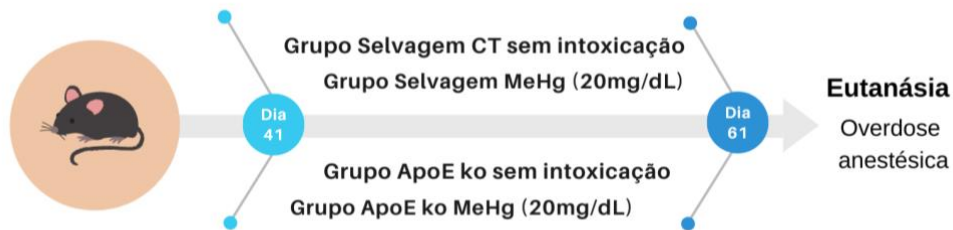
Após 61 dias de vida, os animais foram eutanasiados com sobredose de ketamina e xilazina para coleta das amostras. Quando destinadas para a realização de técnicas de biologia molecular, as amostras foram acondicionadas em nitrogênio líquido. O sangue foi coletado através de capilares heparinizados por meio do plexo retroorbital, sendo separado em plasma para as análises de parâmetros lipídicos e inflamação sistêmica.

4.2 Intoxicação com metilmercúrio

Em estudo anterior deste grupo de pesquisa com dose de 40mg de MeHg/L por 21 dias na água de beber (FRANCO et al., 2009) em camundongos C57BL6J foi observada alta taxa de mortalidade e aparecimento de prejuízo motor, ataxia, tornando inviável a avaliação do impacto do MeHg pela perda de animais. A dose então foi ajustada para 20mg de MeHg/L por 21 dias, protocolo proposto por Andersen e Andersen (1993), esta dose foi bem tolerada pelos animais durante o período de 21 dias.

Os animais intoxicados foram movidos para outra sala de experimentação, a fim de não contaminar o rack de ventilação, ou seus filtros. Eles se mantiveram com a mesma distribuição de animais por caixa e parâmetros dos demais. Com 41 dias de vida, aqueles animais com peso entre 8 e 10g foram iniciados à intoxicação por MeHg (Cloreto de Metilmercúrio - Sigma) com 20 mg de MeHg/L de água de beber por 20 dias (Figura 14).

Figura 14: Desenho experimental do estudo.



Fonte: própria.

As provetas, mamadeiras e microisoladores foram higienizados em local diferente dos demais animais para não haver contaminação cruzada. A maravalha trocada era reservada e ao final do protocolo experimental, ela e todos os resíduos decorrentes da eutanásia foram armazenados em saco branco leitoso, com símbolo de contaminante. Todos os resíduos foram encaminhados à empresa especializada que recolhe lixo decorrente do curso de odontologia (com resíduos de Hg do amálgama dentário), para posterior incineração com o uso de filtro específico na chaminé.

Para preparação da solução de intoxicação, foi feita diluição para 20mg de MeHg/L de água, mantida sob agitação e leve aquecimento por 20 minutos em plataforma agitadora e aquecedora mecânica. Cada solução de 20 mg de MeHg/L de água era preparada semanalmente, sendo armazenada em geladeira (2-8°C) ao abrigo da luz, em garrafa de plástico. Toda manipulação do MeHg foi feita dentro de cabine de biossegurança com uso de máscaras de proteção hemifacial e óculos, além do uso de jalecos descartáveis, luvas de nitrila e o cuidado para evitar o uso de materiais metálicos no manuseio do MeHg.

Ao finalizar um grupo experimental o que restava das garrafas contendo MeHg era armazenado para ser posteriormente encaminhado ao setor de Química Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC), para correto descarte do material contaminado.

4.3 Dosagem da concentração de mercúrio nos pelos

Para mensurar a concentração de mercúrio no pelo, foi utilizado o aparelho DMA-80 (Direct Mercury Analyzer, Milestone, Dinamarca), em colaboração com o Departamento de Química da UFMG.

O princípio do sistema de análise do aparelho, consiste na decomposição térmica da amostra a partir de um fluxo contínuo de oxigênio. Os produtos em alta temperatura da combustão com o oxigênio, são conduzidos a um catalisador que aquece mais a amostra e conduz os vapores a um detector constituído por ouro que realiza a detecção do mercúrio volatilizado da amostra baseado na forte amálgama que o mercúrio realiza com o ouro. Após a formação da amálgama, esta, é desorvida por quantização e a concentração de mercúrio detectada na amostra é determinada por espectrofotometria de absorção atômica a 254 nm (KIM et al., 2019). Os resultados finais foram expressos em mg Hg/ kg amostra.

Para mensurar a concentração de mercúrio nos pelos, os mesmos foram recolhidos após eutanásia. Foram pesados entre 0,1 a 0,9 miligramas de amostra para os grupos intoxicados e entre 1 a 9 miligramas de amostra para os grupos não-intoxicados. As amostras foram colocadas em barcas de quartzo e introduzidas no aparelho. As medidas foram realizadas em triplicata para cada animal e os resultados finais expressos em mg Hg/kg amostra.

4.4 Avaliação do perfil lipídico

As amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo retroorbital e centrifugadas a 3500 rpm por dez minutos. O plasma foi obtido para determinação da concentração de colesterol total e triglicérides. Os níveis de colesterol total e triglicérides plasmáticos foram determinados por analisador semi-automático (LabQuest, Labtest, Brasil), utilizando kits de diagnóstico (Labtest, Brasil).

4.5 Esteatose hepática

As lâminas foram processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E). Foram então classificadas de forma cega por um patologista quanto aos escores de esteatohepatite e balonização (KLEINER et al., 2005). O escore de esteatohepatite segue a seguinte classificação: (0) não diagnóstico de esteatohepatite, (1) esteatohepatite limítrofe, (2) diagnóstico de esteatohepatite. Enquanto o escore de balonização os seguintes parâmetros: (0) nenhuma, (1) poucas células balonizadas, (2) muitas células balonizadas/balonização proeminente.

4.6 Avaliação de estresse oxidativo no tecido hepático

4.6.1 Hidroperóxidos totais

A dosagem de hidroperóxidos totais presentes nas amostras hepáticas, consiste basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{-2}) a íons férricos (Fe^{-3}) sob condições ácidas, pelos hidroperóxidos, conforme descrito por Barnejee e colaboradores (2003). O indicador utilizado é o xilenol orange, que se liga aos íons férricos produzindo um cromóforo com tonalidade entre o azul e roxo, que pode ser determinado espectrofotometricamente porque absorve em 560 nm e tem coeficiente de extinção molar ($1,5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ à 560nm) conhecido (BANERJEE et al., 2002). Os resultados foram expressos em μmol de hidroperóxidos por mg de proteína.

4.6.2 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em reagir com o ânion superóxido (O_2^-) e reduzi-lo a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água. Assim, a SOD é capaz de diminuir a auto-oxidação do pirogalol, presente no meio de reação, conforme descrito por Dieterich e colaboradores em

(2000). A técnica consiste em homogeneizar o tecido hepático em tampão fostafo e acrescentar pirogalol e o agente oxidante MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium). A reação pode ser determinada espectrofotometricamente por absorbância a 570 nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogalol do padrão. O resultado foi expresso em unidades de SOD por mg de proteína (U/mg proteínas).

4.6.3 Avaliação da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As amostras foram homogeneizadas em PBS 1x gelado e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. A análise da medida dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico contemplou a adição de 500 µL de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N) aos sobrenadantes (250µL). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e, então, colocadas em água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750 µL de álcool butílico, e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados à placa de 96 poços 200µL do sobrenadante, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535 nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no tecido (LOWRY et al., 1951).

4.7 Enzimas hepáticas

4.7.1 Atividade de aspartato aminotransferase (AST)

A dosagem da atividade de AST foi realizada por kit diagnóstico (Labtest, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade enzimática de transaminase, isto é, na catálise da transferência de um grupo amino de um α -

aminoácido para um α -cetoácido, que a enzima exerce. Assim, o oxalacetato presente na amostra sérica, reage com a dinitrofenilhidrazina, formando hidrazona em meio alcalino, um composto de cor amarela, com absorvância em 505 nm, diretamente proporcional à quantidade de oxalacetato presente na amostra. que em determinado tempo se traduz na atividade enzimática da transaminase. Os resultados foram expressos em unidades/mL de AST.

4.7.2 Atividade de alanina aminotransferase (ALT)

A dosagem da atividade de ALT foi realizada por kit diagnóstico (Labtest, Brasil), baseada nas instruções do fabricante e no fato de que a ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α -cetogluturato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da enzima lactato desidrogenase, produzindo cor amarela, enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade enzimática da ALT na amostra é calculada de forma diretamente proporcional à absorvância em 505 nm. Os resultados foram expressos em unidades/mL de ALT.

4.8 Análise de leptina por ensaio imunoenzimático ELISA

O sangue foi coletado pelo plexo retroorbital e mantido em recipiente heparinizado. Posteriormente foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos e aspirado o sobrenadante para coleta do plasma e análise de Leptina. As amostras foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato salina 1x concentrada, o reagente foi diluído em solução de BSA a 1%, os anticorpos e o padrão foram diluídos em PBS 1x filtrado. Após sensibilização de placa foi realizada a etapa de bloqueio para ligações inespecíficas. As amostras foram incubadas overnight e adicionado o anticorpo no dia seguinte, bem como dos reagentes colorimétricos e leitura em espectrofotômetro em 450 nm. A técnica seguiu o protocolo disposto no kit específico do anticorpo, proposto pela fabricante R&D Systems.

4.9 Análise da expressão gênica

A reação da cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando um mastermix comercial (BIO-RAD, 1725121) e seguidas as recomendações do fabricante para as reações de 10 uL. Nestas foi utilizado 5uL do mastermix, 2 uL de água livre de nuclease, 1 uL de primer forward, 1 uL de primer reverse e 1 uL do produto de cDNA diluído 10x. Brevemente, as amostras foram analisadas com os primers de perfil lipídico, sendo estes o GADPH (Controle positivo), LCAT, TNF α , APOA1, NFKB, HMGcR e PPARY. A programação utilizada na corrida da PCR foi 94° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C 20 segundos, 60° C 20 segundos e 72° C por 20 segundos e, por fim, 72° C por 2 minutos. A análise dos dados foi realizada seguindo o método de Livak; Schmittgen (2001).

4.10 Morfometria do tecido adiposo

Estudos histológicos no tecido adiposo epididimário foram realizados. Após a pesagem, os tecidos foram fixados em formaldeído a 10% por 1 a 2 dias. Assim, os tecidos foram incluídos em parafina, seccionados a 5 μ m e corados com hematoxilina/eosina. Os tecidos foram estudados em um microscópio Olympus America Q-Color 3 (Canadá) equipado com o pacote de software de análise de imagem QCapture, para avaliação dos parâmetros morfométricos. A análise foi feita em 10 campos aleatórios por corte medidos em uma ampliação de 10x. Para mensuração do diâmetro dos adipócitos, foram quantificadas três lâminas por animal, sendo retiradas lâminas não consecutivas. O software Image J 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) foi usado para medir os adipócitos.

4.11 Equipamentos e Materiais

- 10 microisoladores (Alesco®, São Paulo, Brasil);
- 3 racks ventilado (Alesco®, São Paulo, Brasil);
- Balança digital eletrônica para pesagem de animais (Filizola, São Paulo, Brasil);

- Balança analítica eletrônica de precisão (Precisa, Belo Horizonte, Brasil);
- Centrífuga refrigerada para tubos (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Espectrofotômetro UV-Visible (Shimadzu UV-260, Tóquio, Japão);
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- Espectrofotômetro de absorção atômica – DMA80 (Milestone, Bergamo Itália);
- Cabine de segurança biológica classe II, ARIA LS48 (Tecniplast, Varese, Itália);
- Microisoladores, GM 500 (Tecniplast, Varese, Itália);
- Rack ventilado DGM (Tecniplast, Varese, Itália);
- Geladeira e freezer -80°C (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- *LightCycler Nano* (Basel, Switzerland);
- Cromatógrafo (Waters, modelo Alliance, Massachusetts, United States);
- LabQuest (Labtest, Lagoa Santa, Brasil);
- Vórtex Maxi Mix II (Thermolyne, Iowa, Estados Unidos);
- Ração Presence-Labina (São Paulo, Brasil);
- Capilares vítreos heparinizados;
- Microplacas de 96 poços;
- Tubos Eppendorfs, 1,5ml;
- Criotubos, 2,0ml;
- Tubos Falcons, 15 e 50ml;
- Instrumental cirúrgico;
- Ponteiras para pipetas;
- Seringas;
- Tubos de polipropileno para centrífuga;
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio;
- Luvas de nitrile descartáveis;
- Máscara e óculos de proteção individual 3M contra risco biológico;
- Placas de petri;
- Avental de algodão;
- Avental descartável;
- Propés descartáveis;
- Toucas descartáveis;
- Sacos plásticos para descarte, com símbolo de contaminante;

- *AnyMaze* versão única (Stoelting, Co, Illinois, EUA)
- Microscópio Olympus America Q-Color 3 (Canadá)

4.11.1 Reagentes e soluções

- Cloreto de metilmercúrio (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Ketamina - Kensol (König, Santana de Parnaíba, Brasil);
- Xilazina - Vetanarcol (König, Santana de Parnaíba, Brasil);
- Kit Labstest® para dosagem de colesterol (Labtest, Lagoa Santa, Brasil);
- Kit Labstest® para dosagem de triacilgliceróis (Labtest, Lagoa Santa, Brasil);
- Kit ELISA Duo-Set Leptina (R&D Systems, Minesota, EUA);
- RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Düsseldorf, Alemanha);
- Super Script III (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- SYBR Green Master mix (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- Primers Bax, GAPDH, APOA1, LCAT, PPAR γ , NF κ B, TNF α (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil);
- PBS (tampão fosfato salino);
- HTAB 0,5%;
- HNO₃ 10%;
- KMnO₄;
- H₂SO₄;
- Sulfonilamida 1%;
- Ácido fosfórico 5%;
- Ácido acético 20%;
- Ácido 2-tiobarbitúrico 0,5%;
- Ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB)
- Ácido perclórico 1%

4.12 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA) para fazer as análises e comparações. As comparações estatísticas e significâncias foram verificadas utilizando-se o teste two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.13 Ética

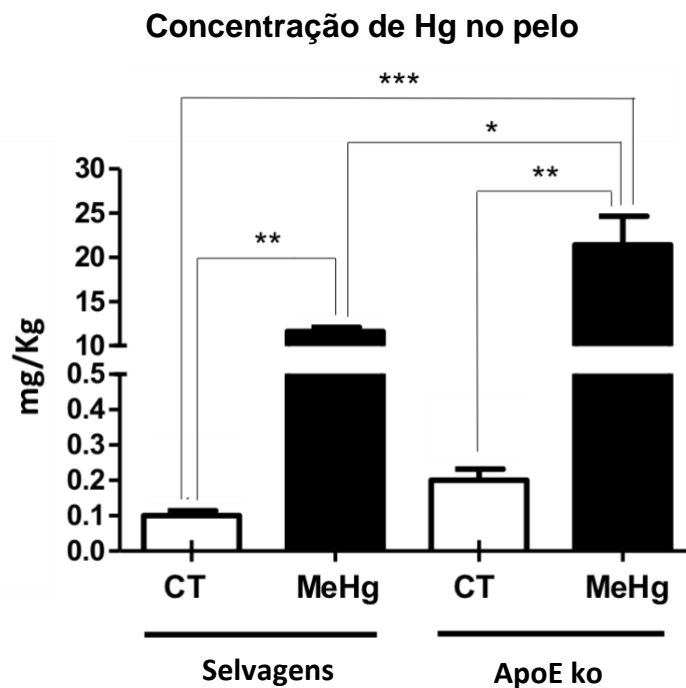
Os experimentos descritos no modelo animal seguem as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram submetidos e aprovados junto ao Comitê de Ética da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) (ANEXO A).

5 RESULTADOS

5.1 Depósito de mercúrio no pelo

Os camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko intoxicados com 20mg/L de MeHg apresentaram significativamente maior concentração de Hg no pelo do que os respectivos grupos controle, $p < 0,05$. Os animais selvagens intoxicados apresentaram significativamente menor depósito de Hg no pelo do que ApoE ko intoxicados, $p < 0,05$ (Figura 15).

Figura 15. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de Hg no pelo de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

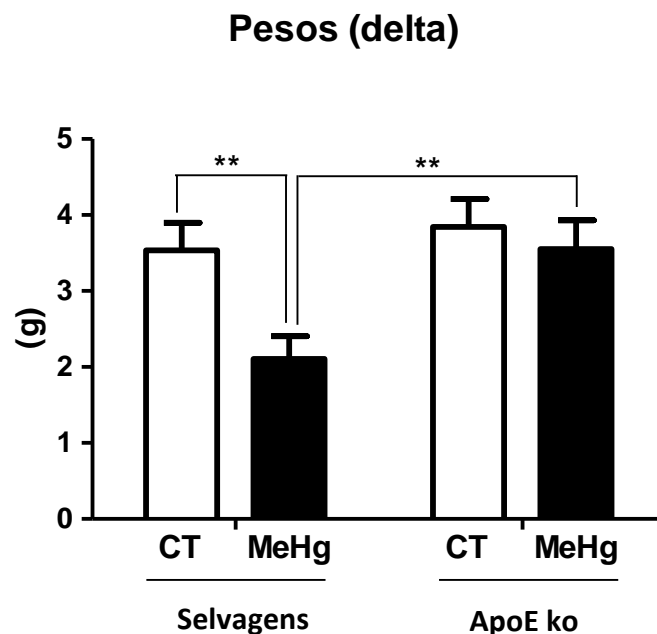


Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.2 Peso dos animais

Os camundongos C57BL6/J selvagens intoxicados com 20mg/L de MeHg apresentaram ganho de peso significativamente menor que o grupo controle, $p < 0,01$. Não houve diferença significativa entre os grupos controle selvagem *versus* controle ApoE ko, bem como entre o grupo controle selvagem e o grupo ApoE ko intoxicado e os grupos ApoE ko controle *versus* ApoE ko intoxicado com MeHg. Os animais ApoE ko intoxicados com MeHg apresentaram significativamente maior ganho de peso que os animais selvagens intoxicados, $p < 0,01$ (Figura 16).

Figura 16. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no ganho de peso de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

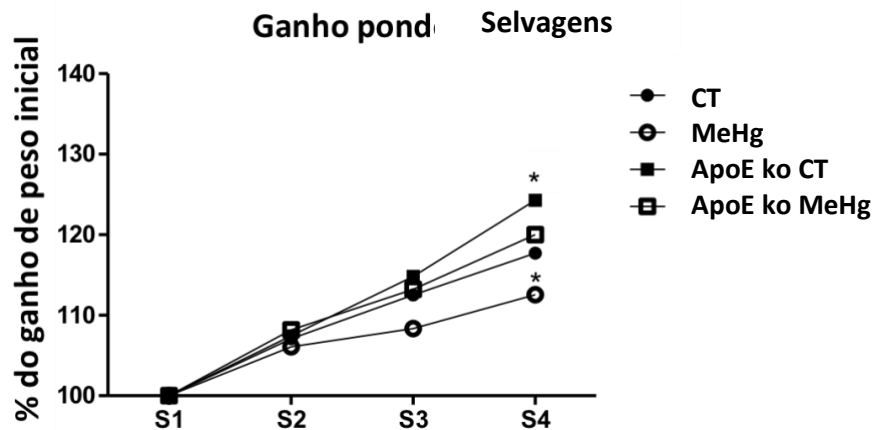


Os valores representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Não houve diferença significativa no percentual de ganho de peso semanal entre animais selvagens não intoxicados quando comparados com selvagens intoxicados com MeHg. Também não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle selvagem *versus* controle ApoE ko ou controle selvagem e o grupo ApoE ko intoxicado. Animais ApoE ko não intoxicados com MeHg

apresentaram significativamente maior ganho de peso na semana 4 (S4) quando comparados com ApoE ko intoxicados (Figura 17).

Figura 17. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no percentual de ganho de peso semanal de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

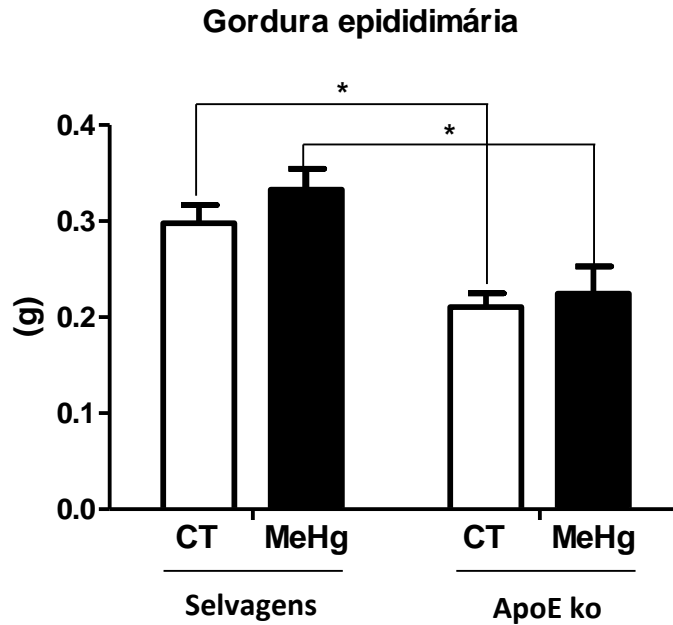


Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste two-way ANOVA.

5.3 Peso do tecido adiposo epididimário e do fígado

Não houve diferença significativa no peso do tecido adiposo epididimário quando comparamos os animais selvagens controles *versus* intoxicados com MeHg. Entretanto, quando comparados os grupos controles do estudo, o grupo ApoE ko controle apresentou significativamente menor peso do tecido adiposo epididimário que o grupo controle selvagem ($p < 0,05$). Também foi verificado significativamente menor peso do tecido adiposo no grupo ApoE ko intoxicado quando comparado ao grupo selvagem intoxicado ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle selvagem *versus* ApoE ko intoxicado e ApoE ko controle *versus* ApoE ko intoxicado (Figura 18).

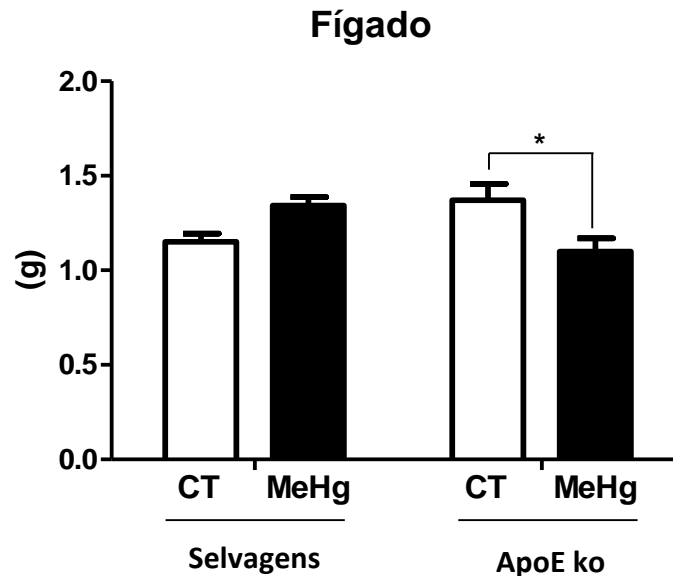
Figura 18. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no de peso do tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Não houve diferença significativa no peso do fígado entre animais selvagens controles e intoxicados com MeHg, controle selvagem *versus* ApoE ko controle ou controle selvagem *versus* ApoE ko intoxicado com MeHg. Entretanto, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ApoE ko controle e APOE ko intoxicado, nas quais o grupo intoxicado apresentou menor peso do órgão (Figura 19).

Figura 19. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no de peso do fígado de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

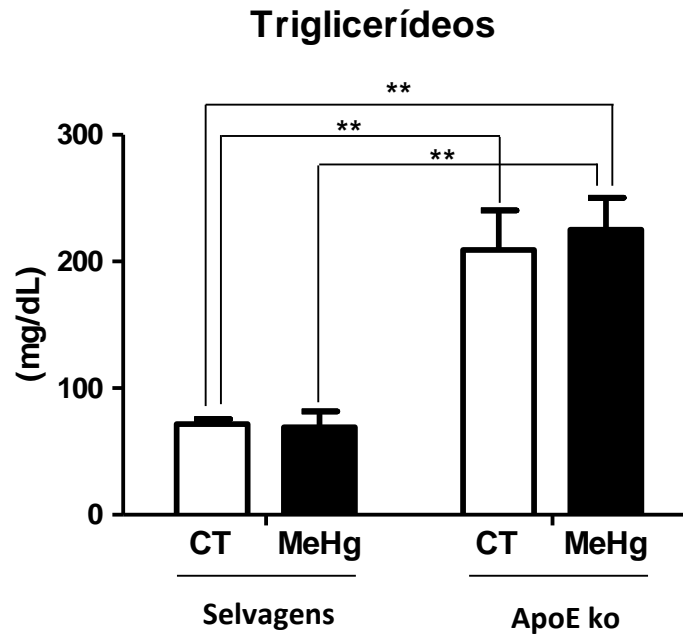


Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.4 Lipídios sanguíneos

Não encontramos diferenças significativas nos níveis plasmáticos de triglicérides entre os grupos de animais selvagens controle e intoxicado com 20mg/L de MeHg. Os grupos ApoE ko controle e ApoE ko intoxicado apresentaram valores significativamente mais elevados de triglicérides quando comparados individualmente ao grupo controle selvagem ($p < 0,01$). Também encontramos diferenças significativas entre os grupos selvagem intoxicado *versus* ApoE ko intoxicado, com maior nível de triglicérides no grupo com deleção de ApoE ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos ApoE ko controle *versus* ApoE ko intoxicado (Figura 20).

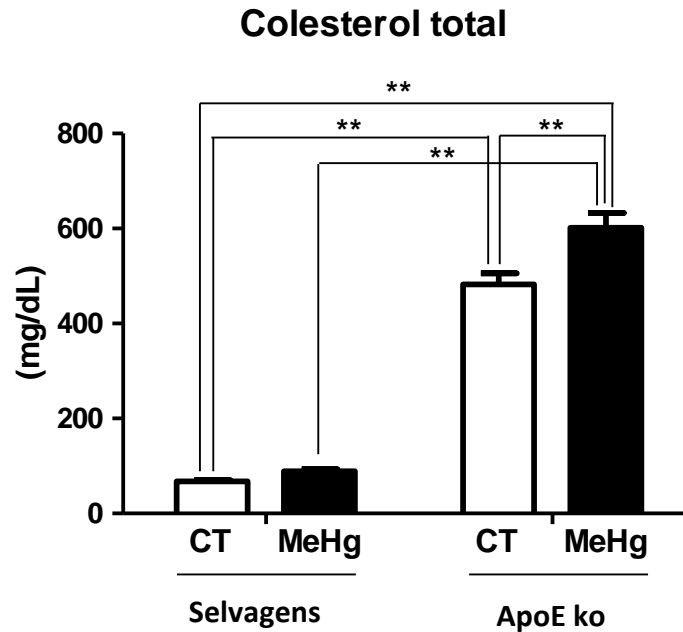
Figura 20. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração plasmática de triglicérides de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Não detectamos diferenças significativas nos níveis plasmáticos de colesterol entre os grupos de animais selvagens controle e intoxicado com 20mg/L de MeHg. Os grupos ApoE ko controle e ApoE ko intoxicado apresentaram valores significativamente mais elevados de colesterol quando comparados individualmente ao grupo controle selvagem ($p < 0,01$). Também encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ApoE ko controle *versus* ApoE ko intoxicado, com maior nível de colesterol no grupo intoxicado. O grupo ApoE ko intoxicado apresentou significativamente maiores níveis de colesterol plasmático que o grupo selvagem intoxicado (Figura 21).

Figura 21. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 30 dias na concentração plasmática de colesterol de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.5 Esteatose hepática

Diferenças estatísticas em relação aos escores de esteatose hepática não foram encontradas em camundongos C57BL6/J quando comparados os grupos controle selvagem *versus* selvagem intoxicado com MeHg. Também não houve diferença estatística quando comparamos os grupos controle selvagem *versus* APOE CT. Entretanto, a intoxicação por MeHg (20 mg/L na água de beber) por 20 dias causou aumento significativo nos escores de esteatose hepática em animais ApoE ko quando comparados com seus controles. Quanto ao escore de balonização, foram detectadas diferenças estatísticas apenas quando comparados os grupos selvagem controle *versus* ApoE ko intoxicado (Tabela 4).

Tabela 4. Efeitos da intoxicação por mercúrio (20 mg/L na água de beber) em escores histopatológicos no fígado de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

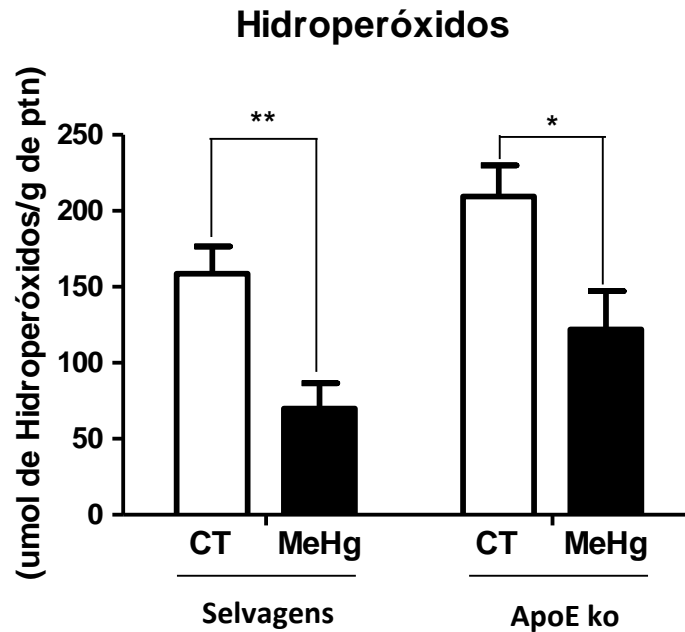
Grupos	Esteatose	Balonização
Controle	0 (0-0)	0 (0-1)
MeHg	0 (0-0)	0 (0-2)
ApoE CT	0 (0-1)	1 (0-2)
ApoE MeHg	1 (0-1) ^{a,b}	1 (0-2) ^b

a: <0,05 *versus* APOE CT b: p<0,05 *versus* Controle.

5.6 Estresse oxidativo no tecido hepático

A intoxicação por MeHg (20 mg/L na água de beber) por 20 dias causou redução significativa nos níveis de hidroperóxidos no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens ($p<0,01$) e ApoE ko ($p<0,05$) em comparação aos respectivos controles. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos controle selvagem *versus* ApoE ko controle ou controle selvagem *versus* ApoE ko intoxicado (Figura 22).

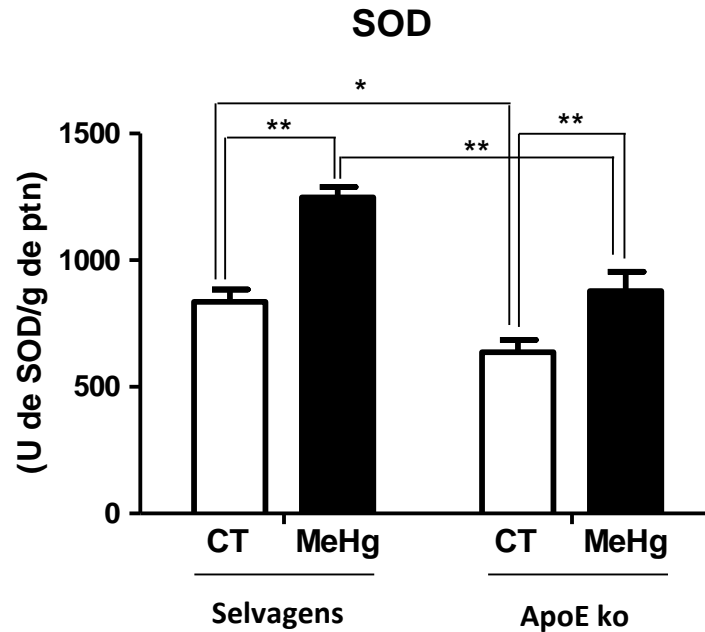
Figura 22. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de hidroperóxidos no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Os camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko intoxicados com 20mg/L de MeHg apresentaram significativamente maior concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático quando comparados a seus respectivos controles, $p < 0,01$. Também encontramos diferenças estatísticas entre os grupos controle selvagem *versus* ApoE ko controle ($p < 0,01$) e selvagem intoxicado *versus* ApoE ko intoxicado, $p < 0,05$ (Figura 23).

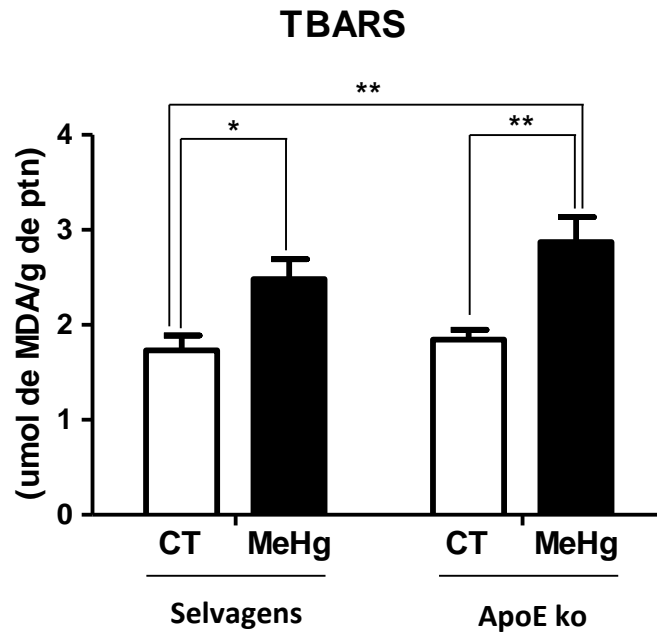
Figura 23. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de SOD no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Os camundongos C57BL6/J selvagens ($p < 0,05$) e ApoE ko ($p < 0,01$) não intoxicados com MeHg apresentaram significativamente menores concentrações de (TBARS) no tecido hepático quando comparados a seus respectivos grupos intoxicados com 20mg/L de MeHg. Os animais selvagens controles apresentaram significativamente menor concentração de TBARS no tecido hepático quando comparados ao grupo ApoE ko intoxicado por MeHg, $p < 0,01$ (Figura 24).

Figura 24. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de TBARS no tecido hepático de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

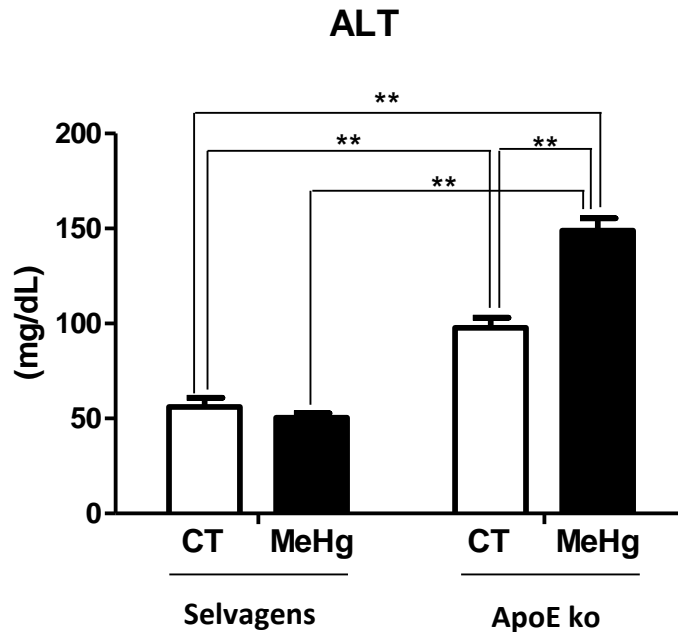


Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.7 Enzimas hepáticas

Os camundongos C57BL6/J selvagens não intoxicados apresentaram significativamente menores concentrações de alanina aminotransferase (ALT) quando comparados aos animais ApoE ko não intoxicados e ApoE ko intoxicados, $p < 0,01$. Os animais selvagens intoxicados apresentaram significativamente menores concentrações de ALT quando comparados aos animais ApoE ko intoxicados, $p < 0,05$. Camundongos ApoE ko não intoxicados apresentaram significativamente menores concentrações de ALT quando comparados aos animais ApoE ko intoxicados (Figura 25).

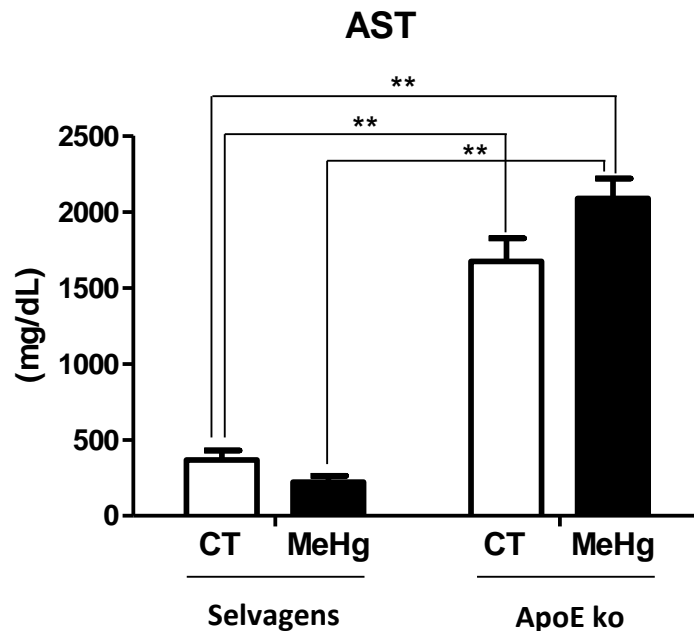
Figura 25. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de ALT no plasma de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Os camundongos C57BL6/J selvagens não intoxicados apresentaram significativamente menores concentrações da enzima aspartato aminotransferase (AST) quando comparados aos animais ApoE ko não intoxicados e ApoE ko intoxicados, $p < 0,01$. Os animais selvagens intoxicados apresentaram significativamente menores concentrações de AST quando comparados aos animais ApoE ko intoxicados, $p < 0,01$ (Figura 26).

Figura 26. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de AST no plasma de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

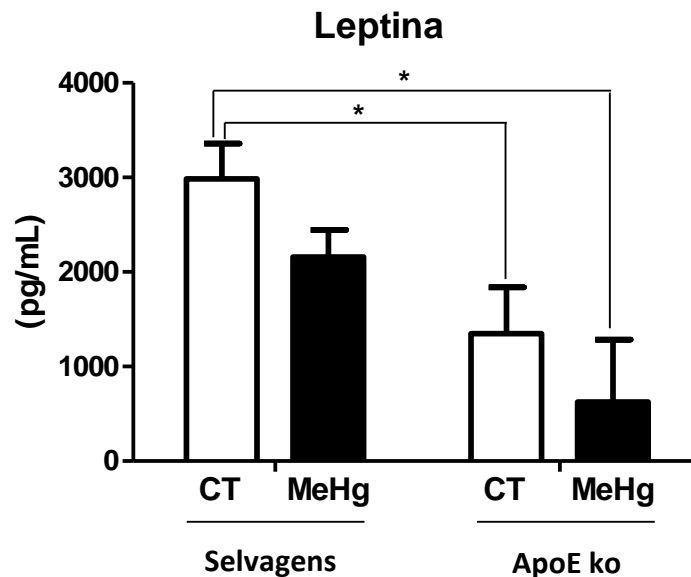


Os valores representam a média \pm EPM. ** $p < 0,01$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.9 Níveis de Leptina plasmática

Os camundongos C57BL6/J selvagens não intoxicados apresentaram significativamente maiores concentrações de leptina plasmática quando comparados aos ApoE ko não intoxicados e ApoE ko intoxicados com mercúrio. Não houve diferença estatística entre os grupos selvagem controle *versus* selvagem MeHg e ApoE ko controle *vs* ApoE ko intoxicado (Figura 27).

Figura 27. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias na concentração de leptina no plasma de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.

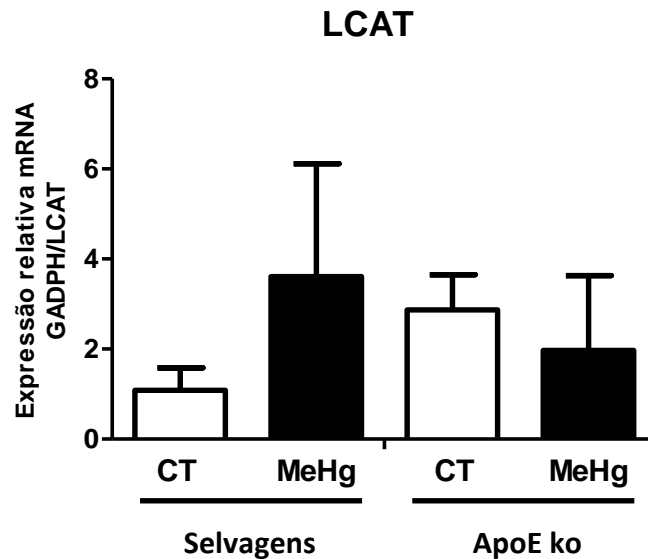


Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.10 Expressão gênica

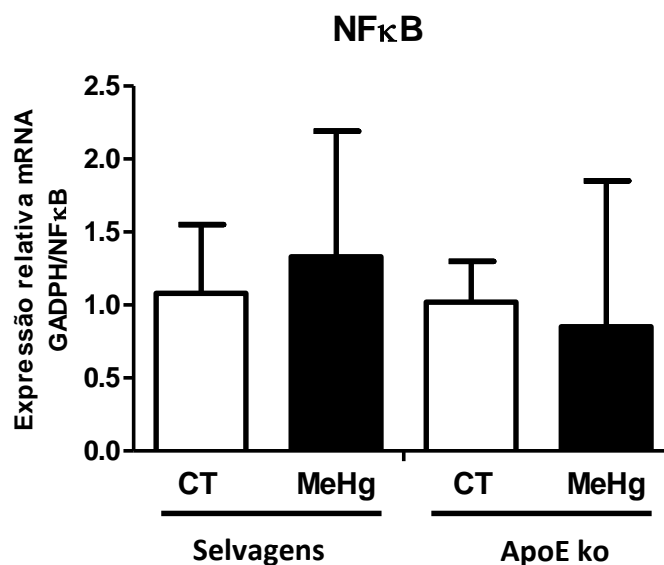
Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados quanto à expressão gênica de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), fator nuclear kappa B (NF κ B), hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR), apolipoproteína A1 (ApoA1), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) ou receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos selvagens ou APoE ko (Figuras 28 a 33).

Figura 28. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.



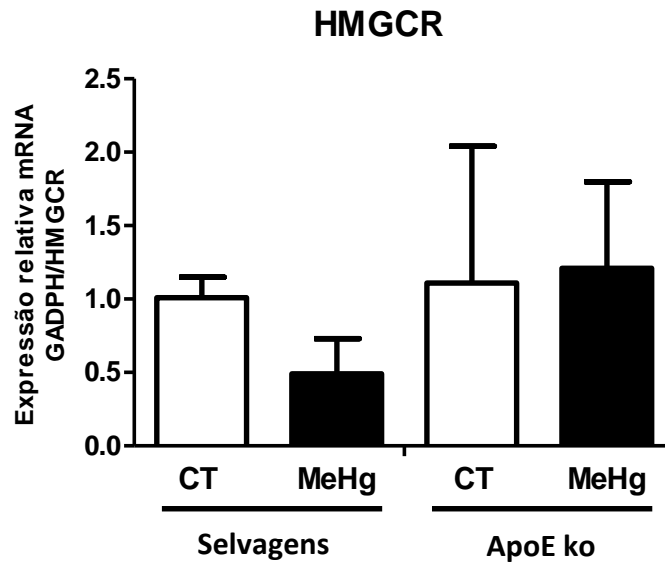
Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Figura 29. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica do fator nuclear kappa B (NF κ B) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.



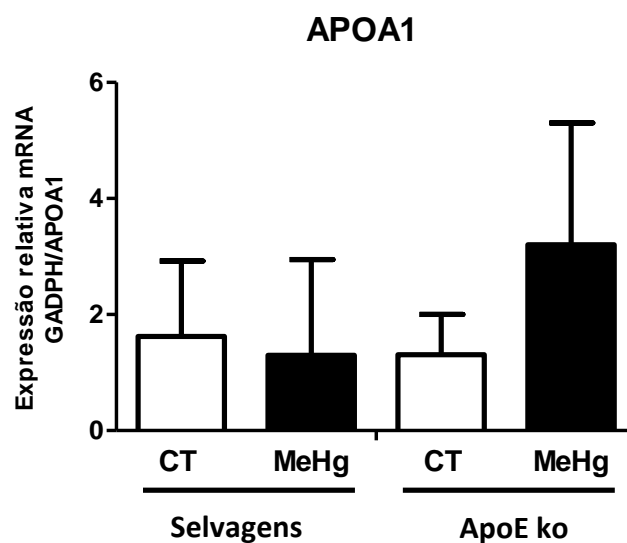
Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Figura 30. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica de hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGR) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.



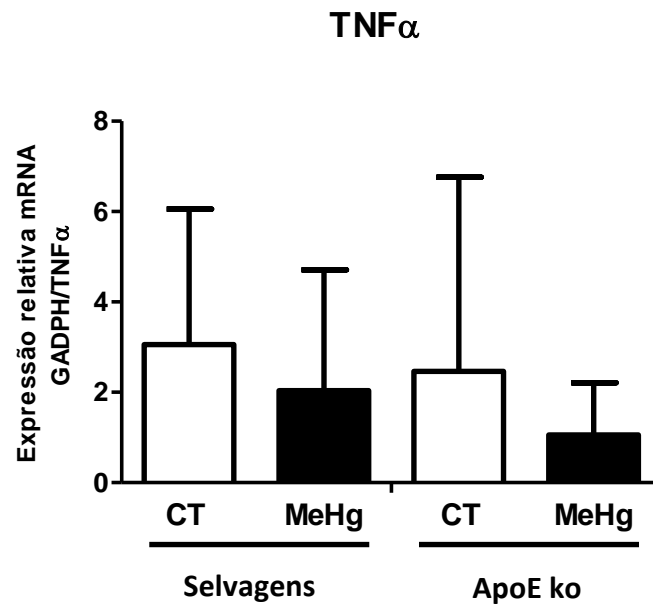
Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Figura 31. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica da apolipoproteína A1 (ApoA1) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.



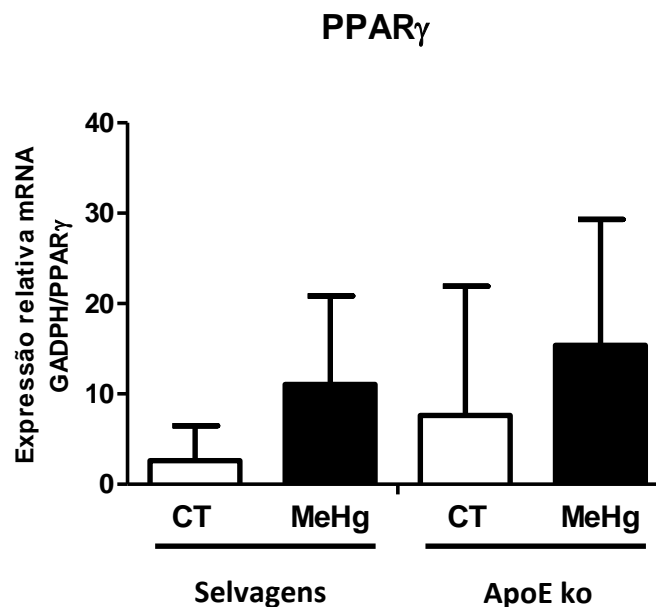
Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Figura 32. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.



Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Figura 33. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias na expressão gênica do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama ($PPAR\gamma$) no tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6J adultos.

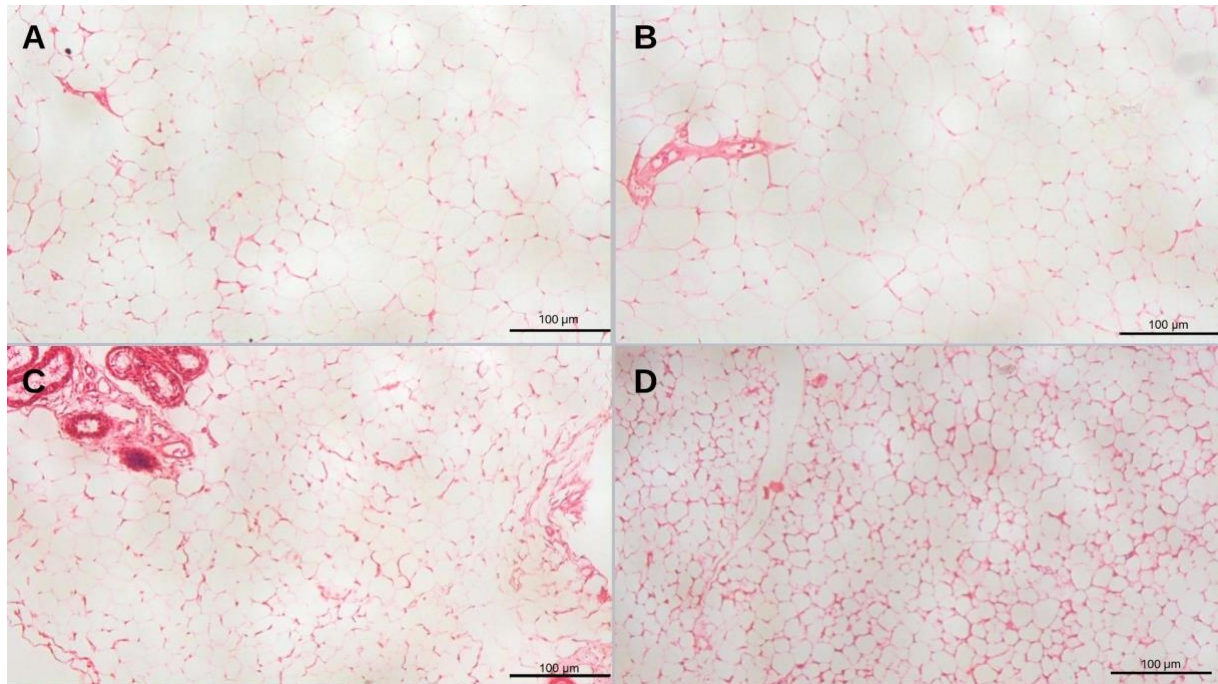


Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

5.11 Morfometria

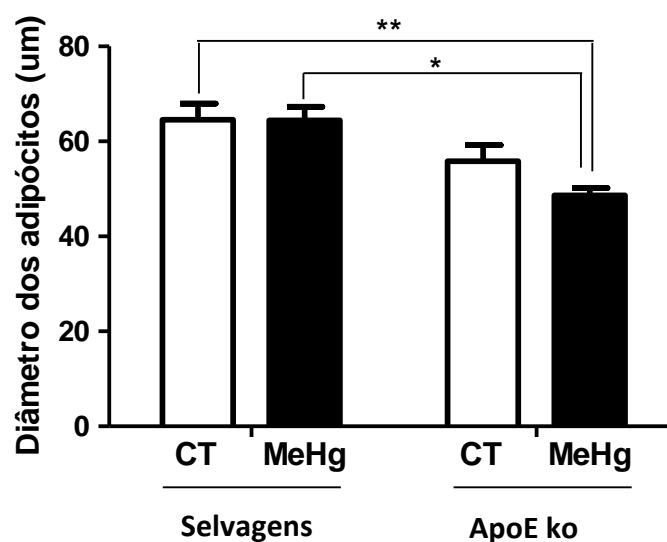
Não houve diferença significativa entre os animais C57BL6/J selvagens controles *versus* intoxicados com MeHg 20 mg/L ou ApoE ko controles *versus* ApoE ko intoxicados quanto ao diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo epididimário. Entretanto, os camundongos ApoE intoxicado apresentaram significativamente menor diâmetro das células adiposas quando comparados aos selvagens controles ($p < 0,01$) e selvagens intoxicados ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos ApoE ko controle e ApoE intoxicado com MeHg (Figura 34).

Figura 34. Efeito da administração oral de MeHg (20 mg/L) por 20 dias no diâmetro médio de adipócitos do tecido adiposo branco de camundongos C57BL6/J selvagens e ApoE ko adultos.



E

Morfometria do tecido adiposo



Painel da histologia do tecido adiposo branco (TAB) epididimário em camundongos experimentais. Fotomicrografias representativas do TAB epididimário de camundongos selvagens não intoxicados (**A**), selvagens intoxicados com MeHg 20mg/L (**B**), ApoE ko não intoxicados (**C**) e ApoE ko intoxicados com MeHg (**D**) são mostradas. Gráfico da medida de diâmetro médio de adipócitos dos grupos experimentais (**E**). Os valores representam a média \pm EPM. Teste two-way ANOVA, com correção por teste de Bonferroni.

Tabela 5. Efeito da administração oral de MeHg (20mg/L) por 20 dias em camundongos C57BL6J selvagens e ApoE ko.

Grupos de comparação	Efeito do MeHg	Efeito ApoE ko	Sinergismo MeHg / ApoE ko	Efeito do MeHg na DLP
	CT vs MeHg	CT vs ApoE ko	CT vs ApoE ko MeHg	ApoE ko vs ApoE ko MeHg
Delta de Peso (g)	↓	—	—	—
Tecido adiposo (g)	—	↓	—	—
Fígado (g)	—	—	—	↓
Triglicérides (mg/dl)	—	↑	↑	—
Colesterol (mg/dl)	—	↑	↑	↑
Esteatose hepática	—	—	↑	↑
Balonização	—	—	↑	—
Hidroperóxidos (μmol/g de ptn)	↓	—	—	↓
SOD (U de SOD/g de ptn)	↑	↓	—	↑
TBARS (μmol MDA/g de ptn)	↑	—	↑	↑
ALT (mg/dl)	—	↑	↑	↑
AST (mg/dl)	—	↑	↑	—
Leptina (pg/ml)	—	↓	↓	—
LCAT	—	—	—	—
APOA1	—	—	—	—
HMGCR	—	—	—	—
NFKκβ P-65	—	—	—	—
PPAR-γ	—	—	—	—
TNF-α	—	—	—	—
Adipócitos (diâmetro)	—	—	↓	—

6. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou a plasticidade do tecido adiposo epididimário de camundongos C57BL6/J adultos selvagens e ApoE ko sob o efeito da intoxicação por MeHg em dose elevada por um período de 20 dias. Avaliamos parâmetros metabólicos, como peso, níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol, grau de esteatose hepática, além de marcadores de estresse oxidativo no fígado e a estrutura e função do tecido adiposo epididimário dos animais. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que investigou nesses animais o impacto da intoxicação mercurial na plasticidade do tecido adiposo.

As análises desse estudo pretenderam responder às seguintes questões em relação aos tecidos adiposo e hepático: 1) Qual o efeito do metilmercúrio? 2) Qual o efeito da deleção do gene da ApoE? Há sinergismo entre a ação do metilmercúrio e a deleção de ApoE? Qual o efeito do metilmercúrio em indivíduos dislipidêmicos?

Neste estudo, o livre acesso à água contaminada permitiu maior semelhança com a variabilidade encontrada em seres humanos. Os grupos de animais expostos ao MeHg apresentaram concentrações significativamente maiores do metal no pelo do que os grupos não expostos, comprovando o modelo experimental. Segundo Silva e cols. (2020), a quantificação do mercúrio capilar de cada animal é o parâmetro de exposição mais fidedigno. Essa medida certifica a exposição, sendo mais confiável do que determinar a concentração de MeHg na água ou mesmo a ingestão individual, uma vez que abrange influências toxicocinéticas como a distribuição ou depuração do metal.

Nossos achados demonstram menor ganho de peso dos camundongos C57BL/6J intoxicados, quando comparados aos seus controles que não sofreram intoxicação. No estudo de Ferrer e cols. (2018), camundongos C57BL/6J com 8 semanas de idade foram expostos a doses menores de MeHg (0,5 ou 5 mg/L) na água potável e após 30 dias de exposição não apresentaram alterações no peso corporal. Entretanto, nesse estudo foi possível constatar que o MeHg afetou a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar e o peso corporal de maneira dose-dependente. Assim, o MeHg aumentou a expressão do neuropeptídeo anorexígeno pró-opiomelanocortina (POMC) de forma dose-

dependente, e não apresentou efeitos sobre a expressão do mRNA do peptídeo orexígeno relacionado ao Agouti (AGRP). Ferrer e cols. (2018) demonstraram que MeHg foi capaz de induzir alterações nos neuropeptídeos hipotalâmicos que regulam a homeostase energética, favorecendo um perfil anorexígeno/catabólico, o que apoia nosso achado de menor ganho de peso nos animais selvagens intoxicados.

Em humanos, Tatsuta e cols. (2017) investigaram os efeitos da exposição pré-natal ao metilmercúrio no peso ao nascer de 489 recém-nascidos japoneses. Os valores de mercúrio no sangue do cordão umbilical foram 10,1 (4,3 a 22,4) ng/g para mercúrio total e uma associação negativa entre os níveis de mercúrio com o peso ao nascer foi encontrada nos recém-nascidos do sexo masculino. Camsari e cols. (2019) demonstraram o impacto da exposição ao mercúrio no acúmulo de tecido adiposo em animais. Especificamente, a exposição materna periconcepcional ao MeHg (2 mg/kg) resultou em aumento da massa de tecido adiposo e peso corporal na prole com efeito transgeracional que persistiu até a quarta geração.

Tinkov e cols. (2021) propuseram que os efeitos da exposição a metais pesados no tecido adiposo são bifásicos, e podem variar desde o aumento da adipogênese na exposição crônica a baixas doses desses metais até a inibição da diferenciação do tecido adiposo em doses mais altas, devido aos potenciais efeitos tóxicos (incluindo efeitos pró-oxidantes). Nesse contexto, nosso estudo com doses elevadas de MeHg poderia ter provocado inibição da adipogênese e menor ganho de peso nos animais selvagens intoxicados com o metal.

No presente estudo, a deleção do gene da ApoE não levou a diferenças no ganho de peso, quando comparamos os grupos selvagem controle e ApoE ko controle. Também não houve sinergismo da intoxicação por MeHg e a deleção do gene da ApoE quando comparados os grupos selvagem controle e ApoE ko intoxicado. O efeito do MeHg sobre o peso dos animais dislipidêmicos (ApoE ko) não foi constatado, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos ApoE ko controle e ApoE ko intoxicado.

Nossos achados não mostraram diferenças relacionadas à intoxicação com MeHg nos pesos do tecido adiposo epididimário entre os grupos de animais selvagens e ApoE ko *versus* seus respectivos controles. Entretanto, constatamos menor peso da

gordura epididimária em animais ApoE ko controles, quando comparados aos controles selvagens.

Hofmann e cols. (2008) demonstraram menor adiposidade em camundongos ApoE ko e maior sensibilidade à insulina quando comparados aos camundongos sem deleção de ApoE desafiados com dieta rica em gordura e sacarose. Os autores relacionaram os achados ao transporte reduzido de lipídios para os tecidos sensíveis à insulina, melhorando a obesidade induzida pela dieta e a resistência à insulina nesses animais. Esses achados corroboram com nossos resultados de menor massa de tecido adiposo epididimário nos camundongos ApoE ko não intoxicados.

Em sua revisão, Li e Liu (2014) mencionam que a ApoE é altamente expressa no adipócito e tem relação positiva com a massa de gordura corporal. Assim, camundongos ApoE nocautes mostram menor massa de gordura em comparação com camundongos do tipo selvagem. Além disso, a deficiência de ApoE nas células adiposas compromete a internalização de lipoproteínas e acúmulo de triglicerídeos no tecido. As lipoproteínas deficientes em ApoE não são capazes de induzir o pré-adipócito a formar adipócitos redondos cheios de lipídios.

Bulka e cols. (2019) avaliaram como metais tóxicos estão transversalmente relacionados à Síndrome Metabólica (SM) utilizando dados de 2011 a 2014 da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (National Health and Nutrition Examination Survey – NHANES). Os autores caracterizaram as concentrações de metais na urina (arsênio, cádmio e mercúrio inorgânico/elementar), e no sangue (manganês, chumbo, metilmercúrio e selênio) e descobriram que níveis mais altos de biomarcadores de arsênio, mercúrio inorgânico/elementar, selênio e zinco estiveram transversalmente associados a um aumento da prevalência de síndrome metabólica.

Em nosso estudo, a intoxicação com MeHg não alterou os níveis plasmáticos de triglicerídeos nos animais selvagens ou ApoE ko quando comparados com seus controles. Entretanto, como esperado, a ausência de ApoE levou à hipertrigliceridemia nos grupos ApoE ko controle e ApoE ko intoxicado. O mesmo ocorreu no estudo de Silva e cols. (2020), na mesma concentração de MeHg e tempo de exposição semelhante ao nosso. Roque e cols. (2021) demonstraram que a intoxicação por MeHg 20mg/L por si induziu hipertrigliceridemia em animais selvagens, entretanto o efeito do metal foi potencializado nos camundongos APOE ko.

Os efeitos da exposição a longo prazo ao MeHg nos níveis de lipídios plasmáticos em roedores foram investigados por Moreira e cols. (2012), demonstrando que a exposição prolongada ao MeHg induziu dislipidemia em camundongos Swiss e C57BL/6 tratados por 21 dias com MeHg (40 mg/L) diluído na água de beber. Os animais apresentaram níveis plasmáticos de colesterol total e não-HDL aumentados. Com base na forte e graduada associação entre colesterol total e LDL e risco de doenças cardiovasculares, os autores apoiaram o conceito de toxicidade cardiovascular induzida por MeHg. Em nosso estudo, a intoxicação com MeHg (20 mg/L) não elevou os níveis de colesterol plasmático nos animais selvagens, quando comparados aos seus controles. Os animais ApoE ko apresentaram níveis significativamente elevados de colesterol, quando comparados aos selvagens e aqueles ApoE ko expostos ao MeHg demonstraram hipercolesterolemia ainda mais acentuada. Essa diferença nos resultados poderia ser justificada pela dose utilizada por Moreira e cols. (2012), que foi o dobro da concentração utilizada em nosso estudo.

A intoxicação por MeHg eleva o colesterol total no sangue devido ao aumento da fração aterogênica ou não-HDL, de acordo com Silva e cols. (2020). O MeHg parece se ligar a grupos sulfidríla presentes na principal apoproteína da fração não-HDL (apoB-100), o que pode induzir rearranjos conformacionais que comprometem a ligação com seus receptores (CLARKSON; MAGOS, 2006; RUTLEDGE; SU; ADELI, 2010). A menor captação de LDL contribuiria para o aumento adicional dos níveis séricos de colesterol total (SILVA et al., 2020).

Segundo Rizzeti e cols (2019), distúrbios no tecido adiposo epididimário possivelmente induzem um efeito lipotóxico com ativação de vias pró-apoptóticas, desequilíbrio entre os mecanismos de lipólise e lipogênese no tecido adiposo branco, com aumento da mobilização de ácidos graxos, redução da captação de glicose e diminuição dos níveis circulantes de insulina, levando a hiperglicemia e hiperlipidemia.

De acordo com resultados deste estudo e de anteriores (Roque et al., 2021), os efeitos a longo prazo da exposição ao MeHg podem ser mais danosos para indivíduos dislipidêmicos. Arrifano et al (2018a) propuseram um papel acentuador para ApoE na toxicidade do mercúrio. Além disso, dados mais recentes demonstraram que a intoxicação por MeHg piorou fatores de risco cardiovasculares e acelerou o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em animais ApoE ko (SILVA et al., 2020).

O esclarecimento dos efeitos da exposição ao Hg na função do tecido adiposo branco é importante para a compreensão das doenças metabólicas induzidas por Hg e um apropriado cálculo do risco deste metal (RIZZETTI et al., 2019). O impacto do MeHg na sinalização da leptina no hipotálamo ainda não é claro. Ferrer e cols. (2021) demonstraram que a exposição ao MeHg (5mg/L) por 30 dias favoreceu um perfil anorexígeno em camundongos C57BL/6J machos selvagens. A intoxicação foi associada a alterações na via de sinalização induzida pela leptina da Janus quinase 2 (JAK2)/transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) no hipotálamo.

Kawakami e cols. (2012) demonstraram que o tratamento com HgCl₂ diminuiu significativamente o nível de leptina sérica com regulação negativa da expressão de mRNA de leptina no tecido adiposo branco. No nosso estudo, os grupos intoxicados apresentaram tendência de menor concentração sérica de leptina quando comparados aos grupos não intoxicados, embora sem significância estatística.

Neste estudo, a ausência do gene da ApoE levou a menores níveis plasmáticos de leptina, quando comparado ao grupo selvagem controle. Parece ainda haver um sinergismo entre a ação do MeHg e a ausência de ApoE, com diferença estatística importante entre o grupo selvagem controle e o grupo ApoE ko exposto ao MeHg. Ainda há poucos estudos relacionando leptina, deleção do gene da ApoE e intoxicação com mercúrio, fato que limita nossa discussão em torno dos achados de outros autores.

O fígado é o órgão metabólico central que regula vários aspectos essenciais do metabolismo lipídico, incluindo oxidação de lipídios, lipogênese e captação e secreção de lipoproteínas, em resposta a estímulos nutricionais e hormonais (VAN DEN BERGHE, 1991). Em nosso estudo as enzimas hepáticas ALT e AST não sofreram alterações significativas com a exposição ao MeHg, sugerindo que mesmo com a intoxicação, não houve insulto metabólico capaz de causar hepatotoxicidade, corroborando dados de Brandão e cols. (2006), estudo no qual animais tratados com HgCl₂ (dose subcutânea de 4,6 mg/kg por três dias consecutivos) não apresentaram alterações nas atividades de aminotransferases.

Sivapandi e cols. (2020) avaliaram os dados de 95.398 indivíduos indianos e verificaram frequência de 0,6% de níveis elevados de Hg no sangue (> 5 mg/L), sem

diferença significativa entre os gêneros. Não foi encontrada associação entre níveis elevados de Hg no sangue e alterações de enzimas hepáticas entre as mulheres. No entanto, entre os homens, houve correlação significativa entre níveis elevados de Hg no sangue e aumento da AST e ALT. O estudo concluiu que para homens, mas não para mulheres, a exposição ao Hg pode ser um dos diferenciais na elevação de enzimas hepáticas.

Poursafa e cols. (2014) investigaram a diferença dos níveis séricos de chumbo (Pb) e Hg em 320 adolescentes iranianos com ou sem síndrome metabólica e a associação dos níveis séricos desses metais com fatores de risco cardiometabólicos e enzimas hepáticas. O aumento de Pb sérico foi associado ao aumento de fatores de risco cardiometabólicos e de ALT nos adolescentes, enquanto os níveis elevados de Hg associaram-se positivamente aos fatores metabólicos analisados, mas não às enzimas hepáticas.

Em nosso estudo, a ausência da ApoE causou elevação de ALT e AST, quando comparamos com animais selvagens não intoxicados. E um efeito potencializador ocorreu quando animais ApoE ko foram expostos ao MeHg, elevando ainda mais os níveis das enzimas, o que denota dano hepático ocasionado pelo MeHg diante da ausência de ApoE. Ao investigarmos o efeito do MeHg apenas em animais ApoE ko, comparando o grupo controle com o intoxicado, foi observado aumento de ALT, mas não de AST.

Bonomini e cols. (2013) investigaram como a inativação da ApoE acelera o processo de envelhecimento e causa doença hepática em camundongos. Os autores não avaliaram enzimas hepáticas, entretanto, fornecem evidências de que camundongos ApoE ko hipercolesterolêmicos são mais propensos a desenvolver lesão hepática grave, sugerindo que o aumento dos produtos de colesterol e o estresse oxidativo também podem desempenhar um papel na aceleração da progressão do envelhecimento no fígado.

Nossos achados não mostraram esteatose hepática ocasionada exclusivamente pelo MeHg, em contraste com os dados de Leocádio e cols. (2020), que usaram MeHg 20mg/L na água de beber de camundongos C57Bl/6 fêmeas por 2 semanas e detectaram esteatose não alcoólica no fígado. Leocádio e cols. (2020) demonstraram além do escore de esteatose não alcoólica no fígado, aumento da

contagem de células de Kupffer, indicando que a intoxicação por MeHg promoveu inflamação hepática. Grotto et al. (2011) também observaram resposta inflamatória hepática, com leucocitose significativa em infiltração no fígado de ratos que receberam MeHg. Ratos Wistar tratados com 5 mg/kg/dia de MeHg e 1 mg/kg/dia de difenil disseleneto, por via intragástrica por 21 dias, apresentaram aumento do acúmulo de Hg no fígado e no cérebro, levando a déficits motores e perda de peso corporal (DALLA CORTE et al., 2013).

Quando investigamos a influência do MeHg em animais ApoE ko constatamos esteatose hepática. De acordo com Roque e cols. (2021), o aumento do acúmulo de MeHg no fígado pode causar disfunção hepática e alteração dos lipídios plasmáticos circulantes, como demonstrado em seu estudo realizado com animais ApoE ko. Outros autores identificaram além de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, a esteatose hepática em animais ApoE ko em comparação com camundongos selvagens, porém sem intoxicação mercurial (STACHOWICZ et al., 2019).

O prejuízo no equilíbrio oxidativo foi reconhecido com exposição ao mercúrio em camundongos (FUJIMURA; USUKI, 2017). Diversos efeitos tóxicos do MeHg são causados pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e aumento do estresse oxidativo, mecanismo que vem sendo estudado em diferentes condições experimentais e tecidos (EOM et al., 2014).

Nosso estudo corrobora diversos outros que evidenciaram a elevação do estresse oxidativo em resposta à intoxicação com MeHg (AGRAWAL et al., 2014; ROSA-SILVA et al., 2020; ZHAO et al., 2020; ROQUE et al., 2021). Neste estudo detectamos aumento de TBARS com exposição ao MeHg, aumentando a peroxidação lipídica no fígado, independentemente da origem genética dos animais. O aumento nos níveis de TBARS foi ainda mais expressivo no grupo ApoE ko intoxicado, quando comparado com o grupo selvagem controle, indicando sinergismo na presença dessas duas condições.

Zhao e cols. (2020) demonstraram aumento significativo do conteúdo de malondialdeído (MDA) em camundongos intoxicados com HgCl_2 (160mg/L) em um período experimental de 3 dias. No estudo de Agrawal e cols. (2014), ratos machos foram expostos individualmente a arsenito de sódio, cloreto de mercúrio e acetato de chumbo (0,05 mg/kg cada, por via oral, 1x/dia) por 6 meses. A exposição aos três

metais ocasionou inibição significativa do nível de glutathiona, suportado pelo aumento da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O nível de inibição foi mais pronunciado pela exposição ao chumbo, seguido pelo mercúrio e arsênio. Os metais elevaram significativamente a atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS), substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona peroxidase (GPx).

Camundongos ApoE ko são dislipidêmicos mesmo no início da vida e já se sabe que a dislipidemia tem relação com o estresse oxidativo. Fuller e cols. (2020) demonstraram um papel causal das características cardiometabólicas no estresse oxidativo e identificaram a hiperlipidemia como um dos principais fatores do estresse oxidativo em animais ApoE ko. Estudos observacionais mostraram que alterações no metabolismo dos lipídios estão relacionadas ao desequilíbrio oxidativo (KARABACAK et al., 2014; SWARDFAGER et al., 2017) e que indivíduos com hipertrigliceridemia ou baixos níveis de HDL apresentam um status pró-oxidante (RAHMAN et al., 2017).

Também constatamos aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) nos grupos intoxicados quando comparados aos controles. Os resultados de Rosa-Silva e cols. (2020) revelaram que o MeHg (0,5 mg/kg/dia) por cerca de 40 dias aumentou significativamente a atividade da SOD, glutathiona transferase, glutathiona e carbonila. Outros autores demonstraram redução de SOD em seus trabalhos, como Zhao e cols. (2020), que utilizaram animais com mais idade que os nossos, intoxicados com HgCl₂.

A SOD desempenha um papel importante, pois converte superóxidos em sua forma menos reativa (H₂O₂) e sua atividade ótima é fundamental para a preservação da função do sistema antioxidante (KUMAR et al., 2020). Indivíduos com atividade de SOD reduzida apresentam maiores chances de sofrer acidente vascular cerebral (AVC) por estresse oxidativo, resultando no desenvolvimento de várias doenças metabólicas, como hipertensão, hipercolesterolemia, aterosclerose, diabetes, insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares. Por outro lado, o aumento da atividade da SOD pode ocorrer com o objetivo de neutralizar o excesso de radicais livres, como uma tentativa de proteção aos órgãos contra danos (KUMAR et al., 2020).

Em nosso estudo, a intoxicação por MeHg (20mg/L por 20 dias) não ocasionou alterações na expressão gênica de LCAT, NFκB, HMGCR, ApoA1, TNFα ou PPARγ no tecido adiposo epididimário dos camundongos selvagens ou ApoE ko. Rizzetti e

cols. (2019) demonstraram que a intoxicação mercurial (4,6µg/kg, com dose subsequente de 0,07µg/kg/dia) por 60 dias aumentou a expressão do mRNA de PPAR γ , leptina e adiponectina, mesmo sem concentração de Hg alterada no tecido adiposo de ratos Wistar. Enquanto Kawakami e cols. (2012) demonstraram que a exposição ao mercúrio inorgânico em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica reduziu significativamente a expressão de mRNA de leptina específica de TAB, PPAR α e PPAR γ . As diferenças no tempo de intoxicação entre os estudos podem ser responsáveis pelas divergências na expressão gênica desses fatores.

Nossos resultados não mostraram redução no tamanho dos adipócitos com a ação isolada do MeHg ou deleção da ApoE. Entretanto, demonstramos um efeito sinérgico na diminuição no diâmetro dos adipócitos de animais ApoE ko intoxicados com MeHg. Rizzetti e cols. (2019) demonstraram redução dos pesos absolutos e relativos do tecido adiposo epididimário e tamanho dos adipócitos com intoxicação mercurial mais longa e em baixas doses. Kawakami e cols. (2012) também demonstraram diminuição induzida por mercúrio no tamanho de adipócitos em camundongos machos alimentados com dieta rica em gordura injetados subcutaneamente com 1,0 mg/kg de peso corporal de HgCl₂.

Rizzetti et al. (2019) demonstraram que o cloreto de mercúrio (HgCl₂) foi considerado um poderoso disruptor ambiental de TAB, capaz de reduzir o tamanho dos adipócitos e aumentar a expressão de mRNA de adiponectina, leptina, PPAR α e PPAR γ , indicando prejuízos na adipogênese e secreção de adipocinas. Esse estudo sugere que as mudanças na plasticidade do TAB através da redução no tamanho dos adipócitos estão relacionadas ao aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e mudanças nas expressões de mRNA de PPARs e adipocinas induzidas pelo metal. No nosso estudo, apesar de não termos encontrado mudanças na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico ou inflamação, detectamos aumento do estresse oxidativo e perturbação dos níveis de leptina diante da intoxicação com MeHg.

Huang e cols. (2009) avaliaram o impacto da ApoE de adipócitos produzida endogenamente sobre o tamanho das células adiposas. O tecido adiposo de camundongos selvagens ou ApoE ko foi transplantado em receptores selvagens, que foram então alimentados com ração padrão ou dieta rica em gordura por 8 a 10 semanas. Após uma dieta com ração padrão, os adipócitos ApoE ko transplantados

foram significativamente menores do que os adipócitos selvagens transplantados. Após dieta rica em gordura e consequente aumento nos níveis circulantes de lipídios, o tamanho dos adipócitos selvagens transplantados aumentou em $106 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, enquanto o tamanho dos adipócitos ApoE ko aumentou apenas $19 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

Uma limitação do nosso estudo são os altos níveis de MeHg no pelo dos camundongos em comparação com populações humanas, no entanto, é preciso destacar que graves desastres ambientais têm aumentado no mundo (RAPOSO et al., 2020), o que pode causar níveis alarmantes de contaminação de Hg nos reservatórios de água para as comunidades adjacentes.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a intoxicação mercurial afetou a estrutura e função do tecido adiposo e causou alterações hepáticas, o que pode aumentar o risco para doenças cardiovasculares em populações mais vulneráveis. Em conjunto, evidenciamos que:

- A intoxicação com MeHg reduziu ganho de peso de animais selvagens intoxicados com MeHg quando comparados aos seus controles.
- O peso médio do tecido adiposo epididimário e os níveis plasmáticos de leptina foram menores nos animais ApoE ko controles e intoxicados, quando comparados aos selvagens controles.
- Os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total foram mais elevados nos animais ApoE ko com ou sem intoxicação mercurial. Os níveis de colesterol total foram mais elevados em ApoE ko intoxicados quando comparados com ApoE ko controles.
- O peso médio do fígado foi maior no grupo ApoE ko intoxicado quando comparado ao grupo controle selvagem.
- Esteatose hepática foi detectada em animais ApoE ko intoxicados quando comparados aos selvagens controles e foi aumentada em animais ApoE ko intoxicados em comparação com ApoE ko controles.
- Os animais intoxicados apresentaram níveis de TBARS mais elevados independente da presença ou não da ApoE. Os níveis de SOD foram significativamente maiores nos animais selvagens e ApoE ko intoxicados quando comparados aos seus respectivos controles.
- Os níveis plasmáticos de ALT e AST foram maiores nos animais ApoE ko independente da intoxicação mercurial.
- O diâmetro médio dos adipócitos foi menor em ApoE ko controles e intoxicados, quando comparados aos animais selvagens.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL S, FLORA G, BHATNAGAR P, FLORA SJ. Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. **Cell Mol Biol.**, v 60, n. 2, p.13-21, 2014

ALEIDI, S.; ISSA, A.; BUSTANJI, H.; KHALIL, M.; BUSTANJI, Y. Adiponectin serum levels correlate with insulin resistance in type 2 diabetic patients. **Saudi Pharm. Soc.** v.23, p.250–256, 2015.

ALMEIDA I. M., DE JACKSON FILHO J. M., DE VILELA R. Reasons for investigating the organizational dynamics of the Vale tailings dam disaster in Brumadinho, Minas Gerais State, Brazil. **Canad. Saúde Publica**, 2019.

ANDERSEN, H. R., ANDERSEN, O. Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. **Pharmacology & toxicology**, v.73, n. 4, p. 192–201,1993.

AQUILA H, LINK TA, KLINGENBERG M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier - Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. **EMBO J.** v. 4, n.9, p.2369–76, 1985.

ARRIFANO, G. D. P. F., DE OLIVEIRA, M. A., SOUZA-MONTEIRO, J. R., PARAENSE, R. O., RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. et al. Role for apolipoprotein E in neurodegeneration and mercury intoxication. **Front. Biosci**, v.10, p.229-241, 2018a.

ARRIFANO GPF, MARTÍN-DOIMEADIOS RCR, JIMÉNEZ-MORENO M, et al. Genetic Susceptibility to Neurodegeneration in Amazon: Apolipoprotein E Genotyping in Vulnerable Populations Exposed to Mercury. **Front Genet.**, v. 27, n. 9, p. 285, 2018b.

ASRANI SK, DEVARBHAVI H, EATON J, KAMATH PS. Burden of liver diseases in the world. **J Hepatol.** v.70, n.1, p.151–171, 2019.

AZEVEDO BF et al. Toxic effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems. **J Biomed Biotechnol.** V. 2012, 2012.

BANERJEE, D., KUMAR, A. P., KUMAR, B., MADHUSOODANAN, U. K., NAYAK, S., JACOB, J. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. **Current Science**, v. 83, p. 1193–1194, 2002.

BERRYMAN, D. E; LIST, E. O. Groselvagensh Hormone's Effect on Adipose Tissue: Quality versus Quantity. **Int J Mol Sci.**, v.18, n 8, p.1621, 2017.

BERNHOF, R.A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. **J Environ Public Health.** 2012.

BLÜHER M. Clinical relevance of adipokines. **Diabetes Metab J.** v.36, n. 5, p.317-327, 2012.

BONOMINI, F., RODELLA, L. F., MOGHADASIAN, M., LONATI, C., REZZANI, R. Apolipoprotein E deficiency and a mouse model of accelerated liver aging. **Biogerontology**, v.14, n. 2, p. 209–220, 2013.

BOSY-WESTPHAL, A., MÜLLER, M. J. Diagnosis of obesity based on body composition-associated health risks-Time for a change in paradigm. **Obesity reviews**, v. 22 , Suppl 2, 2021.

BRANDÃO, R., SANTOS, F. W., FARINA, M., ZENI, G., BOHRER, D., ROCHA, J. B., NOGUEIRA, C. W. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. **Cell biology and toxicology**, v. 22, n. 6, p. 429–438, 2006.

BRAUN K, OECKL J, WESTERMEIER J, et al.: Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. **J Exp Biol.**, v. 221, 2018.

BULKA CM, PERSKY VW, DAVIGLUS ML, DURAZO-ARVIZU RA, ARGOS M. Multiple metal exposures and metabolic syndrome: A cross-sectional analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey 2011-2014. **Environ Res.** v.168, p. 397-405, 2019.

BYRNE CD, TARGHER G. NAFLD: a multisystem disease. **J Hepatol.** v.62, n.1 Suppl S47-S64, 2015.

CAMSARI C, FOLGER JK, RAJPUT SK, et al.: Transgenerational Effects of Periconception Heavy Metal Administration on Adipose Weight and Glucose Homeostasis in Mice at Maturity. **Toxicol Sci.**, v.168, n. 2, p. 610–9, 2019.

CAPEAU J. The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: To follow. **J. Hepatol.**, v. 47, p. 736-738, 2007.

CARICCIO VL, SAMÀ A, BRAMANTI P, MAZZON E. Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases. **Biol Trace Elem Res.** v.187, n.2, p.341-356, 2019.

CAROCCI A, ROVITO N, SINICROPI MS, GENCHI G. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. **Rev Environ Contam Toxicol.** v. 229, p.1-18, 2014.

CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology.** v.67, n.1, p.328-357, 2018.

CHAN TY. Inorganic mercury poisoning associated with skin-lightening cosmetic products. **Clin Toxicol.** v.49, n.10, p.886-891, 2011.

CHOE SS, HUH JY, HWANG IJ, et al.: Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol.**, v. 7, n. 30, 2016.

CHOU CY et al. Structural Variation in Human Apolipoprotein E3 and E4: Secondary Structure, Tertiary Structure, and Size Distribution. **Biophysical Journal**, v.8, n.1, 2005.

- CHOUCHANI et al., New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. **Cell Metabolism**. v.29, n.1, p.7-37, 2019.
- CHUSYD DE, WANG D, HUFFMAN DM, NAGY TR. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr*. v. 3, n.10, 2016.
- CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**. v.73, p. 9–15, 2005.
- CINTI S. The adipose organ at a glance. **Dis Model Mech**. v.5, n.5, p.588-594, 2012.
- CINTI S. Adipose organ development and remodeling. **Compr Physiol**. v.8, n.4, p.1357–431, 2018.
- CLARKSON TW, MAGOS L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol.**, v. 36, n. 8, p. 609-662, 2006.
- COOPER A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **Journal of lipid research**, v. 38, n. 11, p. 2173–2192, 1997.
- CORRÊA, L. H., HEYN, G. S., MAGALHAES, K. G. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 662, 2019.
- CRESPO-LÓPEZ, M.E., HERCULANO, A.M., CORVELO, T.C., DO Nascimento, J.L. Mercury and neurotoxicity. **Rev. Neurol**. v.40, n.7, p. 441–447, 2005.
- CRESPO-LÓPEZ, M.E., MACEDO, G.L., PEREIRA, S.I., ARRIFANO, G.P., PICANCO-DINIZ, D.L., DO NASCIMENTO, J.L., HERCULANO, A.M. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacol. Res**. v.60, n.4, p.212–20, 2009.
- CRESPO-LÓPEZ ME, AUGUSTO-OLIVEIRA M, LOPES-ARAÚJO A, et al. Mercury: What can we learn from the Amazon? **environ int**. v.146, n.106223, 2021.
- CORDEIRO, A., COSTA, R., ANDRADE, N., SILVA, C., CANABRAVA, N., PENA, M. J., RAMALHO, A. Does adipose tissue inflammation drive the development of non-alcoholic fatty liver disease in obesity?. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 44, n. 4, p. 394-402, 2020.
- COSTA-JUNIOR JMF et al. Levels of mercury found in hair and consumption of riverine communities in the Tapajós region of the Brazilian Amazon. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.23, n.3, p.805-812, 2018.
- COTRIM, H. P., PARISE, E. R., FIGUEIREDO-MENDES, C., GALIZZI-FILHO, J., PORTA, G., OLIVEIRA, C. P. Nonalcoholic fatty liver disease brazilian society of hepatology consensus. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 2, p. 118–122, 2016.

DALLA CORTE, C. L., RAMOS, A., DOS SANTOS, C. M. M., DRESSLER, V. L., DA ROCHA, J. B. T. Selenium and mercury levels in rat liver slices co-treated with diphenyl diselenide and methylmercury. **Biometals**, v. 29, n. 3, p. 543-550, 2016.

DAVILA R. B., FONTES M. P. F., PACHECO A. A., DA FERREIRA M. S. Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. **Sci. Total Environ.** v.709, n.136151, 2020.

DIETERICH S, BIELIGK U, BEULICH K, HASENFUSS G, PRESTLE J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, p. 33–39, 2000.

DÍEZ-GIL C et al. Nanocomposite membranes as highly selective and sensitive mercury(ii) detectors. **Journal of Materials Chemistry**. 2008.

DONNELLY, K. L., SMITH, C. I., SCHWARZENBERG, S. J., JESSURUN, J., BOLDT, M. D., & PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343 - 351, 2005.

DREVNICK V, LAMBORG C, HORGAN M. Increase in mercury in Pacific yellowfin tuna. **Environmental Toxicology**. 2015.

DULAI PS, SINGH S, PATEL J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. **Hepatology**. v.65, n.5, p.1557-1565, 2017.

EASL (European Association for the Study of the Liver). European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**. v.64, n.6, p.1388-1402, 2016.

EGGER AE, GRABMANN G, GOLLMANN-TEPEKOYLU C, PECHRIGGL EJ, ARTNER C, TURKCAN A, et al. Chemical imaging and assessment of cadmium distribution in the human body. **Metallomics**. v.11, v.2010, 2019.

EGUSQUIZA RJ, BLUMBERG B: Environmental Obesogens and Their Impact on Susceptibility to Obesity: New Mechanisms and Chemicals. **Endocrinology**., v. 161, n. 3, 2020.

EISENBERG, D.T.; KUZAWA, C.W.; HAYES, M.G. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: Climate, local adaptations, and evolutionary history. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v.143, p. 100–111, 2010.

ELIMAM A, MARCUS C. Meal timing, fasting and glucocorticoids interplay in serum leptin concentrations and diurnal pro le. **Eur J Endocrinol**. v.147, n.2, p.181–8, 2002.

EOM, S.Y., CHOI, S.H., AHN, S.J., et al. Reference levels of blood mercury and association with metabolic syndrome in Korean adults. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**., v. 87, p. 501–513, 2014.

FARMER S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metab.**, v. 4, p. 263–273, 2006.

FASSHAUER M, BLÜHER M. Adipokines in health and disease. **Trends Pharmacol Sci.** v.36, n.7, p.461-470, 2015.

FERNANDEZ CG, HAMBY ME, MCREYNOLDS ML, RAY WJ. The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease. **Front Aging Neurosci.** v. 11, p. 11:14, 2019.

FERRER B, PERES TV, DOS SANTOS AA, et al. Methylmercury Affects the Expression of Hypothalamic Neuropeptides That Control Body Weight in C57BL/6J Mice. **Toxicol Sci.**, v.163, n. 2, p. 557-568, 2018.

FERRER B, PRINCE LM, TINKOV AA, et al. Chronic exposure to methylmercury enhances the anorexigenic effects of leptin in C57BL/6J male mice. **Food Chem Toxicol.**, v.147, n. 111924, 2021.

FRANCIS CE, ALLEE L, NGUYEN H, GRINDSTAFF RD, MILLER CN, RAYALAM S. Endocrine disrupting chemicals: Friend or foe to brown and beige adipose tissue? **Toxicology.** v.463, n.152972, 2021.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 449–457, 2009.

FRAYN KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. **Diabetologia**, v. 45, p. 1201–1210, 2002.

FREIRE C, VRHOVNIK P, FIKET Z, SALCEDO-BELLIDO I, ECHEVERRIA R, MARTIN-OLMEDO P, et al. Adipose tissue concentrations of arsenic, nickel, lead, tin, and titanium in adults from gramo cohort in southern Spain: An exploratory study. **Sci Total Environ.** v.719, n.137458, 2020.

FREITAS JS, LACERDA EMCB, RODRIGUES JÚNIOR D, et al. Mercury exposure of children living in Amazonian villages: influence of geographical location where they lived during prenatal and postnatal development. **An Acad Bras Cienc.** v.91, n. suppl 1, 2019.

FRIED SK, RICCI MR, RUSSELL CD, LAFERRÈ RE B. Regulation of Leptin Production in Humans. **J Nutr.** v.130, p.3127S–31S, 2000.

FRIEDMAN JM. Leptin and the endocrine control of energy balance. **Nat Metab.** v.1, n.8, p.754–64, 2019.

FRONTINI A, CINTI S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. **Cell Metab.** v.11, p.253–256, 2010

FUJIMURA, M., USUKI, F. In situ different antioxidative systems contribute to the site-specific methylmercury neurotoxicity in mice. **Toxicology**, v. 392, n. 55-63, 2017.

FUNCKE JB, SCHERER PE. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. **J Lipid Res**. v.60, n.10, p.1648, 2019.

GALE, SUSAN M.; CASTRACANE, V. DANIEL; MANTZOROS, CHRISTOS S. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 2, p. 295-298, 2004.

GESTA S, TSENG YH, KAHN CR, Developmental origin of fat: tracking obesity to its source, **Cell**, v. 131, p. 242-256, 2007.

GIANG A, SELIN NE. Benefits of mercury controls for the United States. **Proc Natl Acad Sci**. v.113, n.2, p.286-291, 2016.

GONZÁLEZ-CASANOVA, J. E., PERTUZ-CRUZ, S. L., CAICEDO-ORTEGA, N. H., ROJAS-GOMEZ, D. M. Adipogenesis Regulation and Endocrine Disruptors: Emerging Insights in Obesity. **BioMed research international**, 2020.

GREENBERG AS, EGAN JJ, WEK SA, GARTY NB, BLANCHETTE-MACKIE EJ, LONDOS C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 17, p. 11341–11346, 1991.

GROTTO, D., VICENTINI, J., ANGELI, J. P., LATORRACA, E. F., MONTEIRO, P. A., BARCELOS, G. R., SOMACAL, S., EMANUELLI, T., BARBOSA, F., JR. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. **Ecotoxicology and environmental safety**, 74(3), 487-493, 2011.

GUÉDRON S, AMOUROUX D, TESSIER E, et al. Mercury Isotopic Fractionation during Pedogenesis in a Tropical Forest Soil Catena (French Guiana): Deciphering the Impact of Historical Gold Mining. **Environ Sci Technol**. v.52, n.20, p.11573-11582, 2018.

HATJE V., PEDREIRA R. M. A., DE REZENDE C. E., SCHETTINI C. A. F., DE SOUZA G. C., MARIN D. C., et al. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Sci. Rep**. v.7, n.10706, 2017.

HE, K., XUN, P., LIU, K., MORRIS, S., REIS, J., GUALLAR, E., 2013. Mercury exposure in young adulthood and incidence of diabetes later in life: the CARDIA Trace Element Study. **Diabetes Care**, v. 36, p. 1584–1589.

HEEREN, J.; BEISIEGEL, U.; GREWAL, T. Apolipoprotein E recycling: Implications for dyslipidemia and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.**, v. 26, p. 442–448, 2006.

HELKIN, A., STEIN, J. J., LIN, S., SIDDIQUI, S., MAIER, K. G., & GAHTAN, V. Dyslipidemia Part 1--Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. **Vascular and endovascular surgery**, v. 50, n. 2, p. 107–118, 2016.

HOFMANN SM, PEREZ-TILVE D, GREER TM, COBURN BA, GRANT E, BASFORD JE, TSCHÖP MH, HUI DY. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. **Diabetes.**, v.57, n.1, p.5-12, 2008.

HUBE, F., LIETZ, U., IGEL, M., JENSEN, P. B., TORNQVIST, H., JOOST, H. G., HAUNER, H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. **Hormone and metabolic research**, v. 28, n.12, p. 690-693,1996.

HUANG, Y., & MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. **Neurobiology of disease**, v. 72, p. 3-12, 2014.

HUDELSON KE et al. Mercury methylation and demethylation potentials in arctic lake sediments. **Chemosphere**. v. 248, n.126001, 2020.

JAMES AK, NEHZATI S, DOLGOVA NV, et al. Rethinking the Minamata Tragedy: What Mercury Species Was Really Responsible? *Environ Sci Technol*. v.54, n.5, p. 2726-2733.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Methylmercury**. In: Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food, 2004.

JIN, L., ZHANG, S., BURGUERA, B. G., COUCE, M. E., OSAMURA, R. Y., KULIG, E., LLOYD, R. V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. **Endocrinology**, v. 141, n. 1, p. 333-339, 2000.

JOHNSON-ARBOR; TEFERA; FARRELL. Characteristics and treatment of elemental mercury intoxication: A case series. **Health Science Report**. 2021.

KARABACAK M, VAROL E, KAHRAMAN F, OZAYDIN M, TURKDOGAN AK, ERSOY IH. Low high-density lipoprotein cholesterol is characterized by elevated oxidative stress, **Angiology**, v. 65, p. 927– 31, 2014.

KAWAKAMI, T., HANAO, N., NISHIYAMA, K., KADOTA, Y., INOUE, M., SATO, M., SUZUKI, S. Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 258, n.1, p. 32-42, 2012.

KERSTEN S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 919–933, 2014.

KIM Y, HA EH, PARK H, et al. Prenatal mercury exposure, fish intake and neurocognitive development during first three years of life: Prospective cohort mothers and Children's environmental health (MOCEH) study. **Sci Total Environ**. v.615, p.1192-1198, 2018.

KIM, H., HWANG, E., PARK, J., HEO, S. W., YIM, Y. H., LIM, Y., et al. Proficiency testing for total mercury in oyster with a metrologically traceable reference value from isotope dilution mass spectrometry: implications on laboratory practices using mercury analyzers. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 24, n. 4, p. 253-261, 2019.

KITA, S., MAEDA, N., SHIMOMURA, I. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 10, p. 4041–4049, 2019.

KHORAMIPOUR, K.; CHAMARI, K.; HEKMATIKAR, A.; ZIYAIYAN, A.; TAHERKHANI, S.; ELGUINDY, N.; BRAGAZZI, N. Adiponectin: Structure, Physiological Functions, Role in Diseases, and Effects of Nutrition. **Nutrients**, v.13, n. 1180, 2021.

KLEINER, D. E., BRUNT, E. M., VAN NATTA et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 2005.

KOLIAKI C, SZENDROEDI J, KAUL K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. **Cell Metab.**, v.21, n. 5, p. 739-746, 2015.

KOŘÍNKOVÁ, L., PRAŽIENKOVÁ, V., ČERNÁ, L., KARNOŠOVÁ, A., ŽELEZNÁ, B., KUNEŠ, J., & MALETÍNSKÁ, L. Pathophysiology of NAFLD and NASH in Experimental Models: The Role of Food Intake Regulating Peptides. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, 2020.

KUMAR, A., PANDEY, R., & SHARMA, B. Modulation of superoxide dismutase activity by mercury, lead, and arsenic. **Biological trace element research**, v. 196, n. 2, p. 654-661, 2020.

KURIYAMA H, SHIMOMURA I, KISHIDA K, et al. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2915–2921, 2002.

KWOK KHM, LAM KSL, XU A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Experimental & Molecular Medicine**. v.48, n. 215, 2016.

LEE MJ, et al. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.292, n.3, p. 858–64, 2007.

LEE, B.K., KIM, Y. Blood cadmium, mercury, and lead and metabolic syndrome in South Korea: 2005-2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. **Am. J. Ind. Med.**, v. 56, p. 682–692, 2013.

LEOCÁDIO, P. C. L., DIAS, R. P., PINTO, D. V., REIS, J. M., et al. Pollutants and nutrition: Are methylmercury effects on blood pressure and lipoprotein profile

comparable to high-fat diet in mice? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, n. 111036, 2020.

LI F, MA C, ZHANG P. Mercury Deposition, Climate Change and Anthropogenic Activities: A Review. **Front. Earth Sci.**, 2020.

LI YH, LIU L. Apolipoprotein E synthesized by adipocyte and apolipoprotein E carried on lipoproteins modulate adipocyte triglyceride content. **Lipids Health Dis.**, v.13, p.136., 2014.

LIU, C.C.; LIU, C.C.; KANEKIYO, T.; XU, H.; BU, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 9, p. 106–118, 2013.

LIMA LM; CARVALHO M; SOUSA MO. Apo B/apo A-I ratio and cardiovascular risk prediction. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 6, p. 187-90, 2007.

LIU L, SHI Z, JI X, et al. Adipokines, adiposity, and atherosclerosis. **Cell Mol Life Sci.** v.79, n.5, p.272, 2022.

LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LONGO M, ZATTERALE F, NADERI J, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. **Int J Mol Sci.** v.20, n.9, p.2358, 2019.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LU, M., LAWRENCE, D.A., MARSTERS, S., et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. **Science**, v. 345, p. 98–101, 2014.

LUO, L., LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. *The Journal of endocrinology*, v. 231, n. 3, p. 77–99, 2016.

LUO H, CHENG Q, PAN X. Photochemical behaviors of mercury (Hg) species in aquatic systems: A systematic review on reaction process, mechanism, and influencing factor. **Sci Total Environ.** v.720, n.137540, 2020.

MAHLEY, R. W., et al. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. **Journal of lipid research**, v. 50, p.183–188, 2009.

MAHLEY RW; HUANG Y. Apolipoprotein e sets the stage: response to injury triggers neuropathology. **Neuron**, v. 76, n. 5, p. 871-85, 2012.

MANDAL, P.; PRITCHARD, M.T.; NAGY, L.E. Anti-inflammatory pathways and alcoholic liver disease: Role of an adiponectin/interleukin-10/heme oxygenase-1 pathway. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, p. 1330–1336, 2010.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ AB, TORRES-PEREZ E, DEVANNEY N, DEL MORAL R, JOHNSON LA, ARBONES-MAINAR JM. Beyond the CNS: The many peripheral roles of APOE. **Neurobiol Dis.** v. 138, 2020.

MOREIRA EL, OLIVEIRA J, DUTRA MF et al. Does Methylmercury-Induced Hypercholesterolemia Play a Causal Role in Its Neurotoxicity and Cardiovascular Disease? **Toxicological Sciences.**, v. 130, n. 2, p. 373–382, 2012.

MUNZBERG H, MORRISON CD. Structure, Production and Signaling of Leptin. **Metabolism.** v.64, p.13–23, 2015.

NAKAMURA M, HACHIYA N, MURATA KY, et al. Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. **Environ Int.** v.68, p.25-32. 2014.

NIELSEN TS, JESSEN N, JORGENSEN JOL, MOLLER N, LUND S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 52, n. 3, p. 199–222, 2014.

NIERENBERG DW, NORDGREN RE, CHANG MB, et al. Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. **N Engl J Med.** v.338, n.23, p.1672-1676, 1998.

NGUYEN HD, Kim MS. Cadmium, lead, and mercury mixtures interact with non-alcoholic fatty liver diseases. **Environ Pollut.**, v.15, p. 309, 2022.

OLIVEIRA RAA, PINTO BD, REBOUÇAS BH, CIAMPI DE ANDRADE D, VASCONCELLOS ACS, BASTA PC. Neurological Impacts of Chronic Methylmercury Exposure in Mundurucu Indigenous Adults: Somatosensory, Motor, and Cognitive Abnormalities. **Int J Environ Res Public Health.** v.18, n.19, p.10270, 2021.

OUIMET, M., BARRETT, T. J., FISHER, E. A. HDL and Reverse Cholesterol Transport. **Circulation research**, v. 124, n. 10, p. 1505–1518, 2019.

PARK HK, AHIMA RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism.** v.64, n.1, p.24–34, 2015,

PARK JS, HA KH, HE K, KIM DJ. Association between Blood Mercury Level and Visceral Adiposity in Adults. **Diabetes Metab J.** v.41, p.113-120, 2017.

PASCOLUTTI, R., ERLANDSON, S. C., BURRI, D. J., ZHENG, S., KRUSE, A. C. Mapping and engineering the interaction between adiponectin and T-cadherin. **In Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 9, p. 2749–2759, 2020.

PHILLIPS, M.C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. **IUBMB Life**, v. 66, p. 616–623, 2014.

POURSAFA, P., ATAEE, E., et al. Association of serum lead and mercury level with cardiometabolic risk factors and liver enzymes in a nationally representative sample of adolescents: the CASPIAN-III study. *Environmental Science and pollution research*, v. 21, n. 23, p. 13496-13502, 2014.

RICE KM, WALKER EM JR, WU M, GILLETTE C, BLOUGH ER. Environmental mercury and its toxic effects. *J Prev Med Public Health*. v.47, n.2, p.74-83, 2014.

RAHMAN T, HAMZAN NS, MOKHSIN A, RAHMAT R, IBRAHIM ZO, RAZALI R, et al., Enhanced status of inflammation and endothelial activation in subjects with familial hypercholesterolaemia and their related unaffected family members: a case control study, *Lipids Health Dis.*, v. 16, p. 81, 2017.

RAMOS-LOBO AM, DONATO J JR. The role of leptin in health and disease. *Temperature (Austin)*. v.4, n.3, p.258–91, 2017.

RAPOSO RDS, PINTO DV, MOREIRA R, et al. Methylmercury Impact on Adult Neurogenesis: Is the Worst Yet to Come From Recent Brazilian Environmental Disasters? *Front Aging Neurosci*. v.12, n.591601, 2020.

RICHARD AJ, WHITE U, ELKS CM, et al. **Adipose Tissue**: Physiology to Metabolic Dysfunction. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>

RIZZETTI, D. A., CORRALES, P., PIAGETTE, J. T., URANGA-OCIO, J. A., MEDINA-GOMEZ, G., PEÇANHA et al. Chronic mercury at low doses impairs white adipose tissue plasticity. *Toxicology*. v.418, p.41-50, 2019.

ROLDÃO AP. Contaminação mercurial em pescado. Rio de Janeiro: Universidade Castelo Branco; 2007.

ROQUE CR, SAMPAIO LR, ITO MN, et al. Methylmercury chronic exposure affects the expression of DNA single-strand break repair genes, induces oxidative stress, and chromosomal abnormalities in young dyslipidemic APOE knockout mice. *Toxicology*., v. 464, p.152992, 2021.

ROOS-BARRACLOUGH F, GIVELET N, MARTINEZ-CORTIZAS A, GOODSITE ME, BIESTER H, SHOTYK W. An analytical protocol for the determination of total mercury concentrations in solid peat samples. *Sci Total Environ*. v.292, n.1-2, p.129-139, 2002.

ROSA-SILVA, H. T., PANZENHAGEN, A. C., SCHMIDTT, V., TEIXEIRA, A. A., ESPITIA-PÉREZ, P., DE OLIVEIRA FRANCO, Á., et al. Hepatic and neurobiological effects of foetal and breastfeeding and adulthood exposure to methylmercury in Wistar rats. *Chemosphere*, v. 244, n. 125400, 2020.

ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. v.156, p.20–44, 2014.

RUTLEDGE AC, SU Q, ADELI K. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. **Biochem Cell Biol.**, v. 88, p. 251–267, 2010.

SAKAMOTO M et al. “Health Impacts and Biomarkers of Prenatal Exposure to Methylmercury: Lessons from Minamata, Japan.” **Toxics** v. 6, n.45, 2018.

SANDERS, F. W., & GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 452-468, 2016.

SCHMITZ, F.; MEVISSSEN, V.; KRANTZ, C.; KIMMEL, M.; ERDMANN, J.; HOFFMANN, R.; ZERRES, K.; ORTLEPP, J.R. Robust association of the APOE epsilon4 allele with premature myocardial infarction especially in patients without hypercholesterolaemia: The Aachen study. **Eur. J. Clin. Investig.** v. 37, p. 106–108, 2007.

SCHUSTER PF, KRABBENHOFT DP, NAFTZ DL, et al. Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: a glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. **Environ Sci Technol.** 2002;36(11):2303-2310.

SCHWARTZ, M. W., WOODS, S. C., PORTE, D., JR, SEELEY, R. J., & BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 2000.

SHEEHAN, M.C., BURKE, T.A., NAVAS-ACIEN, A., BREYSSE, P.N., MCGREADY, J., FOX, M.A.. Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review. **Bull.** v. 92, p. 254–269, 2014.

SMITH, S., & TSAI, S. C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. **Natural product reports**, v. 24, n. 5, p.1041-1072, 2007.

SILVA JL, LEOCÁDIO PCL, REIS JM, et al. Oral methylmercury intoxication aggravates cardiovascular risk factors and accelerates atherosclerosis lesion development in ApoE knockout and C57BL/6 mice. **Toxicol Res.** v.37, n.3, p. 311-321, 2020.

SIQUEIRA-GAY J; SANCHÉZ L. The outbreak of illegal gold mining in the Brazilian Amazon boosts deforestation. **Regional Environmental Change.** v.21, n.28, 2021.

SIVAPANDI K, VELUMANI A, KALLATHIYAN K, IYER S, SINKAR P. Blood mercury and liver enzymes: A pan-India retrospective correlation study. **Toxicol Ind Health.**, v. 36, n. 12, p.1019-1023, 2020.

SONG, Z., XIAOLI, A. M., YANG, F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1383, 2018.

SPARKS JD, SPARKS CE, ADELI K. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 32, p. 2104–12, 2012.

STACHOWICZ, A., WIŚNIEWSKA, A., KUŚ, K., KIEPURA, A., GEBSKA, A., GAJDA, M., et al. The influence of trehalose on atherosclerosis and hepatic steatosis in apolipoprotein E knockout mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1552, 2019.

STRÅLFORS P, BJÖRGELL P, BELFRAGE P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, n. 11, p. 3317–3321, 1984.

SUN, L.; LI, H.; TAI, L.W.; GU, P.; CHEUNG, C.W. Adiponectin regulates thermal nociception in a mouse model of neuropathic pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 120, p. 1356–1367, 2018.

SWARDFAGER W, YU D, SCOLA G, COGO-MOREIRA H, CHAN P, ZOU Y, et al. Peripheral lipid oxidative stress markers are related to vascular risk factors and subcortical small vessel disease, **Neurobiol Aging.**, v. 59, p. 91-7, 2017.

TAKAHASHI Y, FUKUSATO T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol.** v.20, n.42, p.15539-15548, 2014.

TALL, A. R., YVAN-CHARVET, L., TERASAKA, N., PAGLER, T., & WANG, N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. **Cell metabolism**, v. 7, n. 5, p. 365–375, 2008.

TANG, S. L., HUANG, Z. W., LIU, J., YANG, Z. C., LIN, Q. H. Atmospheric mercury deposition recorded in an ombrotrophic peat core from Xiaoxing'an Mountain, Northeast China. **Environ. Res.** v.118, p.145–148, 2012.

TARTAGLIA LA. The leptin receptor. **J Biol Chem.** v.272, n.10, p.6093–6, 1997.

TATSUTA N, KUROKAWA N, NAKAI K, et al. Effects of intrauterine exposures to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and lead on birth weight in Japanese male and female newborns. **Environ Health Prev Med.**, v. 22, n. 1, p. 39, 2017.

TER HORST KW, SERLIE MJ. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients.** v. 9, n. 9, p. 981, 2017.

TINKOV, A. A., ASCHNER, M., KE, T., FERRER, B., ZHOU, J. C., CHANG, J. S., SKALNY, A. V. Adipotropic effects of heavy metals and their potential role in obesity. **Faculty Reviews.** v.10, 2021.

TORRE-VILLALVAZO, I., BUNT, A. E., ALEMÁN, G., MARQUEZ-MOTA, et al. Adiponectin synthesis and secretion by subcutaneous adipose tissue is impaired during obesity by endoplasmic reticulum stress. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 5970–5984, 2018.

TRASANDE L, BLUMBERG B: Endocrine disruptors as obesogens. In **Pediatric Obesity**. Contemporary Endocrinology. Edited by Freemark MS. Humana Press, Cham. 2018; 243–253.

TRAYHURN P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. **Acta Physiol. Scand.** v.184, p.285–293, 2005.

TUDORACHE, I.F.; TRUSCA, V.G.; GAFENCU, A.V. Apolipoprotein E—A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v. 15, p. 359–365, 2017.

United Nations Environment Programme (UNEP). **Global Mercury Assessment 2018**. UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland, 2019. Disponível em: <https://www.unep.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018>.

VAN DEN BERGHE G. The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 14, n. 4, p. 407-420, 1991.

VANCE J. E; HAYASHI H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 8, p. 806-18, 2010.

VAZQUEZ-VELA ME, TORRES N, TOVAR AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. **Arch Med Res.** v.39, n.8, p.715–28, 2008.

VILLIERS, D. D., POTGIETER, M., AMBELE, M. A., ADAM, L., DURANDT, C., & PEPPER, M. S. The role of reactive oxygen species in adipogenic differentiation. **Stem cells: Biology and engineering**, p. 125-144, 2017.

VIRTUE S, VIDAL-PUIG A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome – an allostatic perspective. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1801, n. 3, p.338-349, 2010.

VISHVANATH L., GUPTA R.K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. **J. Clin. Investig.**, v. 129, p. 4022–4031, 2019.

WADA N, et al. Leptin and its receptors. **J Chem Neuroanat.** v.61–62, p.191–9, 2014.

WAJCHENBERG B.L. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews.** v. 21, p.697–738, 2000.

WANG, H., ECKEL, R. H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. **Endocrinology and metabolism**, v. 297, n. 2, p. 271–288, 2009.

WANG W, SEALE P. Control of brown and beige fat development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v.17, p.691–702, 2016.

WANG, YAJING et al. “Cardiovascular Adiponectin Resistance: The Critical Role of Adiponectin Receptor Modification.” **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 28, n. 7, p. 519-530, 2017.

WANG X, MUKHERJEE B, PARK SK. Associations of cumulative exposure to heavy metal mixtures with obesity and its comorbidities among U.S. adults in NHANES 2003-2014. **Environ Int.** v.121, n.1, p.683–94, 2018.

WEISGRABER K. H. Apolipoprotein E: structure-function relationships. **Advances in protein chemistry**, v. 45, p. 249–302, 1994.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 1. **Mercury**. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 1976.

WOLSKA, A., DUNBAR, R. L., FREEMAN, L. A., UEDA, M., AMAR, M. J., SVIRIDOV, D. O., & REMALEY, A. T. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. **Atherosclerosis**, v. 267, p. 49–60, 2017.

WU J, BOSTROM P, SPARKS LM, YE L, CHOI JH, GIANG AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell** v.150, n.2, p.366–76, 2012.

XIAO, C., STAHEL, P., & LEWIS, G. F. Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 7, n. 3), p. 487–501, 2019.

XU, H., FINKELSTEIN, D. I., AND ADLARD, P. A. Interactions of metals and apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Front. Aging Neurosci.** v. 6, p. 121, 2014.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y.; et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1288–1295, 2002.

YANG, Q., FU, C., XIAO, J., YE, Z. Uric acid upregulates the adiponectin-adiponectin receptor 1 pathway in renal proximal tubule epithelial cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 3, p. 3545-3554, 2018.

YE BJ, KIM BG, JEON MJ, et al. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. **Ann Occup Environ Med.** v.28, n.5, 2016.

YKI-JARVINEN H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. **Lancet Diabetes Endocrinol.** v. 2, n. 11, p. 901-910, 2014.

YOUNOSSI ZM, KOENIG AB, ABDELATIF D, FAZEL Y, HENRY L, WYMER M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta- analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology.** v.64, n.1, p.73-84, 2016.

YOUNOSSI ZM, KOENIG AB, ABDELATIF D, FAZEL Y, HENRY L, WYMER M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta- analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology.** v.64, n.1, p.73-84, 2016.

YUE L, RASOULI N, RANGANATHAN G, KERN PA, MAZZONE T, Divergent effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists and tumor necrosis factor α on adipocyte ApoE expression. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 47626–47632, 2004.

ZANNIS, V. I., CHRONI, A., KRIEGER, M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. **Journal of molecular medicine**, v. 84, n. 4, p. 276–294, 2006.

ZECHNER R, MOSER R, NEWMAN TC, FRIED SK, BRESLOW JL. Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3–L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. **J. Biol. Chem** v. 266, p. 10583–8, 1991.

ZHANG Y., R.PROENCA, M.MAFFEI, M.BARONE, L.LEOPOLD ANDJ.M. FRIEDMAN. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. v.372, p.425–432,1994.

ZHANG, L., YIN, Y., ZHANG, H., ZHONG, W., ZHANG, J. Association of asthma diagnosis with leptin and adiponectin: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Investigative Medicine**, v. 65, n.1, p. 57-64, 2017.

ZHAO, L., FU, Z., LIU, Z. Adiponectin and insulin cross talk: the microvascular connection. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 24, n. 8, p. 319-324, 2014.

ZHAO, Y., ZHOU, C., WU, C., GUO, X., HU, G., WU, Q., et al. Subchronic oral mercury caused intestinal injury and changed gut microbiota in mice. **Science of the Total Environment**, v. 721, n. 137639, 2020.

ZHU Y, KRUGLIKOV IL, AKGUL Y, SCHERER PE. Hyaluronan in adipogenesis, adipose tissue physiology and systemic metabolism. **Matrix Biol**. v.78-79, p.284-291, 2019.

ZWARTJES, M., GERDES, V., NIEUWDORP, M. The Role of Gut Microbiota and Its Produced Metabolites in Obesity, Dyslipidemia, Adipocyte Dysfunction, and Its Interventions. **Metabolites**, v. 11, n. 8, p. 531, 2021.

ZWICK RK, GUERRERO-JUAREZ CF, HORSLEY V, PLIKUS MV. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metab**. v.27, n.1, p.68-83, 2018.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da toxicidade sistêmica induzida por metil-mercúrio e dieta hiperlipídica em camundongos C57BL6j e APOE nocautes", protocolada sob o CEUA nº 4831110618, sob a responsabilidade de **Ramon da Silva Raposo e equipe; Daniel Vieira Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA/UNIFOR) na reunião de 09/08/2018.

We certify that the proposal "Study of systemic toxicity induced by methyl mercury and hyperlipidic diet in C57BL6j and APOE knockout mice", utilizing 120 Isogenics mice (120 males), 120 Transgenics mice (120 males), protocol number CEUA 4831110618, under the responsibility of **Ramon da Silva Raposo and team; Daniel Vieira Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Fortaleza's University (CEUA/UNIFOR) in the meeting of 08/09/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018** a **09/2020** Área: **Medicina Veterinária**

Origem:	Não aplicável biotério			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 21 a 30 dias N: 120
Linhagem:	C57BL6j			Peso: 8 a 11 g
Origem:	Não aplicável biotério			
Espécie:	Camundongos transgênicos	sexo:	Machos	idade: 21 a 30 dias N: 120
Linhagem:	C57BL6j APOE NOCAUTE			Peso: 8 a 11 g

Local do experimento: NÚCLEO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (NUBEX)

Fortaleza, 21 de agosto de 2018

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza

The Transition From Undernutrition to Overnutrition Under Adverse Environments and Poverty: The Risk for Chronic Diseases

Paola Caroline L. Leocádio^{1,2}, Synara C. Lopes³, Ronaldo P. Dias³,
Jacqueline I. Alvarez-Leite¹, Richard L. Guerrant⁴, João O. Malva^{5,6} and Reinaldo B. Oriá^{3*}

¹ Laboratory of Atherosclerosis and Nutritional Biochemistry, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Department of Nutrition, Nursing School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny, and Nutrition, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁴ Center for Global Health, University of Virginia, Charlottesville, VA, United States, ⁵ Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ⁶ Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Keywords: malnutrition, obesity, intestinal microbiota, diet, COVID-19, dysbiosis, poverty

Nutritional transition is an important public health issue in developing countries, where switch from undernutrition to overnutrition/obesity is rapidly occurring, often within two or three generations. Such transition is related to changes in lifestyle, with people having more access to western high-caloric diets. In developing countries, settings of poverty, poor sanitation and hygiene are still common, where children are exposed to numerous enteric pathogens, pollutants, and other biohazards. Populations living under such adverse environments and facing the nutritional transition may have increased risks for chronic illnesses in later life, including diabetes, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. This opinion paper summarizes novel findings and recent literature addressing the nutrition transition under adverse environments, including the gut microbiota-brain axis dysfunction and their lasting effects with deleterious consequences for later development.

OPEN ACCESS

Edited by: Vittorio Calabrese, University of Catania, Italy

Reviewed by: Erika Elizabeth Rodriguez-Torres, Autonomous University of the State of Hidalgo, Mexico

*Correspondence: Reinaldo B. Oriá
oria@ufc.br

Specialty section: This article was submitted to Neuroenergetics, Nutrition and Brain Health, a section of the journal *Frontiers in Nutrition*

Received: 04 March 2021

Accepted: 26 March 2021

Published: 23 April 2021

Citation: Leocádio PCL, Lopes SC, Dias RP, Alvarez-Leite JI, Guerrant RL, Malva JO and Oriá RB (2021) The Transition From Undernutrition to Overnutrition Under Adverse Environments and Poverty: The Risk for Chronic Diseases. *Front. Nutr.* 8:676044.
doi: 10.3389/fnut.2021.676044

DIETARY CHANGES IN DEVELOPING COUNTRIES

According to the World Health Organization (WHO), approximately 462 million adults are underweight, 1.9 billion are overweight or obese, and 2 billion are micronutrient deficient (1). In addition, 38 million children below 5 years of age were overweight or obese in 2019 and more than 340 million children and adolescents (5 to 19 years) were overweight or obese in 2016 (2). Obesity associated with micronutrient deficiency has great repercussions in childhood and deserves special attention in middle and low income countries (3), which may be even more aggravated by poverty and unbalanced diets.

In developing countries, lifestyle changes amidst the disarray of urbanization, increasing poverty (with proliferating shantytowns, poor sanitation, and hygiene), crowding, and altered dietary habits. Continuous exposure to harmful pollutants (mercury, lead, arsenic, asbestos etc.) and environmental pathogens may accumulate and lead to a detrimental exposome throughout life with long-term health consequences (4).

In developing countries with emerging economies, a double burden of malnutrition (DBM) often occurs even in impoverished areas. The DBM is defined by WHO as “the coexistence of undernutrition along with overweight, obesity or diet-related non-communicable diseases (NCD), within individuals, households and populations, and across the life course” and may be

aggravated by poor environmental circumstances and genetic predispositions (1). Although a large proportion of deaths among children under five are attributed to malnutrition, overweight and obesity in this age group and older are on the rise (5). The increased risk of NCD related with the nutritional transition in developing countries is a public health concern, due to the potential economic impact and oversaturation of the health system infrastructure (6).

Furthermore, when nutritional deprivation or infection occurs early in life, such as in the prenatal phase and/or up to 3 years of age, the individual undergoes metabolic changes that can lead to greater susceptibility to developing obesity as an adult (7). DBM can cause long-term effects, especially when their components develop early, and each of them can increase the chances of the other occurring (8).

The transition to hypercaloric diets is a global health concern. Hypercaloric intake is characterized by high-carbohydrate and fat consumption, both leading to obesity. Studies have shown that maternal obesity during pregnancy can lead to overweight and other metabolic effects in the offspring through epigenetic mechanisms, such as DNA methylation (9). The coexistence of these opposing nutritional patterns reflects, in part, social and economic inequalities. Other factors such as the increased life expectancy also contribute, as elderly populations are more vulnerable to malnutrition given their psychological, social and health-related risks and chronic diseases (10).

IMPACT OF NUTRITIONAL TRANSITION IN DEVELOPING COUNTRIES

Several studies point to the effects of fetal programming and maternal and environmental factors during early life on the development of diseases in adulthood (11–16). Maternal nutrition even before pregnancy can affect the development of the fetus with later risk for cardiovascular/metabolic diseases (12). Early undernutrition followed by later overweight increases the risk of NCD, imposing a high metabolic load on a reduced or altered capacity for homeostasis. In women, early childhood undernutrition increases the risk of complications in childbirth later in life (13). In countries with poor sanitary conditions, the occurrence of the APOE4, a recognized gene associated with increased risk for acquiring Alzheimer's disease, may favor maternal fertility and promote protection against childhood diarrhea, while possibly increasing the risk of NCD with aging (14). In animal models, maternal obesity affects leptin mRNA expression and its peak in offspring (15). Hyperleptinemia leads to leptin resistance in neonates, favoring hyperphagia and can permanently affect the regulation of appetite (16). These trajectories throughout life are shaped both by driving factors of society—that is, rapid changes in diets, dietary norms and patterns of physical activity—and by broader ecological factors, such as pathogen exposure (8).

In the example of Brazil, the most recent National Health Survey (17) pointed out that 60.3% of the population over 18 years old is overweight, while underweight reaches 1.6% of the inhabitants over 25 years old. A systematic review (18) pointed

out that the prevalence of underweight was approximately 10% in children from different regions of the country, reaching 21% due to social disparities. The prevalence of overweight was also approximately 10%, with a reduction to 6% in populations with social inequality.

The increase in the body mass index (BMI) in the population has grown significantly not only in Brazil but in other low- and middle-income countries around the globe, justifying the increase in the incidences of NCD. Yiengprugsawan et al. (19) studied the populations of Brazil and Thailand because both went through similar economic transitions with the hypothesis of the existence of a relationship between BMI and socioeconomic status. In this study, socioeconomic status was directly related to the increase in overweight and obesity in males. In women, an inverse pattern was observed for both cohorts throughout the study period (19).

A more recent survey conducted in Greece after the economic crisis, showed that there are still inequalities in the nutritional level. The DBM is present in populations dependent on the government's food assistance program. The food of the neediest people is unfortunately characterized by a high consumption of processed foods containing refined sugar and a scarce intake of fruits and vegetables. Greece is also undergoing a nutritional transition phase initiated by the economic crisis that occurred 10 years ago and that today still affects the poorest population (20).

DIETARY IMBALANCE AND INFLAMMATION: FROM THE GUT TO THE BRAIN

The dynamic gut microbial ecosystem is directly influenced by the diet and by its bidirectional interaction with the health of the host. In the context of DBM, literature points out that changes in the microbiota can be profoundly influenced by both undernutrition and obesity (5). Long-lasting effects of undernutrition in early life can be attributed to interconnected biological pathways, involving imbalance of the gut microbiome, inflammation, metabolic dysregulation, and impaired insulin signaling (8).

The immaturity of the microbiota, the increased burden of enteric pathogens and the dysfunction of the intestinal barrier are associated with systemic inflammation in early life, that may have lasting disabling effects (21). Contaminated environments, early childhood diarrhea and enteric pathogens have been associated with intestinal dysbiosis, increased risk of developing obesity (22) and neurodegenerative diseases (23, 24). Studies have shown the impact of diet and obesity on gut microbiota. High-fat diets may promote dysbiosis (25) and the gut microbiota was stated as a further contributing factor to pathophysiology of obesity by influencing insulin resistance and systemic inflammation (26). Among obese adults with similar BMI, those with greater dysbiosis have a higher risk of NCD (27). Some have suggested that changes in the microbiota promoted by SARS-CoV-2 infection associated with dietary changes may exacerbate present and future health risks (5).

Moreover, the relationship between COVID-19 and nutrition is reciprocal. Both, obesity and micronutrient deficiencies increase the risk and aggravates the evolution of COVID-19, which, in turn, due to its devastating effect, leads to undernutrition. Moreover, social distancing leads to physical inactivity, less frequent sun exposure (reducing stakes of vitamin D), increases stress and reduces medical visits for non-related COVID-19 symptoms (28).

Both undernutrition and obesity may induce low-grade systemic inflammation (29, 30). The adipose tissue secretes several inflammatory mediators and these molecules can exert metabolic, cardiovascular and hepatic effects, among others, favoring the development of NCD (31). In the elderly, the increase in systemic inflammation indicators is related to atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative diseases, and carcinogenesis, however it is still not entirely clear why low-grade chronic inflammation is associated with the development of chronic diseases (32).

It has been increasingly recognized that imbalanced diets may be *per se* an proinflammatory factor. The literature presents accumulating evidence that points to the connection between diet, inflammation and NCD (33). These data are essential to find out how obesity is outlined and impacts on the emerging metabolic disorders. The diet lipid content profile can modulate pro-inflammatory genes expression (34). Prolonged consumption of a high-fat diet promotes an increase in inflammatory mediators in the central nervous system and peripheral tissues including liver and adipose tissue (35). Interestingly, (44) observed greater lipid deposition in animals that consumed a diet rich in fat but found a higher concentration of inflammatory mediators in animals that received a diet rich in carbohydrates.

One of the recently studied molecules in non-alcoholic fatty liver disease associated with obesity, involving hyperlipidemia, hyperglycemia and insulin resistance is perilipin-2, a cytoplasmic protein that covers lipid droplets (36). Kern et al. (37) observed greater expression of the protein in obese humans, not associated with an increase in inflammatory mediators and insulin resistance. In animals fed a high-fat diet, the deletion of the perilipin-2 gene prevented obesity, inflammation of adipose tissue, insulin resistance and steatosis (38). Perilipin-2 also appears to play a role in intestinal dysbiosis promoted by a high-fat diet (39).

In summary, dietary changes observed in DBM can contribute to the development of NCD, calling attention for the utmost need to study and implement actions that can mitigate its effects.

WHAT CAN BE DONE TO REDUCE THE IMPACT OF THE NUTRITIONAL TRANSITION ON THE DEVELOPMENT OF CHRONIC DISEASES?

From observing the effects of the nutritional transition on health and quality of life, especially in countries facing DBM—in which the health system needs to cope with great demands for both addressing poor diet and sanitation in early life as well as

the costly management of chronic diseases as adults age (40), interventions are needed to reduce these worrisome impacts.

Interventions, programs, and policies with the potential to simultaneously reduce DBM are called double-duty actions: improving maternal and child nutrition, encouraging breastfeeding, school feeding policies and programs and marketing regulations (41). A scoping review concludes that there are few studies evaluating the effect of these actions to reduce both undernutrition and overnutrition (42). Recent work criticizes double-duty actions, suggesting expansion of the groups contemplated, for example including women of reproductive age in the pre and post-pregnancy periods, expanding the focus of nutrition to general health. Still, some determinants associated with DBM are not considered, such as better access to potable water, which raises the question of the need to revisit and update the current intervention strategies (43).

CONCLUSION

The double burden posed by early childhood undernutrition with later life continued poor, high fat diets may have lasting consequences that need to be addressed by sanitary authorities. As the health access improves and life expectancy increases in developing countries, the compound effect of early-life DBM in aging populations even more raises the concern and thus requires more attention by health policies.

In times of COVID-19 pandemic, exacerbation of DBM is foreseen, with likely increased rates of undernutrition (due to micronutrient deficiency, diet imbalance, e.g., vitamin D deficiency) and obesity (food choices, lockdowns, and restrictions on mobility) worldwide, but in low and middle income countries such lifestyle changes, when compounded with adverse environments and poverty may have a profound impact for health and likely increasing the risk for acquiring/aggravating chronic diseases (43). This opinion paper calls for more awareness of this public health issue and the need for long-term cohort studies to follow-up and bring innovative strategies to ameliorate potentially lasting effects of the nutrition transition, especially under adverse environments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have equally contributed to the work and approved it for publication.

FUNDING

JOM was supported by FCT (Portuguese Foundation for Science and Technology) through the Strategic Project UIDB/04539/2020, UIDP/04539/2020 (CIBB), and POCI- 01-0145-FEDER-007440, CENTRO-01-0145-FEDER-0000012: Healthy Aging 2020.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development [CNPq] especial visiting researcher [N 03/2014, # 400538/2014-8]

REFERENCES

- World Health Organization. *The Double Burden of Malnutrition. Policy Brief*. World Health Organization (2017). p. 10. Available online at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-NMH-NHD-17.3> (accessed February 8, 2021).
- World Health Organization. *Obesity and Overweight*. Available online at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed February 8, 2021).
- Jardim-Botelho A, Queiroz Gurgel R, Simeone Henriques G, Dos Santos CB, Afonso Jordão A, Nascimento Faro F, et al. Micronutrient deficiencies in normal and overweight infants in a low socio-economic population in north-east Brazil. *Paediatr Int Child Health*. (2016) 36:198–202. doi: 10.1179/2046905515Y.0000000035
- Tshala-Katumbay D, Mwanza J-C, Rohlman DS, Maestre G, Oriá RB. A global perspective on the influence of environmental exposures on the nervous system. *Nature*. (2015) 527:S187–92. doi: 10.1038/nature16034
- Littlejohn P, Finlay BB. When a pandemic and an epidemic collide: COVID-19, gut microbiota, and the double burden of malnutrition. *BMC Med*. (2021) 19:1–8. doi: 10.1186/s12916-021-01910-z
- Mbogori T, Kimmel K, Zhang M, Kandiah J, Wang Y. Nutrition transition and double burden of malnutrition in Africa: a case study of four selected countries with different social economic development. *AIMS Public Heal*. (2020) 7:425–39. doi: 10.3934/publichealth.2020035
- Deboer MD, Lima AAM, Oriá RB, Scharf RJ, Moore SR, Luna MA, et al. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev*. (2012) 70:642–53. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00543.x
- Wells JC, Sawaya AL, Wibaek R, Mwangome M, Poullas MS, Yajnik CS, et al. The double burden of malnutrition: aetiological pathways and consequences for health. *Lancet*. (2020) 395:75–88. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32472-9
- Hjort L, Martino D, Grunnet LG, Naeem H, Maksimovic J, Olsson AH, et al. Gestational diabetes and maternal obesity are associated with epigenome-wide methylation changes in children. *JCI Insight*. (2018) 3:1–14. doi: 10.1172/jci.insight.122572
- Prince MJ, Wu F, Guo Y, Gutierrez Robledo LM, O'Donnell M, Sullivan R, et al. The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet*. (2015) 385:549–62. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61347-7
- Kronman H, Torres-Berrio A, Sidoli S, Issler O, Godino A, Ramakrishnan A, et al. Long-term behavioral and cell-type-specific molecular effects of early life stress are mediated by H3K79me2 dynamics in medium spiny neurons. *Nat Neurosci*. (2021). doi: 10.1038/s41593-021-00814-8. [Epub ahead of print].
- Young MF, Ramakrishnan U. Maternal undernutrition before and during pregnancy and offspring health and development. *Ann Nutr Metab*. (2021) 76:1–13. doi: 10.1159/000510595
- Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. (2008) 371:340–57. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61692-4
- Oriá RB, de Almeida JZ, Moreira CN, Guerrant RL, Figueiredo JR. Apolipoprotein E effects on mammalian ovarian steroidogenesis and human fertility. *Trends Endocrinol Metab*. (2020) 31:872–83. doi: 10.1016/j.tem.2020.06.003
- Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS ONE*. (2009) 4:e5870. doi: 10.1371/journal.pone.0005870
- Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MCF. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rat. *Br J Nutr*. (2006) 95:830–7. doi: 10.1079/BJN20061726
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa Nacional de Saúde 2019*. (2020). Available online at: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=downloads> (accessed February 15, 2021).
- Sousa CP da C, de Olinda RA, Pedraza DF. Prevalence of stunting and overweight/obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios: systematic review and meta-analysis. *São Paulo Med J*. (2016) 134:251–62. doi: 10.1590/1516-3180.2015.0227121
- Yiengprugsawan V, Horta BL, Motta JVS, Gigante D, Seubsman S-A, Sleigh A. Body size dynamics in young adults: 8-year follow up of cohorts in Brazil and Thailand. *Nutr Diabetes*. (2016) 6:e219. doi: 10.1038/nutd.2016.24
- Chatzivagia E, Pepa A, Vlassopoulos A, Malisova O, Filippou K, Kapsokefalou M. Nutrition transition in the post-economic crisis of Greece: assessing the nutritional gap of food-insecure individuals. A cross-sectional study. *Nutrients*. (2019) 11:2914. doi: 10.3390/nu1122914
- Blanton LV, Barratt MJ, Charbonneau MR, Ahmed T, Gordon JI. Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics. *Science*. (2016) 352:1533. doi: 10.1126/science.aad9359
- Guerrant RL, Deboer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AAM. The impoverished gut - A triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. (2013) 10:220–9. doi: 10.1038/nrgastro.2012.239
- Oriá RB, Murray-Kolb LE, Scharf RJ, Pendergast LL, Lang DR, Kolling GL, et al. Early-life enteric infections: Relation between chronic systemic inflammation and poor cognition in children. *Nutr Rev*. (2016) 74:374–86. doi: 10.1093/nutrit/nuw008
- Oriá RB, Malva JO, Foley PL, Freitas RS, Bolick DT, Guerrant RL. Revisiting inbred mouse models to study the developing brain: the potential role of intestinal microbiota. *Front Hum Neurosci*. (2018) 12:1–5. doi: 10.3389/fnhum.2018.00358
- Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metab*. (2015) 22:516–30. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.007
- Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Picu A, Petcu L, Cucu N, et al. Gut microbiota, host organism, and diet triadology in diabetes and obesity. *Front Nutr*. (2019) 6:21. doi: 10.3389/fnut.2019.00021
- de la Cuesta-Zuluaga J, Corrales-Agudelo V, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS. Body size phenotypes comprehensively assess cardiometabolic risk and refine the association between obesity and gut microbiota. *Int J Obes*. (2018) 42:424–32. doi: 10.1038/ijo.2017.281
- Palmer K, Monaco A, Kivipelto M, Onder G, Maggi S, Michel J-P, et al. The potential long-term impact of the COVID-19 outbreak on patients with non-communicable diseases in Europe: consequences for healthy ageing. *Aging Clin Exp Res*. (2020) 32:1189–94. doi: 10.1007/s40520-020-01601-4
- Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr*. (2011) 106:55–78. doi: 10.1017/S0007114511005460
- Prendergast AJ, Rukobo S, Chasekwa B, Mutasa K, Ntozini R, Mbuya MNN, et al. Stunting is characterized by chronic inflammation in zimbabwean infants. *PLoS ONE*. (2014) 9:e86928. doi: 10.1371/journal.pone.0086928
- Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C, et al. Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Front Physiol*. (2020) 10:1607. doi: 10.3389/fphys.2019.01607
- Pawelec G, Goldeck D, Derhovanessian E. Inflammation, ageing and chronic disease. *Curr Opin Immunol*. (2014) 29:23–8. doi: 10.1016/j.coi.2014.03.007

33. Duan Y, Zeng L, Zheng C, Song B, Li F, Kong X, et al. Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Front Immunol.* (2018) 9:1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.02649
34. Corrêa TAF, Quintanilha BJ, Norde MM, Pinhel MA de S, Nonino CB, Rogero MM. Nutritional genomics, inflammation and obesity. *Arch Endocrinol Metab.* (2020) 64:205–22. doi: 10.20945/2359-3997000000255
35. Guillemot-Legris O, Masquelier J, Everard A, Cani PD, Alhouayek M, Muccioli GG. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *J Neuroinflammation.* (2016) 13:1–11. doi: 10.1186/s12974-016-0666-8
36. Libby AE, Bales E, Orlicky DJ, McManaman JL. Perilipin-2 deletion impairs hepatic lipid accumulation by interfering with sterol regulatory element-binding protein (srebp) activation and altering the hepatic lipidome. *J Biol Chem.* (2016) 291:24231–46. doi: 10.1074/jbc.M116.759795
37. Kern PA, Di Gregorio G, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Perilipin expression in human adipose tissue is elevated with obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* (2004) 89:1352–8. doi: 10.1210/jc.2003-031388
38. Orlicky DJ, Libby AE, Bales ES, McMahan RH, Monks J, La Rosa FG, et al. Perilipin-2 promotes obesity and progressive fatty liver disease in mice through mechanistically distinct hepatocyte and extra-hepatocyte actions. *J Physiol.* (2019) 597:1565–84. doi: 10.1113/JP277140
39. Xiong X, Bales ES, Ir D, Robertson CE, McManaman JL, Frank DN, et al. Perilipin-2 modulates dietary fat-induced microbial global gene expression profiles in the mouse intestine. *Microbiome.* (2017) 5:117. doi: 10.1186/s40168-017-0327-x
40. Rollins CPE, Gallino D, Kong V, Ayranci G, Devenyi GA, Germann J, et al. Contributions of a high-fat diet to Alzheimer's disease-related decline: a longitudinal behavioural and structural neuroimaging study in mouse models. *NeuroImage Clin.* (2019) 21:101606. doi: 10.1016/j.nicl.2018.11.016
41. World Health Organization. *Double-Duty Actions For Nutrition. Policy Brief.* World Heal Organ (2017). p. 10. Available online at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255414/WHO-NMH-NHD-17.2-eng.pdf?ua=1> (accessed February 08, 2021).
42. Menon S, Peñalvo JL. Actions targeting the double burden of malnutrition: a scoping review. *Nutrients.* (2020) 12:1–14. doi: 10.3390/nu12010081
43. Pradeilles R, Baye K, Holdsworth M. Addressing malnutrition in low- and middle-income countries with double-duty actions. *Proc Nutr Soc.* (2019) 78:388–97. doi: 10.1017/S0029665118002616
44. Antunes MM, Godoy G, de Almeida-Souza CB, da Rocha BA, da Silva-Santi LG, Masi LN, et al. A high-carbohydrate diet induces greater inflammation than a high-fat diet in mouse skeletal muscle. *Brazilian J Med Biol Res.* (2020) 53:4–11. doi: 10.1590/1414-431x20199039

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Leocádio, Lopes, Dias, Alvarez-Leite, Guerrant, Malva and Oriá. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.