

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Agatha de Assis Ferreira

O papel da obesidade sobre o recrutamento de célulastronco mesenquimais da medula óssea

> Rio de Janeiro 2018

Agatha de Assis Ferreira

O papel da obesidade sobre o recrutamento de células-tronco

mesenquimais da medula óssea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a Dra. Simone Vargas da Silva Coorientadora: Prof^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

> Rio de Janeiro 2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

| F383 | Ferreira, Agatha de Assis. O papel da obesidade sobre o recrutamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea / Agatha de Assis Ferreira 2018. 66f. |
|------|---|
| | Orientadora: Prof.ª Dra. Simone Vargas da Silva. Coorientadora: Prof.ª Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo. |
| | Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências. |
| | Células -tronco – Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Movimento celular. Adipogenia 5. Medula óssea – Teses. I. Silva, Simone Vargas da. II. Fidalgo, Thereza Christina Barja. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título. |
| | CDU 608.1:602-9 |

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Agatha de Assis Ferreira

O papel da obesidade sobre o recrutamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

Orientadora: Prof.ª Dra. Simone Vargas da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo Instituto de Biologia Roberto Alcanta Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Marta Citelli dos Reis Instituto de Nutrição – UERJ

Prof. Dr. Rafael Soares Lindoso Universidade Federal do Rio de Janeiro

> Rio de Janeiro 2018

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Barja-Fidalgo, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo.

À Prof.^a Dr.^a Simone Vargas da Silva, pela orientação, ensinamentos passados ao longo de todo este tempo e pela paciência.

À Prof.^a Dr.^a Roberta Saldanha Gama, pela ajuda com a quimiotaxia e pela paciência com as minhas muitas dúvidas e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Rafael Simões, pela citometria e pela paciência em ensinar como o método funcionava.

À Prof.^a Dr.^a Mariana Renovato, por ter aceitado de imediato revisar este trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Patrícia Lisboa e sua aluna Vanessa Rodrigues, por permitir o uso do equipamento de ressonância magnética e pela ajuda com o mesmo.

A Thaís, que apesar de não estar mais tão presente no laboratório, foi de extrema importância na ajuda e "treinamento" com os animais, além claro da amizade dentro e fora do laboratório.

A Thamiris, que mesmo estando em outro laboratório, se fez sempre presente e disposta a me ajudar no que fosse necessário e pela amizade que criamos dentro e fora do LFCM.

A UERJ, ao LFCM e as agência de fomento FAPERJ, CNPq e CAPES pela possibilidade de realizar este trabalho.

A Gabi pelo apoio técnico, pelos momentos de descontração e pela ajuda pessoal em certos momentos.

Aos demais companheiros de laboratório agradeço pelo carinho com que me receberam e pela ajuda.

Aos meus pais e irmã, obrigada por estarem ao meu lado.

Ao Bruno, pelo amor, carinho e paciência, principalmente.

A Deus, Nossa Senhora e aos anjos que me guardaram nessa jornada.

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram nesse trabalho.

RESUMO

FERREIRA, Agatha de Assis. **O papel da obesidade sobre o recrutamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea.** 2018. 66f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Nosso grupo demonstrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove um microambiente pró-inflamatório na medula óssea, o qual é responsável pelo comprometimento das células-tronco mesenguimais (CTMs) para um fenótipo pró-adipogênico (Silva et al., 2016). No entanto, não está claro se a obesidade afeta o recrutamento destas células para diversos tecidos. Neste estudo, avaliamos o papel da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no recrutamento de CTMs isoladas da medula óssea. Camundongos C57Bl/6J com 21 dias de vida foram mantidos sob dieta hiperlipídica (45% de Kcal provenientes de gordura) por 16 semanas (grupo HFD). O grupo controle (grupo CHOW) consiste de animais que receberam dieta normolipídica durante o mesmo período. Os animais do grupo HFD apresentaram um aumento da massa corporal, maior consumo de ração e um aumento do percentual de gordura corporal com consequente diminuição da massa magra. Além disso, foi observada uma maior glicemia de jejum e insulinemia, acompanhados de intolerância à glicose e à insulina. A análise do tecido adiposo epididimal mostrou um aumento da massa e a presença de adipócitos hipertróficos, além de um aumento na secreção de leptina e IL-10 no sobrenadante deste tecido. Na caracterização das CTMs, não foram observadas alterações na expressão dos marcadores de superfície, nem na diferenciação adipogênica de CTMs entre os grupos, no entanto as células isoladas do grupo HFD apresentaram uma maior capacidade proliferativa quando comparadas ao grupo CHOW. A obesidade induziu um aumento na frequência das CTMs no sangue dos animais, porém não observamos diferença no conteúdo dessas células no tecido adiposo epididimal. A obesidade promoveu um aumento na migração (in vitro) das CTMs na ausência do estímulo quimiotático. O SDF-1α (estímulo quimiotático-10nM) não foi capaz de induzir a quimiotaxia das CTMs no grupo HFD. Em relação a via de sinalização envolvida na migração, não foram observadas alterações na expressão do receptor de SDF-1a, o CXCR4, porém evidenciamos um aumento da ativação da via PI3K/AKT e na polimerização do citoesqueleto de actina nas CTMs isoladas dos animais obesos. Finalmente, não foram detectadas alterações na expressão gênica de SDF-1a nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo entre os grupos. Até o momento, nossos dados sugerem que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove um quadro de resistência à insulina, independente da presença de metainflamação. Além disso, a obesidade promove um perfil mais migratório das CTMs isoladas da medula óssea, contudo não altera a frequência dessas células no tecido adiposo epididimal.

(Protocolo n° CEUA: 024/2017)

Palavras chave: Obesidade. Tecido adiposo. Adipogênese. Migração celular. Células-tronco mesenquimais. SDF-1α.

ABSTRACT

FERREIRA, Agatha de Assis. **The role of obesity on the recruitment of bone marrow mesenchymal stem cells**. 2018. 66f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Our group demonstrated that high fat diet-induced obesity induces bone marrow proinflammatory microenvironment, which programs the mesenchymal stem cells (BM-MSC) to pro-adipogenic phenotype (Silva et al., 2016). However, it is unclear whether obesity affects the BM-MSC recruitment to different tissues. In this study, we evaluated the role of high fat diet-induced obesity on the BM-MSC recruitment. Male C57BI/ 6J mice at 21 days of age were fed with a high-fat diet (45% Kcal from fat) during 16 weeks (HFD group). The control group (CHOW group) were fed with a normal fat diet. The HFD animals presented an increase of body mass, higher food intake and a significative increase of body fat mass with a consequent decrease of the lean mass. In addition, we observed a higher fasting glucose and serum insulin levels, accompanied by glucose and insulin intolerance. The analysis of epididymal adipose tissue showed an increase in the fat mass and the presence of hypertrophic adipocytes. We also observed a higher leptin and IL-10 production in the supernatant of epididymal adipose tissue. No changes were observed in the surface markers expression or in the adipogenic differentiation, however, the BM-MSC from the HFD group had a greater proliferative potential when compared to CHOW group. Obesity induced an increase in the frequency of blood MSC, but no difference was observed in the content of these cells in the epididymal adipose tissue. We also observed an increase of MSC migration (in vitro) in the absence of the chemotactic agent. The challenge of SDF-1a (10nM chemotactic agent) not induced the MSC migration in the HFD group. No change was observed in the expression of the SDF-1α receptor, CXCR4, but we detected an increase in the activation of the PI3K / AKT pathway and a higher actin cytoskeletal polymerization in MSCs from obese animals. Finally, we not observed changes in the gene expression of SDF-1 α in epididymal and subcutaneous adipose tissues. Our data suggest that high fat diet-induced obesity promotes insulin resistance, regardless of the presence of metainflammation. In addition, we showed that obesity promotes a migratory profile of BM-MSC without affecting its frequency in the epididymal adipose tissue. (Protocol CEUA: 024/2017)

Keywords: Obesity. Adipose tissue. Adipogenesis. Cell migration. Mesenchymal stem cells. SDF-1α.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 - | Massa corporal e composição corporal | 37 |
|------------|--|----|
| Figura 2 - | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre os | |
| | indicadores da homeostase glicêmica | 39 |
| Figura 3 - | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | produção de adipo/citocinas pelos tecidos adiposos subcutâneo | |
| | e epididimal | 41 |
| Figura 4 - | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | massa do tecido adiposo epididimal e a morfologia dos | |
| | adipócitos | 43 |
| Figura 5 - | Caracterização das células-tronco mesenquimais no modelo de | |
| | obesidade | 45 |
| Figura 6 - | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica na | |
| | frequência de células-tronco mesenquimais no sangue e tecido | |
| | adiposo epididimal | 47 |
| Figura 7 - | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no perfil | |
| | migratório das células-tronco mesenquimais | 49 |
| Figura 8 - | Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica do SDF- | |
| | 1α nos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal | 52 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| Quadro 1 - | Características da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos | 17 |
|------------|---|----|
| Quadro 2 - | Modelo de diferenciação de adipócitos | 21 |
| Quadro 3 - | Linha do tempo das dietas utilizadas no estudo | 26 |
| Tabela 1 - | Composição das dietas | 27 |
| Tabela 2 - | Primers utilizados no RT-PCR | 32 |
| Quadro 4 - | Desenho esquemático da câmara de Boyden modificada | 33 |
| Quadro 5 - | Modelo proposto para o efeito da obesidade sobre a via de | |
| | sinalização na miração de células-tronco mesenquimais | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| AKT | Proteína kinase B (do inglês: Protein kinase B) |
|--------|--|
| AMPc | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico |
| BSA | Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>) |
| BM-MSC | Célula-tronco mesenquimal da medula óssea (do inglês: Bone |
| | marrow mesenchymal stem cell) |
| C/EBP | Proteína de ligação ao intensificador CCAAT (do inglês: |
| | CCAAT/enhancer-binding protein |
| CHOW | Grupo com dieta controle |
| CTMs | Células-tronco mesenquimais |
| CXCR4 | Receptor de quimiocina CXC tipo 4 (do inglês: CXC chemokine |
| | receptor type 4) |
| DMEM | Meio utilizado em cultura de células, do inglês: Dulbecco's |
| DNA | Modified Eagle's medium) |
| | Ácido desoxiribonucleico (do inglês: Deoxyribonucleic acid) |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra acético (do inglês: Ethylenediamine tetra |
| | acetic acid) |
| EGF | Fator de crescimento epidérmico (do inglês: Epidermal growth |
| | factor) |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês: <i>Enzyme</i> |
| | Linked imunosorbent assay) |
| FABP4 | Proteína ligante de ácido graxo do tipo 4 |
| FGF | Fator de crescimento de fibroblasto (do inglês: Fibroblast growth |
| | factor) |
| GLUT-4 | Transportador de glicose tipo 4 |
| н | Dieta hiperlipídica (do inglês: High fat diet) |
| HDL | Lipoptroteína de alta densidade (do inglês: High density |
| | lipoprotein) |
| HFD | Grupo com dieta hiperlipídica |
| HSC | Célula-tronco hemoatopoiética (do inglês: Hematopoietic stem |
| | cells) |

| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (do inglês: |
|--------|--|
| | Insulin Growth Factor 1) |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IBMTX | Isobutilmetilxantina |
| LPL | Lipoproteína lipase |
| MCP-1 | Proteína quimioatraente de monócito (do inglês: Monocyte |
| | Chemoattractant Protein-1) |
| PBS | Tampão salina fosfato (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Proteína C reativa |
| PI3k | Fosfoinositídeo 3-quinase (do inglês: Phosphoinositide 3-kinase) |
| PPAR | Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (do inglês: |
| | Peroxisome proliferator activated receptor) |
| PVDF | Polivinilidenodifluorido |
| RT-PCR | PCR em tempo real (do inglês: <i>Real time PCR</i>) |
| TGF | Fator de transformação de crescimento (do inglês: Transforming |
| | growth factor) |
| TNF | Fator de necrose tumoral (do inglês: Tumor necrosis factor) |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: Vascular |
| | endothelial growth factor) |
| SBF | Soro bovino fetal |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio (do inglês: Sodium dodecyl sulfate) |
| SDF | Fator derivado do estroma (do inglês: Stromal cell-derived factor 1) |
| | |

LISTA DE SÍMBOLOS

| % | Porcentagem |
|-----|---------------------|
| ± | Mais ou menos |
| × | Multiplicação |
| Rpm | Rotações por minuto |
| S | Segundos |
| μ | Micro |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| δ | Delta |
| γ | Gama |
| μL | Microlitro |
| dL | Decilitro |
| mL | Mililitro |
| mМ | Milimolar |
| μΜ | Micromolar |
| nM | Nanomolar |
| pg | Picograma |
| μg | Micrograma |
| mg | Miligrama |
| g | Grama |
| μm | Micrometro |

SUMÁRIO

| | REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
|------|---|----|
| 1 | JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO | 25 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 2.1 | Modelo experimental de obesidade | 26 |
| 2.2 | Análise da composição corporal | 27 |
| 2.3 | Teste de tolerância à glicose | 28 |
| 2.4 | Teste de tolerância à insulina | 28 |
| 2.5 | Coleta de sangue | 29 |
| 2.6 | Análise da morfologia dos adipócitos | 29 |
| 2.7 | Obtenção do sobrenadante dos tecidos adiposos subcutâneo | |
| | e epididimal | 30 |
| 2.8 | Dosagem das citocinas dos sobrenadantes de tecido adiposo - | 30 |
| 2.9 | Extração de RNA e análise da expressão gênica | 31 |
| 2.10 | Cultura de células | 32 |
| 2.11 | Migração celular <i>in vitro</i> | 32 |
| 2.12 | Ensaio de proliferação celular | 34 |
| 2.13 | Diferenciação adipogênica | 34 |
| 2.14 | Obtenção do extrato celular total e <i>Immunoblotting</i> | 35 |
| 2.15 | Citoquímica | 36 |
| 2.16 | Análise estatística | 36 |
| 3 | RESULTADOS | 37 |
| 3.1 | Avaliação da massa corporal e da composição corporal | 37 |
| 3.2 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | homeostase glicêmica | 38 |
| 3.3 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | produção de citocinas do tecido adiposo subcutâneo e | |
| | epididimal | 40 |
| 3.4 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | massa do tecido adiposo epididimal e morfologia dos | |
| | adipócitos | 42 |
| 3.5 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre as | |
| | características fenotípicas de células-tronco mesenquimais | 44 |

| 3.6 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
|-----|--|----|
| | frequência de células-tronco mesenquimais no sangue e no | |
| | tecido adiposo epididimal | 47 |
| 3.7 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | migração (<i>in vitro</i>) de células-tronco mesenquimais | 48 |
| 3.8 | Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a | |
| | expressão gênica de SDF-1α no tecido adiposo subcutâneo e | |
| | epididimal | 52 |
| 4 | DISCUSSÃO | 53 |
| | CONCLUSÃO | 58 |
| | REFERÊNCIAS | 59 |
| | ANEXO – Comissão de ética para cuidade e uso de animais | |
| | experimentais | 66 |

REVISÃO DA LITERATURA

Obesidade

A obesidade é um transtorno metabólico caracterizado pelo acúmulo de gordura corporal anormal ou excessivo, decorrente do desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético (ADAMS et al., 2006). Tal condição impõe sérios riscos à saúde, sendo o principal fator para o desenvolvimento de comorbidades associadas, tais como diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios músculo-esqueléticos e alguns tipos de câncer (endométrio, mama, cólon, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar e rim) (OMS, 2016).

Nos últimos quarenta anos, o número de obesos triplicou mundialmente. Somente em 2016, mais de 650 milhões de adultos (maiores de 18 anos) já eram obesos e mais de 40 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos já apresentavam sobrepeso ou obesidade. Atualmente, estima-se que até 2025, aproximadamente 18% dos homens e 21% das mulheres serão obesos (OMS, 2017). O aumento alarmante da incidência, a alta taxa de mortalidade e o custo exacerbado ao sistema de saúde fazem da obesidade um problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

Diversos fatores influenciam o desenvolvimento da obesidade, tais como: suscetibilidade genética e fatores ambientais (ingestão alimentar, taxa metabólica basal, sedentarismo e hábitos culturais); apesar deste caráter multifatorial, o aumento da prevalência da obesidade se dá, principalmente, pelo aumento na ingestão alimentar e pelo sedentarismo (ADAMS et al., 2006).

Dentre as alterações fisiopatológicas da obesidade que contribuem para a disfunção metabólica, destacam-se: a) o acúmulo exacerbado de gordura (sob a forma de triglicerídeos) no tecido adiposo que é capaz de controlar os níveis de ácidos graxos livre; b) a produção e secreção de adipocinas; e c) o recrutamento de células do sistema imune, principalmente monócitos/macrófagos, para o tecido adiposo que promovem a inflamação local e contribuem para a resistência à insulina (RENOVATO-MARTINS et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2009). Dessa forma, o

tecido adiposo desempenha um papel importante no desenvolvimento das enfermidades associadas a obesidade.

Tecido adiposo como um órgão metabolicamente ativo

É bem descrito que o tecido adiposo está amplamente distribuído por toda a extensão corporal e tem capacidade de expandir para acomodar o acúmulo de energia sob a forma de lipídeos. Essas são as principais características que discriminam o tecido adiposo de outros (GESTA et al., 2007). O tecido adiposo possui funções fisiológicas específicas, tais como: proteção contra lesões mecânicas, isolante térmico e reservatório energético, no entanto, ele também é caracterizado como o maior órgão endócrino do corpo, secretando diversas substâncias como hormônios, citocinas, substâncias vasoativas, dentre outras. (ETO et al., 2009).

O nicho do tecido adiposo é composto por adipócitos maduros, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos e células do sistema imune (LEE et al., 2010). Diversos estudos têm evidenciado que o tecido adiposo não é uniforme, ou seja, dependendo da sua localização corporal existem diferenças no seu perfil secretório e variação celular com fenótipos diferentes (COELHO et al., 2013; CHOE et al., 2016; GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

Existem dois principais tipos de tecidos adiposos, o tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Em humanos adultos, o TAM está localizado ao redor dos ombros e costelas, contribuindo para a geração de calor (CHOE et al., 2016).

O tecido adiposo branco (TAB) é formado por cerca de 50% de adipócitos e 50% de outros tipos celulares, tais como células-tronco, pré-adipócitos, células neurais, células endoteliais e leucócitos (GUSTAFSON e SMITH, 2015). Este tecido está compreendido em dois grandes depósitos, o subcutâneo e o visceral (WAJCHENBERG, 2000; CHOE et al., 2016). O tecido adiposo subcutâneo é o que possui maior depósito, representando cerca de 80 a 90% da gordura corporal, principalmente nas regiões do abdômem, glúteo e coxa (região femoral). Já o tecido

adiposo visceral está concentrado na região interna do abdômem, dividido ainda em mesentérico, omental, perirrenal, e em depósitos peritoneais (ARNER, 1997).

Dentre as células que compõem o tecido adiposo, os adipócitos recebem a influência de diversos sinais, dentre eles a insulina, cortisol e as catecolaminas, e em resposta, irão secretar substâncias que atuarão tanto local quanto sistemicamente (WAJCHENBERG, 2000).

Este tecido possui como sua principal característica a capacidade de adaptação e expansão em condições de excesso de energia; esta expansão pode ser tanto pelo número de células ou pelo volume delas, processos conhecidos como hiperplasia e hipertrofia (Quadro 1), respectivamente (PELLEGRINELLI et al., 2016), tais processos são regulados por fatores ambientais e genéticos (SPIEGELMAN e FLIER, 2001). Foi descrito pela primeira vez por Faust, em 1978, que em ratos a obesidade induzida por dieta resulta em obesidade persistente de forma puramente hiperplásica e não hipertrófica (FAUST et al., 1978).

Tecido adiposo: órgão endócrino

Dentre tudo que é secretado pelo tecido adiposo, a secreção mais importante é a dos ácidos graxos, que são liberados durante períodos onde o balanço energético é negativo, particularmente o jejum, porém outras moléculas lipídicas também são secretadas por este tecido; dentre elas podemos citar: as prostaglandinas (derivadas de gorduras poliinsaturadas) sintetizadas pelo próprio tecido adiposo, o colesterol e o retinol, que não são sintetizados no tecido adiposo, porém são estocados e liberados por esse tecido (TRAYHURN, 2007).

Na obesidade também ocorre liberação de ácidos graxos. Os ácidos graxos são um grupo de nutrientes importantes que irão participar do desenvolvimento e funcionamento do cérebro das funções cognitivas, como muitas comorbidades associadas à obesidade (câncer, diabetes e doenças cardiovasculares); também sendo precursores de eicosanóides, moduladores de base lipídica que irão regular, através de atividades pró e anti-inflamatórias, respostas imunes e inflamatórias (BARABINO et al., 2017).

Hotamisligil e colaboradores, na década de 90, descrevem pela primeira vez o aumento da expressão e secreção de TNF-α no tecido adiposo de animais obesos, que estava associado à inflamação, à obesidade e à resistência insulínica. Na mesma década foi realizada a descoberta da leptina, uma citocina também secretada por adipócitos que atua como hormônio controlador do equilíbrio energético corporal promovendo controle sobre a saciedade. A partir de então, o tecido adiposo é realmente reconhecido como órgão endócrino (HOTAMISLIGIL et al, 1995; ZHANG et al., 1994).

O tecido adiposo é capaz de secretar mais de 50 hormônios e moléculas sinalizadoras, que irão exercer seu papel biológico de maneira autócrina, parácrina ou sistêmica e que irão influenciar vários processos fisiológicos em relação à energia, metabolismo da glicose e imunidade (WAKI e TONTONOZ, 2007). As adipocinas podem apresentar propriedades pró ou anti-inflamatórias, podendo contribuir para a resistência à insulina.

Em indivíduos eutróficos, o tecido adiposo secreta preferencialmente adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e a interleucina 10 (IL-10). Essas adipocinas modulam funções fisiológicas, tais como: controle da homeostasia, através de mecanismos que incluem a regulação da ingestão calórica e balanço energético, ação da insulina, metabolismo dos lípidos e da glicose, angiogênese, remodelação vascular, regulação da pressão sanguínea e da coagulação (ATHYROS et al., 2010). Em contraste, o tecido adiposo de obesos libera principalmente citocinas próinflamatórias como TNF-α, IL-6, leptina, visfatina, resistina e angiotensina II (OUCHI et al., 2011), as quais modulam a resistência à insulina diretamente afetando a via de sinalização da insulina, ou indiretamente através da estimulação de vias inflamatórias (TILG e MOSCHEN, 2008). Ao longo do processo de hipertrofia do tecido adiposo, ocorre também o aumento desordenado na secreção destas adipocinas, o que irá promover a ativação de uma resposta inflamatória, que é considerada a principal responsável pelo desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade.

Muitos estudos têm relacionado a obesidade como um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau. Neste quadro, conhecido como metainflamação, a hipertrofia dos adipócitos é capaz de promover o aumento da infiltração de macrófagos no TAB e a elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias que

contribuem para a patogênese da resistência à insulina, pela inibição da adipogênese (UNGER et al., 2010; OUCHI et al., 2010).

Quadro 1 - Características da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos



Legenda: Quadro representativo das etapas de expansão do tecido adiposo por hiperplasia e hipertrofia. ATM: macrófagos do tecido adiposo; AGL: ácidos graxos livres. Fonte: Modificado de CHOE, et al. 2016

Adipogênese

A adipogênese é um processo em que células com características não especializadas, como por exemplo, os fibroblastos passam a adquirir funções específicas de adipócitos. A adipogênese depende da comunicação entre as próprias células e entre as células e seu microambiente (LEFTEROVA e LAZAR, 2009). A expansão de um determinado depósito de gordura depende da expressão de uma cascata de fatores transcricionais que, em última análise, permitem que as células se desenvolvam em adipócitos maduros com uma única gotícula de gordura (DROLET et al., 2008). Em modelos de camundongos obesos tem sido proposto que a adipogênese começa quando os adipócitos atingem um alto limite de volume (WANG et al., 2013).

A formação de novos adipócitos a partir de células precursoras é necessária para novos aumentos na capacidade de armazenamento de energia. Em seres humanos adultos, no entanto, o aumento da massa do tecido adiposo que provoca distúrbios metabólicos é principalmente devido a hipertrofia dos adipócitos. Na obesidade, a hipertrofia de adipócitos, a obesidade central e o acúmulo ectópico de gordura estão associados à pré-disposição a diabetes mellitus e a síndrome metabólica. O recrutamento de novos adipócitos pode prevenir essas alterações (GUSTAFSON et al., 2015).

Ao contrário do que Faust afirmava em 1978, hoje já se sabe que a hipertrofia dos adipócitos é precedida, muitas vezes, pelo aumento no recrutamento de novos adipócitos. Ao longo do desenvolvimento da doença, a heterogeneidade destas células acaba sendo reduzida e a hipertrofia aumenta. Este agravo na expansão do tecido adiposo de forma "saudável" acarreta a deposição ectópica de gordura que irá contribuir para o desenvolvimento da resistência insulínica e das comorbidades associadas (GUSTAFSON et al., 2015).

Como dito anteriormente, esta expansão do TAB é determinada pelo aumento no número de adipócitos (hiperplasia) e pelo tamanho deles (hipertrofia). Os indivíduos adultos com sobrepeso e baixo grau de obesidade (grau 1 e 2) apresentam hipertrofia, enquanto os com grau elevado de obesidade (grau 3) apresentam a hiperplasia destas células (SPIEGELMAN e FLIER, 1996). O recrutamento de novos adipócitos, no quadro de obesidade, ocorre principalmente em indivíduos "obesos metabolicamente saudáveis", que são os indivíduos que não apresentam alterações metabólicas como: aumento de pressão arterial, desenvolvimento de diabetes e os níveis de HDL reduzidos (STEFAN et al., 2008).

Os adipócitos são derivados de células tronco mesenquimais (CTMs) pluripotentes, a partir da adipogênese. Esta transformação é dividida em duas fases:

- a) fase de determinação: onde as CTMs se transformam em pré-adipócitos;
- b) fase de diferenciação: onde os pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos maduros, com uma única gota de gordura e adquirem a habilidade de responder a hormônios como a insulina.

Muitos estudos descrevem a regulação molecular da adipogênese, mas no que diz respeito aos mecanismos moleculares da fase de diferenciação ainda é pouco elucidado.

O estímulo da adipogênese *in vitro*, à partir de CTMs ou pré-adipócitos é feito por um coquetel de indução (insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina) que irá promover a ativação de uma cascata de fatores transcricionais, dos quais: C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- δ e PPAR- γ são importantes por induzir a expressão de genes essenciais do fenótipo de adipócitos, como: transportador de glicose (GLUT-4), proteína ligante de ácido-graxo (FABP4), lipoproteína lipase (LPL), perilipina, leptina e adiponectina (LEFTEROVA et al., 2008; TAKADA et al., 2009).

A adipogênese é um processo altamente controlado por fatores transcricionais, sinais hormonais e nutricionais. *In* vitro, uma vez que as células são apresentadas ao coquetel de diferenciação, ocorre a ativação de receptores de glicocorticóides – pela dexametasona, ativação de receptor de IGF-1 – pela insulina, e ativação da via do AMPc – pela isobutilmetilxantina (ROSEN et al., 2000).

Regulação transcricional da adipogênese

Como já descrito, a adipogênese é controlada por uma cascata transcricional formada pela família dos C/EBPs e do PPAR-γ, dentre os quais os reguladores

centrais da adipogênese são C/EBP-α e PPAR-γ (SIERSBAEK et al., 2010; TANG et al., 2012).

No início da adipogênese ocorre a expressão dos genes *c-jun*, *c-fos* e *c-myc* dando início a mitose pós período de confluência. Esta etapa é importante para que o desenovelamento das hélices do DNA, permitindo a ligação dos fatores de transcrição aos genes-alvo da modulação do fenótipo de adipócitos maduros (NTAMBI et al., 2000). Os primeiros fatores de transcrição a serem ativados, são o C/EBP- δ e C/EBP- β , sendo a ativação do primeiro mais rápida e a do segundo de forma mais gradual. Estes por sua vez irão ativar PPAR- γ e também induzirão a ativação de C/EBP- α . Uma vez ativados, C/EBP- α e PPAR- γ irão manter um *feedback* positivo sobre o outro para se manterem positivamente expressos, mesmo com a redução da expressão de C/EBP- δ e C/EBP- β (Quadro 2) (ROSEN et al., 2000).

As proteínas CCAAT (família C/EBPs) possuem papel importante na adipogênese. O C/EBP- α é expresso no tecido adiposo, fígado, pulmão, glândula adrenal e placenta; sendo importante na fase terminal da diferenciação e com sua ausência a resistência insulínica *in vitro*. C/EBP- β e C/EBP- δ são os primeiros fatores transcicionais que induzem o processo de adipogênese (MOSETI et al., 2016).

A família PPAR é constituída de 3 membros: α , β e γ . O PPAR- α é principalmente expresso no coração, rim e fígado; o PPAR- β está presente em muitos tecidos, porém suas funções ainda não estão bem elucidadas; e o PPAR- γ é altamente expresso em tecido adiposo branco e marrom, cólon, ceco e em macrófagos (MOSETI et al., 2016).

O PPAR- γ é o principal e mais importante fator de transcrição que regula a diferenciação de adipócitos, pois sem ele as células precursoras são incapazes de se diferenciar, sendo capaz de promover a adipogênese em células deficientes de C/EBP- α , porém o contrário não acontece, demonstrando assim o seu papel como "mestre da adipogênese" (ROSEN et al., 2000).

Quadro 2 – Modelo de diferenciação de adipócitos



Legenda: Esquema que descreve as etapas de diferenciação dos adipócitos, com as suas respectivas fases e fatores de transcrição em ação. IBMTX: Isobutilmetilxantina; Dexa: Dexametasona.

Fonte: Modificado de NTAMBI, et al. 2000.

Célula-tronco mesenquimal

As células-tronco são conhecidas pela sua capacidade de auto-renovação e pela capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. Estas células podem ser classificadas pela sua origem embrionária e adulta (DING et al., 2011).

As células-tronco podem ser do tipo hematopoiética (HSC, do inglês: *hematopoietic stem cell*), que são capazes de originar em células de linhagem sanguínea, como os monócitos, neutrófilos, linfócitos, eritrócitos e plaquetas (SAWAI et al., 2016).

Além das HSC, estão presentes no nicho da medula óssea, as células-tronco mesenquimais (CTMs). Pittenger e colaboradores, viram pela primeira vez, que as células-tronco de linhagem mesenquimal são responsáveis por 0.001 a 0.1% do nicho na medula óssea adulta. No mesmo trabalho, eles observaram que estas células possuem a capacidade de se expandir e se diferenciar á partir de estímulos específicos em: adipócitos, condrócitos e osteócitos (PITTENGER et al., 1999), além de células do músculo cardíaco, células do músculo liso, células endoteliais, células hepáticas, células neurais e células pancreáticas (LV et al., 2014). As CTMs podem ser obtidas de diferentes fontes, como: músculo esquelético, medula óssea, tendão, tecido adiposo, placenta, cordão umbilical e sangue do cordão umbilical (MA et al., 2013).

O primeiro artigo que cita as CTMs, no *Pubmed*, data de 1916 por Danchakoff, onde ele descreve a diferenciação das células no timo. Neste trabalho ele cita o potencial que estas células possuem em se diferenciar, porém ele também descreve que elas se diferenciam em linfócitos e cita que existe o tipo embrionário destas células (DANCHAKOFF, 1916).

O conceito aceito até hoje de CTMs vem do trabalho de Alexander Friedenstein, 1974, onde ele descreve que uma população muito pequena, cerca de 10⁴ a 10⁵ das células mononucleares da medula, quando aderidas ao plástico, se desenvolviam formando Unidades Formadoras de Colônias semelhantes a Fibroblastos (UFC-F). Após sua expansão *in vitro*, estas células foram introduzidas em modelos experimentais, onde observou-se a formação de osso, cartilagem e elementos estromais (FRIEDENSTEIN, 1974).

A partir de 1988, Owen e Friedenstein classificam então as células estromais da medula óssea, com possível natureza de célula-tronco, como "células-tronco estromais da medula óssea". O termo "células-tronco mesenquimais" foi proposto posteriormente (BIANCO et al., 2006).

As CTMs apresentam marcadores imunofenotípicos específicos (MEIRELLES et al., 2008). Segundo a *International Society for Cellular Therapy* a imunofenotipagem destas células só é validada pela identificação dos marcadores CD73, CD90, CD105 e a exclusão dos marcadores hematopoéticos CD14 ou CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79α e HLA-DR (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais da medula óssea, quando estimuladas são liberadas para a circulação e recrutadas para tecidos alvo, tais como: tecido adiposo, músculo esquelético, fígado, baço, entre outros. Uma vez nesses tecidos elas se diferenciam e contribuem para a regeneração e homeostase tecidual (KILIAN et al., 2010). Os mecanismos moleculares que medeiam este recrutamento ainda são pouco conhecidos. Uma hipótese, é que os tecidos produzem mediadores que irão atuar como um fator quimioatraente para essas células (KILIAN et al., 2010). Muitos fatores são capazes de influenciar a diferenciação e proliferação das CTMs, alguns deles são os fatores de crescimento, tais como: TGF-β, IGF, FGF, EGF, VEGF e Wnt (CAO et al., 2016).

Já é bem elucidado que as CTMs têm um grande potencial migratório para tecidos lesionados e, dentre os fatores que contribuem para essa migração, destacase o SDF-1.

O SDF-1α (fator 1α derivado do estroma) é membro da família de quimiocinas do tipo CXC e possui um receptor específico, o CXCR4. Vários estudos têm relatado o eixo SDF-1/CXCR4 como um eixo envolvido na invasão e metástase de tumores malignos e na migração de células-tronco (SAHA et al., 2017).

Chim e colaboradores demonstraram que o SDF-1α promoveu a migração de CTMs na regeneração óssea (CHIM et al., 2012). Um outro estudo demonstrou que o eixo SDF-1/CXCR4 promoveu a migração de CTMs para o pâncreas após pancreatite aguda (GONG et al., 2014).

Na obesidade induzida por dieta hiperlipídica, já foi descrito um aumento na expressão de SDF-1α no TAB. Este aumento de SDF-1α por sua vez, participa do recrutamento de macrófagos, um processo primordial para o estabelecimento da inflamação do tecido adiposo induzido pela obesidade e resistência insulínica sistêmica (KIM et al., 2014).

Já foi descrito que o SDF-1α é capaz de induzir a migração de CTMs através da ativação da via da PI3k/AKT (LIU et al., 2011). Sabe-se que as vias de sinalização PI3k/AKT (SCHMIDT et al., 2006), Rho/ROCK (LIN et al., 2013) e PKC (PICINICH et al., 2010) são as vias mais importantes envolvidas na migração de CTMs induzida por quimiocinas. Além disso, esta via de sinalização está relacionada a sobrevivência, proliferação, a apoptose e a diferenciação celular. (CHEN et al., 2011).

O perfil migratório destas células está intimamente ligado as conformações do citoesqueleto (POLLARD et al., 2003; CRAMER et al., 2010). Neste aspecto, a actina desempenha um papel fundamental na movimentação celular, além do envolvimento de outras proteínas estruturais (POLLARD et al., 2009).

Em uma publicação recente, nosso grupo demonstrou pela primeira vez que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica altera o microambiente da medula óssea, promovendo um microambiente inflamatório, comprometendo as células-tronco mesenquimais para um fenótipo adipogênico, porém sem induzir a diferenciação adipogênica na medula (SILVA et al., 2016).

1 JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO

Nosso grupo demonstrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a celularidade da medula óssea e afeta o seu microambiente, direcionando as células-tronco mesenquimais para um fenótipo adipogênico (SILVA et al., 2016). No entanto, não está claro se a obesidade afeta o perfil migratório e o recrutamento destas células para diversos tecidos.

Diante disto, o objetivo deste trabalho é avaliar o papel da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no recrutamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos animais utilizados neste estudo foram realizados de acordo com o Comitê de utilização e tratamento animal do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo nº CEUA: 024/2017).

2.1 Modelo experimental de Obesidade

Trinta camundongos C57BI/6J machos com 21 dias de vida, foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, sob condições controladas de ciclo claro/escuro de 12 por 12 horas, 60% de umidade, temperatura ambiente de 23 ± 1°C e livre acesso à ração e água.

Os animais do grupo controle (Grupo CHOW) e grupo obeso (Grupo HFD) foram mantidos em dieta normocalórica e hiperlipídica (45% Kcal proveniente de lipídeos), respectivamente, durante todo o experimento dos 21 aos 135 dias.

Os animais dos dois grupos foram eutanasiados aos 135 dias de vida. Desde a primeira semana de dieta, a massa corporal e a ingestão alimentar de todos os animais foram aferidos uma vez por semana. A descrição da composição da dieta encontra-se na tabela 1.



Quadro 3 - Linha do tempo das dietas utilizadas no estudo

Legenda: Após 21 dias de lactação, os animais foram agrupados em CHOW (dieta normocalórica até 135 dias), HFD (dieta hiperlipídica até 135 dias). A composição corporal foi avaliada aos 120

dias. Os testes de tolerância à glicose e à insulina foram realizados 7 dias antes do sacrifício, aos 128 dias de vida e a eutanásia aos 135 dias.

| Ingredientes | С | Н |
|--------------------|------|-------|
| Caseína | 200 | 200 |
| Colina | 2,5 | 2,5 |
| Cistina | 3 | 3 |
| Amido de milho | 398 | 185 |
| Sacarose | 100 | 100 |
| Óleo de soja | 70 | 70 |
| Banha | 0 | 132,5 |
| Minerais | 35 | 35 |
| Vitaminas | 10 | 10 |
| Amido dextrinizado | 132 | 61 |
| Celulose | 50 | 50 |
| Energia (Kcal/g) | 3,96 | 4,73 |

Tabela 1 - Composição das dietas (em gramas)

A composição da dieta controle foi baseada na AIN 93 (Reeves, Nielsen and Fahey 1993). Dieta controle normocalórica (CHOW), Dieta hiperlipídica (HFD). Os ingredientes para o preparo da ração foram comprados com a Pragsoluções Biociências (Jaú, SP).

2.2 Análise da composição corporal

Para avaliar a massa de gordura total e a massa de gordura livre, os animais foram submetidos a um equipamento de ressonância magnética nuclear para pequenos animais vivos, sem anestesia prévia. Os camundongos foram digitalizados usando o equipamento Whole Body Composition Analyzer, Bruker's Minispec LF90 TD-NMR (Rheinstetten, Alemanha), no Laboratório de Fisiologia Endócrina, IBRAG-UERJ.

Os camundongos foram colocados em um cilindro de plástico transparente (50 mm de diâmetro) e imobilizados pela inserção de um êmbolo ajustado no cilindro. O tudo foi então inserido na câmara de amostra do equipamento por aproximadamente 1 minuto, duração da varredura do equipamento. Os dados foram expressos em % de massa gorda e % de massa magra.

2.3 **Teste de tolerância à glicose**

Para avaliar a tolerância à glicose, o teste de tolerância (TTG) foi realizado ao final da tarde após, aproximadamente, 6 h de jejum. A glicemia de jejum foi avaliada pela coleta de uma gota de sangue após secção caudal. A seguir, foi realizada a injeção intraperitoneal de glicose na proporção de 2 g/kg de peso/animal. Foram realizadas subsequentes verificações da glicemia, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. Todas as alíquotas foram analisadas pelo aparato e glicofitas Accu Check Active, Roche®.

2.4 Teste de tolerância à insulina

Para a avaliação da tolerância insulínica, o teste de tolerância (TTI) foi realizado pela manhã. Inicialmente, avaliamos a glicemia dos animais (tempo 0) e, após essa verificação, foi administrada intraperitonealmente (i.p) insulina regular (Humulin insulina humana, Lilly), na dose de 0,5 U/Kg. A glicemia foi avaliada nos tempos de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, utilizando-se o aparato e glicofitas Accu Check Active, Roche®.

2.5 Coleta de sangue

Aos 135 dias, os animais foram mantidos em jejum por aproximadamente 12 horas e anestesiados com quetamina (50 mg/kg) (Syntec) e xilazina (20 mg/kg) (Syntec); o sangue foi coletado através de punção cardíaca com o auxílio de seringa e agulha contendo anticoagulante (EDTA 5% em PBS estéril). Após a coleta, o sangue foi centrifugado em tubos de ensaio a 3000 rpm por 10 minutos e o plasma foi coletado, aliquotado e estocado em freezer -80°C para dosagem de insulina. O pellet de hemácias foi lisado com cloreto de amônio (0,144 M) e centrifugado a 400 g por 10 minutos e lavado com PBS estéril, ao final o pellet lavado foi ressuspenso em álcool etílico 70% e guardado na geladeira para citometria.

2.6 Análise da morfologia dos adipócitos

Para análise histológica da morfometria dos adipócitos, o tecido adiposo epididimal dos animais foi fixado em solução de paraformaldeído 4% por 30 minutos, em seguida, embebidos em paraformaldeído 4% adicionado de sacarose 10%, por 30 min e, por último, os tecidos foram armazenados em tampão fosfato com 20% de sacarose à 4°C até o uso. Para a preparação das lâminas, as amostras foram incluídas em parafina e as secções histológicas (5 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina e contrastadas com eosina. Posteriormente, as lâminas foram avaliadas por microscopia ótica Olympus BX40, nos aumentos de 20x e 40x. As imagens obtidas foram analisadas com o *software* Image J, para mensuração do diâmetro dos adipócitos. Foi utilizado um número amostral de 3 animais por grupo.

2.7 Obtenção do sobrenadante dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal

Cerca de 50 mg de cada tecido adiposo foi extraído dos grupos CHOW E HFD e, em seguida, picotados com auxílio de uma tesoura cirúrgica em uma solução com DMEM (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) e M199 (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) (1:1) em ambiente estéril. Após esta etapa os tecidos foram deixados em placas de 24 poços por 24 horas em estufa à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as soluções contendo os tecidos foram tranferidos para microtubos (Axygen, Corning, EUA), centrifugados a 5000 g por 10 minutos à 4°C e, imediatamente, alíquotados e estocados a -80°C até o momento do uso.

2.8 Dosagem das citocinas dos sobrenadantes de tecido adiposo

A dosagem de TNF-α, IL-10 e Leptina dos sobrenadantes dos tecidos adiposos, subcutâneo e epididimal, foi realizada pelo método ELISA (do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando kits comercialmente disponíveis (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). As dosagens foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Corning, EUA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas à temperatura ambiente. A placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina, em seguida as amostras foram pipetadas na placa. A reação ocorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos de detecção foram diluídos em PBS, pH 7,4, com 0,1% de albumina bovina, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase e revelada com ABTS (2,2´ azino bis - 3 etil benzotiazolina 6 ácido sulfônico) (Sigma, St Louis, Missouri, EUA).

A leitura da placa foi realizada a cada 5 minutos, em leitor de placas (EnVision, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) com filtro para um comprimento de onda de 405 nm com correção a 650 nm. Todas as dosagens foram feitas em duplicatas.

2.9 Extração de RNA e análise da expressão gênica

O RNA total do tecido adiposo subcutâneo e epididimal foi extraído com o kit de extração de RNA da Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de RNA total foi realizada no espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare Life Sciences) por análise da absorbância a 260 nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada através do cálculo das razões A260/A280 e A260/A230, apresentadas pelo software do equipamento e que indicam possíveis contaminações da amostra por proteínas e compostos fenólicos. Após o tratamento com DNase (RQ1 RNase FreeDNase; Promega, São Paulo, SP, Brasil), a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total tratado, utilizando o High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1 µg de RNA total tratado foi adicionado a 10 µL do seguinte mix: tampão da enzima transcriptase reversa, 4 mM de dNTPs, 25 nM primers randômicos, 50 U de transcriptase reversa e 20 U de RNAse Inhibitor, em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25°C, por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. A reação foi realizada no Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). O PCR em tempo real foi realizado em termociclador Rotor Gene Q (Qiagen) utilizando-se um sistema de quantificação de fluorescência verde emitida por SYBR (Qiagen) para quantificar amplicons. As condições padrões de PCR foram 95°C por 5 minutos e, 30 ciclos a 95°C (5 s) e 60°C (10 s), seguido pela curva padrão de dissociação para identificação do número de amplicons. Os números de referência dos primers utilizados estão descritos na tabela 2.

| Tabela 2 – Primers | utilizados | no RT-F | 2°CR |
|--------------------|------------|---------|------|
|--------------------|------------|---------|------|

| Primer | N⁰ de acesso no <i>Gene Bank</i> | № de catálogo | |
|--------|----------------------------------|---------------|--|
| CXCL12 | NM_001012477 | QT00161112 | |
| GAPDH | NM_008084 | QT01658692 | |

2.10 Cultura de células

O isolamento de BM-MSC (do inglês: *bone marrow mesenchymal stem cell*) foi realizado através da extração do osso ilíaco dos animais CHOW e HFD. Em seguida, o osso foi macerado em um cadinho contendo solução de colagenase tipo 1 0,1% (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) e DNAse 100 ug/mL (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) em DMEM completo (10% de soro fetal bovino) (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) e incubado por 1 hora, à 37°C. Após a incubação, essa solução foi filtrada em filtros *cell strainer* de poro 100 µm (Falcon, Corning, EUA) e o material resultante da digestão com a colagenase foi coletado em tubos de ensaio e centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos a 10°C. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspenso em solução de cloreto de amônio (0,144 M) em PBS e novamente centrifugado. Ao final, o pellet foi ressuspenso em DMEM 15% de SBF e 2 mM de glutamina e a suspensão de células foi transferida para garrafa de cultura (25 cm²), mantida em estufa à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. As células foram utilizadas até a segunda passagem.

2.11 Migração celular in vitro

A quimiotaxia de BM-MSCs foi realizada em câmara de Boyden de 48 poços (Neuroprobe Microchemotaxis System, Gaithersburg, EUA), utilizando um filtro de policarbonato livre de PVP de 8 µM (GE, Fairfield, EUA). Como estímulo quimotático

foi utilizado 28,5 μ L de SDF-1 α (10nM), adicionado no poço inferior da câmara. As BM-MSCs (3,5 x 10⁵ células/350 μ L) foram ressuspensas em meio DMEM e adicionadas (50 μ L de volume em triplicata) nos poços superiores da câmara, seguida de incubação por 4 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células que migraram em direção a parte inferior da câmara ficaram retidas na membrana de policarbonato e foram fixadas, coradas (Diff Quick – Baxter Travenol Laboratories) e contadas através de microscopia óptica (Olympus BX41, Tóquio, Japão), no aumento de 100x em cinco campos escolhidos aleatoriamente. Os resultados foram representativos de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata.

Quadro 4 – Desenho esquemático da câmara de Boyden modificada



Legenda: No esquema: A) vista superior; B) vista lateral; C) C1: parte superior da câmara, C2: membrana protetora de polietileno, C3: membrana de policarbonato, C4: parte inferior da câmara; D) detalhe de um poço da câmara contendo células.

3.12 Ensaio de proliferação celular

As células foram semeadas em placas de 96 poços (1 x 10⁵ células/poço) em meio DMEM 15% SBF + 2 mM de glutamina. Após atingirem, aproximadamente, 80% de confluência, o meio foi trocado por DMEM 1% SBF e permanecerem na estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, *overnight*, a fim de que as células sincronizassem seu ciclo celular. Após este tempo, as células foram incubadas por 48 horas à 37°C em atmosfera a 5% de CO₂, respeitando os seguintes grupos: Basal (DMEM 1% SBF), FGF (3 ng/mL em DMEM 1% SBF) e Controle positivo (DMEM 10% SBF). Nas últimas 6 horas de incubação foi acrescentado o reagente MTT (5 ng/mL) (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) e a incubação foi realizada à 37°C protegida da luz. A quantificação colorimétrica correspondente ao comprimento de onda de 570 nm dos cristais de formazan foi feita em leitor de placa após a lise das células em álcool isopropílico 70%) (EnVision, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA).

2.13 Diferenciação adipogênica

As células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) em meio DMEM 15% SBF + 2 mM de glutamina. Após atingirem, aproximadamente, 80% de confluência, o meio foi trocado por DMEM 1% SFB e permanecerem na estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 12 h a fim de que as células sincronizassem seu ciclo celular. Após esse período, a diferenciação em adipócitos foi induzida através da incubação das células em meio de diferenciação (MD), contendo 250 nM de Dexametasona, 20 nM de Insulina e 500 μ M de IBMTX em meio DMEM 10% SFB por 10 dias. Ao final deste período, as células foram fixadas em paraformaldeído 10% por 30 minutos. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril. Em seguida foi adicionado aos poços, álcool isopopílico (60%) por 5 minutos. Imediatamente após a retirada do isopropanol, foi adicionada a solução de Oil Red O (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) e deixado sob cuidadosa agitação por 5 minutos. Após esse período, os poços foram cuidadosamente lavados com água estéril para retirada do exceso de Oil Red O.

A quantificação colorimétrica correspondente ao comprimento de onda de 510 nm do Oil Red O foi feita em leitor de placa após a extração do corante com álcool isopropílico (EnVision, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA).

2.14 Obtenção do extrato celular total e Immunoblotting

O extrato celular total foi obtido a partir da incubação das células com tampão RIPA (Tris HCI 50 mM, NaCI 150 mM, EDTA 5 mM, Pirofosfato de sódio 30 mM, NaF 50 mM, Ácido deoxicólico 0,5%, SDS 0,1%, Triton X-100 1%, H₂O q.s.p). A quantificação do extrato total das BM-MSC foi determinada pelo método de BCA (ThermoScientific). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em tampão de amostra (Tris HCI 50 mM em pH 6,8, SDS 1%; ß-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%) por 5 minutos a 95°C e, em seguida congeladas para serem submetidas ao SDS PAGE.

Amostras contendo 15 µg de proteína para extrato total foram separadas por eletroforese em gel a 10% de poliacrilamida contendo SDS (SDS PAGE). Um padrão de diferentes pesos moleculares foi utilizado em todas as eletroforeses por SDS PAGE (Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Biosciences) para estimar o peso molecular das proteínas. Após a separação eletroforética, foi realizada a transferência das proteínas para membranas de PVDF (PVDF Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech) por 30 minutos, utilizando-se o sistema Semi seca (BIO RAD). Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1 hora, com solução de bloqueio contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma) e T-TBS (Tween 20 0,1% em TBS), seguidas de incubação overnight com os anticorpos primários específicos. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: mouse anti actina (Millipore 1501; 1:1000), goat anti AKT (Santa Cruz 7126; 1:1000), mouse anti pAKT (Millipore 05-1003; 1:1000), rabbit anti CEBP-α (Abcam 40764; 1:500), rabbit anti PPAR-y (Santa Cruz 7196; 1:500). Em seguida, as membranas foram lavadas com T-TBS e então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com biotina (1:5000) por 1 hora. Após essa incubação, as membranas foram lavadas com T-TBS (Tween 20 0,1% em TBS) e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:5000, Zymed, S. San Francisco, California, USA), por 1 hora.

As proteínas imunorreativas foram detectadas no sistema ChemiDocTM – (BIO RAD) através do uso do substrato ECL (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA). As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o *software Image J*® (NIH, Bethesda, USA). As membranas foram "reblotadas" com anticorpo anti actina, utilizado como controle de carregamento.

2.15 Citoquímica

Foram plaqueadas 1 x 10⁶ células/poço sobre lamínulas redondas de vidro em placa de 24 poços, com DMEM 15% SBF até atingirem confluência. Após isso as lamínulas foram retiradas dos poços, com auxílio de pinça, e lavadas em PBS estéril 1x em temperatura ambiente, fixadas com paraformaldeído 4% + sacarose 4% por 20 minutos e então novamente lavadas, cuidadosamente, com PBS estéril 1x. Foi colocado 300 µL de Triton X-100 0,2% sobre elas, por 5 minutos, em compartimento de câmara úmida.

As lamínulas foram incubadas com 100 µL de Faloidina/TRITC (1:1000) em PBS estéril 1x por 2 horas em câmara úmida. Após este tempo foram novamente lavadas, cuidadosamente, com PBS estéril 1x. A lâmina foi montada com 10 µL de DAPI-Prolonger, para marcação de núcleo, e vedadas com esmalte de unha. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Olympus BX40, digitalizadas e processadas através dos *softwares* ImageJ® e Adobe Photoshop.

2.16 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram analisados estatisticamente utilizando análise de teste t paramétrico com pós teste de Mann Whitney ou ANOVA com análise de varância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de p < 0,05. Os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da massa corporal e da composição corporal

A massa corporal foi cuidadosamente monitorada nos dois grupos. A dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo na massa corporal dos animais (grupo HFD), a partir dos 75 dias de idade, quando comparados com o grupo CHOW (CHOW 22,97 \pm 0,99 g; HFD 28,31 \pm 1,75 g) (Fig. 1A). A avaliação do consumo de ração demonstrou que os animais HFD apresentaram um maior consumo calórico quando comparados ao grupo CHOW (Fig. 1B). A análise da composição corporal demonstrou que a dieta hiperlipídica aumentou significativamente o percentual de gordura corporal (CHOW 10,15 \pm 0,59 g; HFD 25,41 \pm 1,86 g) (Fig. 1C) dos animais, com uma consequente diminuição da massa magra (CHOW 72,75 \pm 0,79 g; HFD 62,44 \pm 1,25 g) (Fig. 1D).







C)

D)

Legenda: Massa corporal ao longo do desenvolvimento (A). Consumo da dieta ao longo do tempo (B). Percentual de massa de gordura corporal (C). Percentual de massa magra (D). CHOW: dieta controle; HFD: dieta hiperlipídica. Os gráficos apresentam média ± E.P.M, n = 6 por grupo. *p< 0.05, ***p< 0.001

3.2 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a homeostase glicêmica

A glicemia dos animais de todos os grupos foi avaliada após jejum de aproximadamente seis horas. Os animais obesos (grupo HFD) apresentaram um aumento significativo da glicemia de jejum, quando comparados ao grupo CHOW (CHOW: 94,11 ± 3,36 mg/dl; HFD: 160,67 ± 9,57 mg/dl) (Fig. 2A). Os níveis séricos de insulina também estão aumentados nos animais do grupo HFD (CHOW: 56,28 ± 7,99 pM/ml; HFD: 577,40 ± 25,37 pM/ml) (Fig 2B), quando comparados ao grupo CHOW. A partir desses resultados, foi avaliada a tolerância à glicose e a insulina nesses animais e observou-se que os animais do grupo HFD apresentaram uma menor eficiência na captação de glicose e na sensibilidade à insulina, quando comparados aos animais do grupo CHOW (Fig. 2C e 2D).

Figura 2 - Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre os indicadores da homeostase glicêmica



Legenda: Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a homeostase glicêmica. Glicemia de jejum após 6h (A). Insulina plasmática analisada por ELISA (B). Teste de tolerância à glicose (TTG) após infusão peritoneal de 2g/kg de peso por animal (C). Teste de tolerância à insulina (TTI) após infusão peritoneal de 0,5U/Kg de peso por animal. Os gráficos apresentam média ± E.P.M, n = 10 animais por grupo. *p< 0.05, **p< 0.01

3.3 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a produção de citocinas do tecido adiposo subcutâneo e epididimal

Nosso grupo demonstrou anteriormente que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (45% das calorias provenientes de lipídeos) induz um aumento nos níveis séricos de leptina, contudo não promove alterações nos níveis circulantes de citocinas como TNF-α, IL-6, IL-10 (Silva et al., 2016; Faria et al., manuscrito submetido).

Aqui, foi avaliada a secreção de leptina, TNF- α e IL-10 pelo tecido adiposo subcutâneo e epididimal dos animais obesos. Conforme demonstrado na figura 3A, 3B e 3C, respectivamente, não se observou alterações nos níveis de leptina (CHOW: 598,42 ± 77,95 pg/dl; HFD: 775,80 ± 100,22 pg/dl), IL-10 (CHOW: 2293,31 ± 257,03 pg/ml; HFD: 1354,99 ± 259,01 pg/ml) e TNF- α (CHOW: 471,92 ± 117,08 pg/ml; HFD: 415,10 ± 68,19 pg/ml) no sobrenadante do tecido adiposo subcutâneo do grupo HFD, quando comparado ao grupo CHOW. Em relação à produção dessas citocinas pelo tecido adiposo epididimal, foi evidenciado um aumento significativo na secreção de leptina (CHOW: 418,01 ± 77,12 pg/dl; HFD: 1049,02 ± 200,82 pg/dl) e IL-10 (CHOW: 1286,09 ± 110,77 pg/ml; HFD: 1933,07 ± 164,90 pg/ml), contudo nenhuma alteração foi observada na produção de TNF- α (CHOW: 369,26 ± 93,85 pg/ml; HFD: 298,12 ± 61,99 pg/ml) por este tecido (Fig. 3D, 3E e 3F, respectivamente).















Legenda: Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a produção de adipo/citocinas pelos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal. Níveis de leptina no tecido adiposo subcutâneo (A), no tecido adiposo epididimal (D). Nivéis de IL-10 no tecido adiposo subcutâneo (B), no tecido adiposo epididimal (E). Níveis de TNF-α no tecido adiposo subcutâneo (C) e no tecido adiposo epididimal (F). Os gráficos apresentam média ± E.P.M, n = 6 a 9 animais por grupo. *p< 0.05

3.4 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a massa do tecido adiposo epididimal e morfologia dos adipócitos

É sabido que a obesidade induz um aumento da massa do tecido adiposo que se caracteriza pelo aumento do volume dos adipócitos (HERBERG et al., 1974). Corroborando os dados da literatura, houve um aumento significativo da massa do tecido adiposo epididimal nos animais do grupo HFD em comparação com o grupo CHOW (CHOW: $0,227 \pm 0,018$ g; HFD: $1,208 \pm 0,075$ g) (Fig. 4A). Além disso, foi evidenciada no tecido adiposo deste grupo (grupo HFD) a presença de adipócitos maiores (hipertrofia), quando comparados ao grupo CHOW (CHOW: $25,50 \pm 1,87$ µm; HFD: $68,23 \pm 4,26$ µm) (Fig. 4B e 4C).





B)





Legenda: Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a massa do TA epididimal e a morfologia dos adipócitos, com dieta hiperlipídica sobre a área dos seus adipócitos. Massa do tecido adiposo epididimal (A). Imagem representativa do tecido adiposo epididimal corado com hematoxilina e eosina (B). Quantificação da área dos adipócitos feita com auxílio do *software* ImageJ (C). CHOW: dieta controle; HFD: dieta hiperlipídica. Os gráficos apresentam média ± E.P.M, n= 3 por grupo. **p< 0.01, ***p< 0.001

3.5 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre as características fenotípicas de células-tronco mesenquimais

A fim de caracterizar as células-tronco com perfil mesenquimal, foi avaliado os marcadores de superfície CD90.2, CD105 e CD45. Conforme observado na figura 5A, não houve diferença na frequência de células-tronco mesenquimais na medula óssea (CD90.2⁺, CD105⁺, CD45⁻) entre os grupos (CHOW: 1,34 ± 0,47; HFD: 1,41 ± 1,04) (Fig. 5A). Esse perfil está de acordo com os parâmetros estipulados pela *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) para a caracterização de células-tronco mesenquimais.

Outro aspecto importante na caracterização de células-tronco mesenquimais é a sua capacidade proliferativa. Para determinar o potencial proliferativo das CTMs isoladas da medula óssea, foi realizado um ensaio de proliferação por MTT. Após 48 horas, as CTMs isoladas da medula óssea dos animais HFD apresentaram uma maior taxa de proliferação quando comparadas as do grupo CHOW. Conforme esperado, a incubação com FGF (3 ng/mL) (48 horas) induziu a proliferação das CTMs do grupo controle, contudo não afetou a capacidade proliferativa das CTMs isoladas do grupo HFD (CHOW: 1 ± 0 ; CHOW + FGF: 1,32 ± 0,05; HFD: 1,51 ± 0,07; HFD + FGF: 1,53 ± 0,07) (Fig. 5B).

Com o intuito de investigar a capacidade de diferenciação das CTMs isoladas da medula óssea, foi induzida a diferenciação adipogênica através da incubação com meio de diferenciação (10 dias) seguida por marcação com Oil Red O. Conforme esperado, a indução da diferenciação promoveu um aumento do acúmulo de lipídeos nas CTMs de ambos os grupos (CHOW: 1 ± 0 ; CHOW Diff: $1,32 \pm 0,08$; HFD: $1,13 \pm 0,04$; HFD Diff: $1,40 \pm 0,12$) (Fig. 5C). Em conjunto, foi avaliada a expressão de CEBP- α (CHOW: $4,20 \pm 0,84$; HFD: $4,13 \pm 0,96$) e PPAR-y (CHOW: $6,04 \pm 0,90$; HFD: $4,95 \pm 1,22$) nessas células, porém nenhuma alteração na expressão desses marcadores pró-adipogênicos foi detectadada entre os grupos (Fig 5D e 5E).

Figura 5 – Caracterização das células-tronco mesenquimais no modelo de obesidade





D)

E)





Legenda: Caracterização das células tronco mesenquimais em modelo de obesidade. Frequência das células tronco mesenquimais na medula óssea (A) n = 3 animais por grupo. Resposta

proliferativa das BM-MSC diante do estímulo com FGF (3ng/mL) (B) n = 12 a 20 animais por grupo. Acúmulo de Oil Red sobre as BM-MSC diferenciadas ou não (C) n = 6 animais por grupo. Expressão proteica de C/EBP- α (D) e PPAR- γ (E) n = 9 animais por grupo. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M. *p< 0.05, **p< 0.01, ****p< 0.0001

3.6 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a frequência de células-tronco mesenquimais no sangue e no tecido adiposo epididimal

Uma vez que a obesidade não afetou a frequência de CTMs na medula óssea (Fig. 5A), porém induziu um aumento na sua proliferação (Fig. 5B), foi avaliada a frequência dessas células no sangue e no tecido adiposo epididimal dos animais. Como observado na figura 6A, houve um aumento significativo na presença dessas células no sangue periférico do grupo HFD (CHOW: $0,05 \pm 0,02$; HFD: $1,41 \pm 0,48$) (Fig. 6A), entretanto não se observou diferenças significativas na frequência de CTMs no TA epididimal entre os grupos (CHOW: $16,59 \pm 1,65$; HFD: $23,49 \pm 8,21$) (Fig. 6B).

Figura 6 – Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica na frequência de células-tronco mesenquimais no sangue e tecido adiposo epididimal



Legenda: Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica na frequência de CTMs no sangue e tecido adiposo epididimal. Frequência de células tronco mesenquimais no sangue (A) e no tecido adiposo epididimal (B) n = 3 animais por grupo. Os gráficos apresentam média ± E.P.M. *p< 0.05.

3.7 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a migração (*in vitro*) de células-tronco mesenquimais

Até o momento, nossos dados indicam que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a capacidade proliferativa das CTMs isoladas da medula óssea (Fig. 5B), contudo não aumenta a frequência dessas células nesse microambiente (Fig. 5A). Nossos dados também demonstram um aumento na presença dessas células na circulação dos animais HFD (Fig. 6A), sem alterar a frequência delas no tecido adiposo epididimal (Fig. 6B).

Tendo em vista esse conjunto de resultados, foi avaliada a capacidade migratória (*in vitro*) das CTMs isoladas da medula óssea de animais CHOW e HFD. Conforme observado na figura 7A, as CTMs isoladas dos animais HFD apresentam um aumento na sua capacidade migratória, mesmo na ausência do estímulo quimiotático. A migração de CTMs induzida por SDF1- α (10 nM) foi significativamente maior em ambos os grupos, quando comparadas aos seus respectivos controles (ausência de estímulo). No entanto, a comparação entre os grupos CHOW + SDF1- α e HFD + SDF1- α mostrou que a quimiotaxia induzida no grupo HFD foi significativamente menor (CHOW: 14,81 ± 0,40; CHOW + SDF: 26,62 ± 0,79; HFD: 17,54 ± 0,37; HFD + SDF: 21,33 ± 0,39) (Fig. 7A).

O SDF-1 α é uma quimiocina que atua através do seu receptor CXCR4. A fim de investigar se o aumento da quimiotaxia de CTMs isoladas de animais HFD está relacionada a alterações na expressão do receptor CXCR4, foi avaliada a expressão desse receptor nas CTMs isoladas da medula óssea de animais CHOW e HFD. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de CXCR4 nas CTMs entre ambos os grupos (CHOW: 601,33 ± 63,14; HFD: 742,33 ± 72,58) (Fig. 7B).

A via de sinalização da PI3K/AKT é capaz de regular a proliferação, a migração e a diferenciação celular. Para elucidar se o aumento da migração de CTMs observada no grupo HFD estava relacionada a ativação dessa via, foi realizado um ensaio para avaliar a ativação de AKT (Serina 473) nessas células. Como demonstrado na figura 7C, as CTMs isoladas da medula óssea de animais HFD apresentam um aumento significativo na fosforilação de AKT, quando comparadas com o grupo CHOW (CHOW: $1,22 \pm 0,08$; HFD: $1,49 \pm 0,10$) (Fig. 7C).

Outro fator determinate para a migração celular é a mobilização do citoesqueleto de actina. De acordo com os dados apresentados na figura 7D, as CTMs isoladas da medula óssea dos animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentam nitidamente alterações na dinâmica do seu citoesqueleto, o que sugere que estas células apresentam um perfil mais migratório em relação às células do grupo CHOW (Fig. 7D).

Figura 7 – Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no perfil migratório das células-tronco mesenquimais



C)







CHOW



HFD

Legenda: Efeito da obesidade sobre o perfil migratório. Ensaio de quimiotaxia por câmara de Boyden modificada usando como indutor quimiotático SDF-1α ou DMEM (A) n = 6 a 8 por grupo. Expressão do receptor de SDF-1α sobre as BM-MSC (B) n = 3 animais por grupo. Expressão de AKT total sob a fosforilada em BM-MSC (C) n = 9 animais por grupo. Microscopia de fluorescência com marcação de filamentos de actina (em vermelho) e núcleo (DAPI, em azul) nas BM-MSC n = 3 animais por grupo. Os gráficos apresentam média ± E.P.M. *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001 Quadro 5 – Modelo proposto para o efeito da obesidade sobre a via de sinalização na migração de células-tronco mesenquimais



Legenda: Modelo proposto da via PI3K/AKT na migração de células tronco mesenquimais. SDF-1α quando ligado ao seu receptor CXCR4 ativa a via da PI3k que por sua vez pode ativar mais outras duas vias, a da AKT e Rac-1. AKT uma vez ativada pode aumentar a espressão de RhoA alterando assim o citoesqueleto de actina. A AKT também fosforila p70S6K, o que aumenta a expressão de Rac-1 e CDC42, levando à ativação de PAK1 e alterações do citoesqueleto. PI3K também age diretamente sobre Rac-1 (Adaptado de: Chen et al, 2013)

3.8 Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica de SDF-1α no tecido adiposo subcutaneo e epididimal

Uma vez que o SDF-1α é descrito como a principal quimiocina envolvida na migração de CTMs para tecidos alvo, foi avaliada a expressão gênica deste fator quimiotático nos tecidos adiposo subcutâneo e epididimal, contudo não foi detectada nenhuma alteração na expressão de SDF-1α entre os grupos, em nenhum dos tecidos avaliados. (Fig. 8A e B).

Figura 8 – Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica do SDF-1α nos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal



Legenda: Expressão do RNAm de SDF1-α no tecido adiposo subcutâneo (A) n = 7 animais por grupo, e no tecido adiposo epididimal (B) n = 3 animais por grupo. Os gráficos apresentam média ± E.P.M.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou que os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo da massa corporal total associado a um aumento da massa de gordura e um menor conteúdo de massa magra. Esse conjunto de alterações é indicativo de um quadro de obesidade. A prevalência de sobrepeso e obesidade tem aumentado nos últimos anos, sobretudo em países em desenvolvimento e já é bem estabelecida a relação entre o aumento da adiposidade corporal e complicações metabólicas, como a resistência à insulina, que ocasionam de desenvolvimento comorbidades como diabetes mellitus, doenças 0 cardiovasculares e alguns tipos de câncer.

Nossos resultados somam-se a estudos anteriores que utilizam modelos animais de indução de obesidade pelo uso de dietas hiperlipídicas, as quais são comumente utilizadas por mimetizarem os eventos fisiopatológicos associados ao aumento da adiposidade (CARROLL et al., 2006). Dentre esses eventos, destaca-se um comprometimento no metabolismo de glicose que pode levar a um quadro de resistência à insulina (KIM e FELDMAN, 2015). Em nosso estudo, observamos que os animais HFD apresentaram uma menor captação de glicose e intolerância à insulina, quando comparados ao grupo controle, além de um aumento na glicemia de jejum e na insulinemia.

A avaliação do tecido adiposo demonstrou que a dieta hiperlipídica induziu a hipertrofia dos adipócitos, um resultado esperado uma vez que o aumento da ingestão calórica junto ao aumento do consumo de gorduras saturadas provenientes da dieta hiperlipídica promove um ganho da massa de tecido adiposo (ROSSI et al., 2010; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

É bem descrito que o tecido adiposo epididimal é capaz de secretar diversos peptídeos bioativos, coletivamente denominados adipocinas. Dentre essas adipocinas, destacam-se a leptina, a adiponectina, a resistina, a apelina e a visfatina; quimiocinas, tais como MCP -1 e IL-8; dentre outras citocinas próinflamatórias tais como IL-6, IL-1 β , angiotensina-II e TNF- α ; e citocinas antiinflamatórias tais como IL-10 (OLEFSKY e GLASS., 2010). Em relação às adipocinas, observamos que os animais do grupo HFD apresentaram um aumento dos níveis de leptina e IL-10 no sobrenadante do tecido adiposo epididimal. Como esperado, o aumento da produção de leptina se dá proporcionalmente à massa de tecido adiposo e é capaz de modular, dentre outras coisas, a resposta imune e inflamatória na obesidade. Embora vários trabalhos destaquem o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias na obesidade, outros fatores como a IL-10 são sintetizados pelo tecido adiposo epididimal obeso (FAIN et al., 2004). O aumento dos níveis séricos de IL-10 já foi reportado em mulheres obesas e parece estar associado a uma tentativa de inibir a produção contínua de citocinas pró-inflamatórias (ESPOSITO et al., 2003). Desta forma, sugerimos que o aumento da produção de IL-10 pelo TA epididimal seja um mecanismo compensatório para diminuir a inflamação neste tecido, a qual pode ter a participação da leptina. Em relação ao TA subcutâneo, não foi observada nenhuma diferença nos níveis de leptina e IL-10 no seu sobrenadante.

Outro fator de destaque é que não foram observadas diferenças nas concentrações de TNF-α nos sobrenadantes dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal. Apesar da maioria dos estudos associarem as complicações observadas no TA obeso ao aumento dos níveis locais e sistêmicos de TNF-α (MAACH et al., 2004; OUCHI et al., 2011), nossos dados corroboram estudos recentes que questionam essa associação. No estudo de Kim e colaboradores, publicado em 2015, foi demonstrado que o aumento do tamanho dos adipócitos pode levar a resistência insulínica de forma independente da inflamação (KIM et al., 2015). Outro estudo mostrou que em camundongos tratados com clodronato (para depleção de macrófagos), a dieta HFD induziu a hipertrofia dos adipócitos e ocasionou a resistência à insulina independentemente da ativação da resposta inflamatória (LEE et al., 2011).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica não induziu aumento nos níveis sistêmicos de TNF-α e IL-6, contudo esses animais apresentaram deficiência na captação de glicose e prejuízos na sinalização de insulina no músculo esquelético (FARIA et al., artigo submetido).

O armazenamento de lipídeos pelo tecido adiposo depende da capacidade de expansão dos adipócitos (hipertrofia) e/ou o recrutamento de novas células precursoras (hiperplasia) (GUSTAFSON et al., 2015). Em humanos, a obesidade hipertrófica está associada ao acúmulo de gordura abdominal, depósito de gordura ectópica e à síndrome metabólica (GUSTAFSON et al., 2009). Em um estudo anterior, demonstramos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promoveu

um microambiente pró-inflamatório na medula óssea dos animais, caracterizado por um aumento na produção de TNF-α pelas células tronco hematopoiéticas. O aumento da produção desta citocina estava associado com a indução de um fenótipo pró-adipogênico das células tronco mesenquimais, sem induzir a diferenciação de adipócitos na medula óssea (SILVA et al., 2016). A partir desses resultados, postulamos a hipótese de que a obesidade poderia interferir com o recrutamento das células tronco mesenquimais da medula óssea.

No presente estudo, demonstramos que as CTMs isoladas da medula óssea de animais obesos apresentam uma alta capacidade proliferativa, sem alterações na expressão de seus marcadores fenotípicos, nem na sua capacidade de diferenciação em adipócitos. A indução da proliferação com FGF (3 ng/mL) não foi capaz de aumentar a proliferação das CTMs do grupo HFD pois, possivelmente, estas células já alcançaram o máximo da sua capacidade proliferativa logo, não responderam a indução da proliferação pelo fator de crescimento. Experimentos adicionais vêm sendo conduzidos no nosso laboratório a fim de avaliar a ativação dos mecanimos celulares envolvidos na proliferação de CTMs isoladas da medula óssea de animais obesos.

Até o momento, poucos estudos caracterizaram as CTMs em condições eutróficas e obesas (PACHÓN-PEÑA et al., 2016). É importante ressaltar que essas células são propostas como uma ferramenta promissora para terapias regenerativas e, alterações na expressão de seus antígenos de superfície pode definir um perfil específico (BROOKE, et al., 2007). O Comitê de células tronco mesenquimais e teciduais da *International Society for Cellular Therapy* propõe três critérios mínimos para a definição de CTMs, nós definimos as CTMs utilizadas neste estudo de acordo com esses critérios. Além disso, avaliamos a expressão de dois dos principais fatores de transcrição envolvidos na diferenciação adipogênica, o CEBP- α e o PPAR-y. Não foram observadas diferenças na expressão dessas proteínas entre as CTMs do grupo HFD quando comparadas ao grupo CHOW.

Em condições de enfermidades agudas e dano tecidual, observa-se um aumento do número de CTMs circulantes que migram em direção ao tecido alvo aonde irão se diferenciar e contribuir para a homeostase tecidual (KILIAN et al., 2010). A fim de investigar se a obesidade interfere no recrutamento das CTMs da medula óssea para o tecido adiposo, avaliamos a frequência dessas células no sangue e no tecido adiposo visceral epididimal dos animais. Nossos dados mostram que a obesidade induziu um aumento significativo na frequência das CTMs circulantes, no entanto não observamos diferença no conteúdo dessas células no tecido adiposo epididimal dos animais HFD em relação ao grupo CHOW. Até o momento, nossos resultados sugerem que a obesidade promove o recrutamento das CTMs da medula óssea, contudo essas células não parecem estar migrando em direção ao tecido adiposo epididimal. Tendo em vista o papel do SDF-1α como fator quimiotático para as CTMs (BAGGIOLINI et al., 1997), investigamos a expressão do RNAm desta quimiocina nos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal. Nenhuma alteração significativa foi detectada na expressão gênica de SDF-1α entre os grupos, em ambos os tecidos. A partir desses resultados, pretendemos avaliar a presença de CTMs, assim como a expressão gênica de SDF-1α em outros tecidos, tais como o tecido adiposo subcutâneo, o fígado e o músculo esquelético.

Avaliamos ainda a capacidade migratória (*in vitro*) das CTMs isoladas da medula óssea e a via de sinalização envolvida nesta resposta. Observamos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica induz um aumento da migração das CTMs isoladas do grupo HFD, na ausência de estímulo quimiotático (migração randômica). Como esperado, o SDF-1α (10 nM) induziu a migração das CTMs do grupo CHOW, contudo não afetou a migração das células isoladas dos animais obesos. Como dito anteriormente, o SDF-1α é capaz de induzir a migração de células tronco mesenquimais a partir da sua ligação ao receptor CXCR4 e da ativação da via PI3K/AKT (SAHA et al., 2017, LIU et al., 2011). No presente estudo, não observamos alterações significativas na expressão de CXCR4 nas CTMs entre os grupos, porém detectamos um aumento significativo na ativação da AKT nas células isoladas do grupo HFD, além disso, observamos um aumento na polimerização do citoesqueleto de actina nas CTMs deste grupo. Em conjunto, esses resultados indicam que a obesidade parece induzir um perfil migratório das CTMs da medula óssea.

Na literatura, poucos trabalhos investigaram o papel da obesidade na migração de CTMs. Em sua grande maioria, esses estudos utilizam células tronco isoladas do tecido adiposo, relacionando o seu papel à cicatrização de feridas, transplantes e, principalmente, à progressão tumoral (STESSUK et al. 2016; VAN DE VYVER et al., 2016; KATO et al., 2015; ZHANG et al., 2010). Desta forma, fica clara a necessidade de mais estudos que elucidem o papel da obesidade sobre o

recrutamento de CTMs para tecidos distintos e suas possíveis implicações na fisiopatologia das comorbidades.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluímos – até o momento – que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica induz um quadro de resistência à insulina e promove alterações morfológicas e funcionais no tecido adiposo epididimal, independente da presença de metainflamação. Além disso, foi demonstrado que a obesidade promove um perfil mais migratório das CTMs isoladas da medula óssea, contudo não altera o conteúdo dessas células no tecido adiposo epididimal.

Perspectivas

Como perspectivas para o aperfeiçoamento do presente estudo e futura publicação em periódico da área, pretendemos:

- a) Avaliar a frequência das CTMs no tecido adiposo subcutâneo;
- b) Avaliar a expressão gênica de SDF-1α no fígado e no músculo esquelético;
- c) Investigar a via de sinalização envolvida na migração de CTMs após o estímulo com SDF-1α.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Kenneth F. et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 763-778, 2006.

ARNER, P. Regional adipocity in man. **Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 191-192, 1997.

ATHYROS, Vasilios G. et al. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems?. **Current drug targets**, v. 11, n. 1, p. 122-135, 2010.

BAGGIOLINI, Marco; DEWALD, Beatrice; MOSER, Bernhard. Human chemokines: an update. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 675-705, 1997.

BARABINO, Stefano et al. The role of systemic and topical fatty acids for dry eye treatment. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2017.

BIANCO, Paolo et al. [6]-Postnatal Skeletal Stem Cells. **Methods in** enzymology, v. 419, p. 117-148, 2006.

BROOKE, Gary et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 846-858, 2007.

CAO, Songying et al. Comparative Study on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Between Fetal and Postnatal Rat Spinal Cord Niche. **Cell transplantation**, v. 25, n. 6, p. 1115-1130, 2016.

CARROLL, Joan F.; ZENEBE, Woineshet J.; STRANGE, Taylor B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65-72, 2006.

CHEN, J. Multiple signal pathways in obesity-associated cancer. **Obesity** reviews, v. 12, n. 12, p. 1063-1070, 2011.

CHIM, Harvey et al. Stromal-cell-derived factor (SDF) 1-alpha in combination with BMP-2 and TGF- β 1 induces site-directed cell homing and osteogenic and chondrogenic differentiation for tissue engineering without the requirement for cell seeding. **Cell and tissue research**, v. 350, n. 1, p. 89-94, 2012.

CHOE, Sung Sik et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, 2016. COELHO, Marisa; OLIVEIRA, Teresa; FERNANDES, Ruben. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science: AMS**, v. 9, n. 2, p. 191, 2013. CRAMER, Louise P. Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 7, p. 628-632, 2010.

DANCHAKOFF, Vera. The differentiation of cells as a criterion for cell identification, considered in relation to the small cortical cells of the thymus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 24, n. 1, p. 87-105, 1916.

DING, Dah-Ching; SHYU, Woei-Cherng; LIN, Shinn-Zong. Mesenchymal stem cells. **Cell transplantation**, v. 20, n. 1, p. 5-14, 2011.

DOMINICI, M. L. B. K. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DROLET, R. et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. **International journal of obesity**, v. 32, n. 2, p. 283-291, 2008.

ESPOSITO, Katherine et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1055-1058, 2003.

ETO, Hitomi et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 124, n. 4, p. 1087-1097, 2009.

FAIN, John N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273-2282, 2004.

FAUST, IRVING M. et al. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 235, n. 3, p. E279, 1978.

FONSECA-ALANIZ, Miriam H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRIEDENSTEIN, Alexander J. et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331-340, 1974.

GESTA, Stephane; TSENG, Yu-Hua; KAHN, C. Ronald. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-256, 2007.

GONG, Jian et al. The SDF-1/CXCR4 axis regulates migration of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells towards the pancreas in rats with acute pancreatitis. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 5, p. 1575-1582, 2014.

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro et al. Obesity. **Nature Reviews**, v. 3, n. 17034, p. 1-18, 2017.

GUSTAFSON, Birgit et al. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. **American Journal of Physiology-Endocrinology** and **Metabolism**, v. 297, n. 5, p. E999-E1003, 2009.

GUSTAFSON, Birgit et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends** in Endocrinology & Metabolism, v. 26, n. 4, p. 193-200, 2015.

GUSTAFSON, Birgit; SMITH, Ulf. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 1, p. 27-35, 2015.

GUTIERREZ, Dario A.; PUGLISI, Michael J.; HASTY, Alyssa H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current diabetes reports**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2009.

HERBERG, L. et al. Dietary-induced hypertrophic–hyperplastic obesity in mice. **Journal of lipid research**, v. 15, n. 6, p. 580-585, 1974.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HOTAMISLIGIL, Gokhan S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409, 1995.

KATO, Sumie et al. Leptin stimulates migration and invasion and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: an explanation for poor outcomes in obese women. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21100, 2015.

KILIAN, Kristopher A. et al. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 11, p. 4872-4877, 2010.

KIM, Bhumsoo; FELDMAN, Eva L. Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. **Experimental & molecular medicine**, v. 47, n. 3, p. e149, 2015.

KIM, Dayea et al. CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. **Diabetologia**, v. 57, n. 7, p. 1456-1465, 2014.

KIM, Jong In et al. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. **Molecular and cellular biology**, v. 35, n. 10, p. 1686-1699, 2015.

LEE, Mi-Jeong; WU, Yuanyuan; FRIED, Susan K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 4, p. 371, 2010.

LEE, Yun Sok et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet–induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-2483, 2011.

LEFTEROVA, Martina I. et al. PPARγ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. **Genes & development**, v. 22, n. 21, p. 2941-2952, 2008.

LEFTEROVA, Martina I.; LAZAR, Mitchell A. New developments in adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 107-114, 2009.

LIN, Mei-Na et al. Involvement of PI3K and ROCK signaling pathways in migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through human brain microvascular endothelial cell monolayers. **Brain research**, v. 1513, p. 1-8, 2013.

LIU, Xiaolei et al. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. **Protein & cell**, v. 2, n. 10, p. 845-854, 2011.

LV, Feng-Juan et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 32, n. 6, p. 1408-1419, 2014.

MA, S. et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 2, p. 216-225, 2014.

MAACHI, M. et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. **International journal of obesity**, v. 28, n. 8, p. 993-997, 2004.

MEIRELLES, Lindolfo da Silva; CAPLAN, Arnold I.; NARDI, Nance Beyer. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

MOSETI, Dorothy; REGASSA, Alemu; KIM, Woo-Kyun. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 1, p. 124, 2016.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

NTAMBI, James M.; YOUNG-CHEUL, Kim. Adipocyte differentiation and gene expression. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3122S-3126S, 2000.

OLEFSKY, Jerrold M.; GLASS, Christopher K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 219-246, 2010.

OUCHI, Noriyuki et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

OUCHI, Noriyuki et al. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 454-457, 2010.

PACHON-PENA, Gisela et al. Obesity determines the immunophenotypic profile and functional characteristics of human mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Stem cells translational medicine**, v. 5, n. 4, p. 464-475, 2016.

PELLEGRINELLI, Vanessa; CAROBBIO, Stefania; VIDAL-PUIG, Antonio. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1075-1088, 2016.

PICINICH, Sonia C.; GLOD, John W.; BANERJEE, Debabrata. Protein kinase C zeta regulates interleukin-8-mediated stromal-derived factor-1 expression and migration of human mesenchymal stromal cells. **Experimental cell research**, v. 316, n. 4, p. 593-602, 2010.

PITTENGER, Mark F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POLLARD, Thomas D.; BORISY, Gary G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-465, 2003.

POLLARD, Thomas D.; COOPER, John A. Actin, a central player in cell shape and movement. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1208-1212, 2009.

REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY JR, George C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. 1993.

RENOVATO-MARTINS, Mariana et al. Microparticles derived from obese adipose tissue elicit a pro-inflammatory phenotype of CD16+, CCR5+ and TLR8+ monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 1, p. 139-151, 2017.

ROSEN, Evan D. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes &** development, v. 14, n. 11, p. 1293-1307, 2000.

ROSSI, Andrea S.; LOMBARDO, Yolanda B.; CHICCO, Adriana G. Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: effects of fish oil. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 209-217, 2010.

SAHA, Achinto et al. Proinflammatory CXCL12–CXCR4/CXCR7 Signaling Axis Drives Myc-Induced Prostate Cancer in Obese Mice. **Cancer research**, v. 77, n. 18, p. 5158-5168, 2017.

SAWAI, Catherine M. et al. Hematopoietic stem cells are the major source of multilineage hematopoiesis in adult animals. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 597-609, 2016.

SCHMIDT, Annette et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 24, n. 7, p. 1750-1758, 2006.

SIERSBAEK, Rasmus; NIELSEN, Ronni; MANDRUP, Susanne. PPARγ in adipocyte differentiation and metabolism–Novel insights from genome-wide studies. **FEBS letters**, v. 584, n. 15, p. 3242-3249, 2010.

SILVA, Simone Vargas et al. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. **Obesity**, v. 24, n. 12, p. 2522-2532, 2016.

SPIEGELMAN, Bruce M.; FLIER, Jeffrey S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. **Cell**, v. 87, n. 3, p. 377-389, 1996.

SPIEGELMAN, Bruce M.; FLIER, Jeffrey S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

STEFAN, Norbert et al. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. **Archives of internal medicine**, v. 168, n. 15, p. 1609-1616, 2008.

STESSUK, Talita et al. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 7, p. 511-520, 2016.

TAKADA, Ichiro; KOUZMENKO, Alexander P.; KATO, Shigeaki. Wnt and PPARγ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 8, p. 442-447, 2009.

TANG, Qi Qun; LANE, M. Daniel. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 715-736, 2012.

TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular medicine**, v. 14, n. 3-4, p. 222, 2008.

TRAYHURN, Paul. Adipocyte biology. **Obesity reviews**, v. 8, n. s1, p. 41-44, 2007.

UNGER, Roger H. et al. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 209-214, 2010.

VAN DE VYVER, M. et al. Delayed wound healing and dysregulation of IL6/STAT3 signalling in MSCs derived from pre-diabetic obese mice. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 426, p. 1-10, 2016.

WAJCHENBERG, Bernardo Léo. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WAKI, Hironori; TONTONOZ, Peter. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 2, p. 31-56, 2007.

WANG, Qiong A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1338-1344, 2013.

WHO (World Health Organization). **Fact sheet: obesity and overweight**. 2017. Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/ Acesso em: 25 de novembro de 2017.

WHO (World Health Organization). Obesity and overweight. Fact sheet. 2016. N°311. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/ Acesso em: 25 de novembro de 2017.

ZHANG, Yan; BELLOWS, Charles F.; KOLONIN, Mikhail G. Adipose tissuederived progenitor cells and cancer. **World journal of stem cells**, v. 2, n. 5, p. 103, 2010.

ZHANG, Yiying et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ANEXO – Comissão de ética para cuidade e uso de animais experimentais



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel da obesidade e da suplementação dietética com óleo de chia (Salvia hispanica L) sobre os mecanismos moleculares e funcionais que regulam a adipogênese e o recrutamento de células tronco da medula óssea e suas possíveis implicações sobre o desenvolvimento das comorbidades", registrada com o nº 024/2017, sob a responsabilidade de Simone Vargas da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 28/03/2017.

| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Vigencia da autorização | 28/03/2021 |
| Espécie/linhagem/raca | Camundongo C57/Bl06 |
| Nº de animais | 80 |
| Peso/Idade | 32 g / 30 dias |
| Sexo | Macho |
| Origem | Biotério setorial |

Rio de Janeiro, 28 de Março de 2017.

. CAL

Patricia idante

Prof. Dr. Alex C. Manhäes Coordenador CEUA/IBRAG/UERJ

Profa, Dra. Patricia C. Lisboa Vice-Coordenadora CEUA/IBRAG/UERJ

http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica ceua.ibrag@yahoo.com.br