

Blundell, J.E.; Latham, C.J. 1978. Pharmacological manipulation of feeding: possible influences of serotonin and dopamine on feed intake. Central Mechanisms of Anorexic Drugs, New York: Raven Press, p. 3-109.

INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE RAÇÃO HIPERLIPÍDICA RESTRITA EM MAGNÉSIO NA ADIPOSIDADE E NA HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATOS

TEIXEIRA, P.D.S.^{1*}; LOBO, A.R.¹; SALES, A.L.C.C.¹; DE CARLI, E.¹; PEREIRA, R.M.R.²; TAKAYAMA, L.²; SÁ, L.R.M.³; COLLI, C.¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 05508-000 São Paulo – SP, Brasil. *E-mail: pdsteixeira@usp.br

²Faculdade de Medicina– Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 01246-903 São Paulo – SP, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 05508-900 São Paulo – SP, Brasil.

Introdução: O tecido adiposo do indivíduo obeso é caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia do adipócito, alterações responsáveis pela expansão do tecido. A hipertrofia antecede a hiperplasia e acontece para atender à necessidade de armazenamento de gordura adicional da dieta [1,2]. Estas alterações são seguidas pelo aumento da angiogênese, pela infiltração de células do sistema imunológico, pela produção elevada de matriz extracelular e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias durante a progressão da inflamação crônica [3,4]. A expansão do tecido adiposo em indivíduos obesos, principalmente o visceral, também está associada a um quadro inflamatório crônico subclínico [5,6]. Sabe-se que um padrão alimentar caracterizado pelo consumo elevado de lipídios (com predomínio de lipídios saturados) e de carboidratos simples, associado ao consumo reduzido de fibras alimentares, de compostos bioativos e de micronutrientes, pode levar, fundamentalmente, a alterações no peso corporal [7]. Nesse aspecto tem sido sugerido que o sobrepeso e a obesidade também sejam decorrentes de inadequações alimentares em longo prazo, não apenas associadas ao excesso, mas também às deficiências nutricionais [8,9]. A avaliação do consumo alimentar de populações tem demonstrado, que indivíduos com excesso de peso apresentam baixo consumo de magnésio (Mg) [10,11,12]. Neste contexto, alterações no status de Mg, como resultado da inadequação dietética do mineral, vêm sendo associadas com alteração de indicadores de estresse oxidativo e de inflamação [13,14,15]. Desta forma, a hipótese aventada no presente trabalho é de que o consumo excessivo de lipídios resulta na expansão do tecido adiposo e promove a instalação de quadro inflamatório neste, agravado quando há associação de restrição dietética de Mg. **Material e métodos:** O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP (Protocolo CEUA nº 371). Ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos, pesando entre 180-200g, da linhagem *Wistar Hannover*, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP, foram mantidos em gaiolas semimetabólicas individuais, de aço inoxidável, em ambiente com temperatura e umidade controladas (22°C; 55%, respectivamente), com ciclos de claro/escuro de 12 h. Rações experimentais, semipurificadas e peletizadas, baseadas na formulação descrita pela empresa Harlan Teklab Laboratories (Madison, WI, EUA) para ratos em crescimento, foram adquiridas por importação e acondicionadas em câmara fria (~4°C). As rações do grupo controle (CON) foram elaboradas com 7% de calorias provenientes de lipídeos (óleo de soja). As rações hiperlipídicas foram elaboradas com 30 g/kg de lipídeos na forma de óleo de soja, suplementada com 310 g/kg na forma de banha (aproximadamente 60% de calorias

provenientes de lipídeos), uma com concentração adequada de Mg (500 mg de Mg/Kg de ração) e outra com restrição de 70% de Mg (150 mg de Mg/Kg de ração). Após sete dias de adaptação, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais (CON, HF [adequado em Mg] e HF[Mg] [restrito em Mg]). Ração e água (desmineralizada) foram oferecidas *ad libitum*. Após nove dias de experimento, os animais do grupo controle passaram a receber a ração *ad libitum* (CON) ou pareada (PF) pelo consumo médio (em gramas) animais dos grupos hiperlipídicos. O consumo foi registrado e calculado diariamente considerando a oferta e a sobra de ração; o peso corporal foi verificado e registrado a cada dois dias. Aos 60 dias de experimento os animais foram submetidos à eutanásia após anestesia por injeção intraperitoneal com solução de anestésicos (xilazina, 25 mg/kg; quetamina, 10 mg/kg; 1:2). Os animais foram necropsiados para exame macroscópico de órgãos. Fragmentos do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foram coletados e fixados em solução tamponada de formalina 10%. Após fixação de 24 h, os fragmentos foram processados segundo técnica padrão e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 15 µm. O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, utilizando microscópio óptico (Zeiss, modelo Primo Star, Thornwood, EUA). As imagens digitais foram adquiridas com microscópio Eclipse Ni-U (Nikon, Japão) acoplado à câmara digital refrigerada DS-U3 (Nikon, Japão) e software NIS-elements para captura de imagens. Os cortes histológicos das regiões epididimal e retroperitoneal foram analisados quanto à presença de processo inflamatório, à intensidade deste processo e o tipo celular predominante envolvido; também quanto à presença de estruturas *crown-like*, adipócitos multivacuolizados e alterações circulatórias. A intensidade das alterações histopatológicas foi avaliada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro da normalidade, 1 = alterações mínimas, 2 = alterações em grau moderado e 3 = alterações em grau marcante. O tamanho do adipócito (volume e área) foi medido com o emprego do recurso de contagem do *software* Image J (National Institute of Health, Maryland, USA), após decalque das células e remoção do fundo. **Resultados:** Após o dia nove de experimento, os grupos controle e os dois grupos hiperlipídicos apresentaram diferenças no consumo de ração; por este motivo, foi criado um grupo controle pareado, de modo que o consumo de ração entre os grupos pudesse ser comparado. Ao final do experimento foi observado maior ganho de peso dos animais dos grupos hiperlipídicos quando comparados ao grupo PF sem, contudo, existir diferenças entre si (grupos HF e HF[Mg]). Como esperado, o grupo HF[Mg] teve menor ingestão de Mg em relação a todos os grupos, sendo que o consumo de Mg do grupo HF foi semelhante ao do PF.

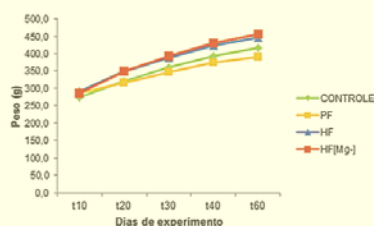


Figura 1 - Evolução do ganho de peso de animais que receberam rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF[Mg-]) durante 60 dias de experimento

Foi observado maior peso de gordura corporal nos animais dos grupos hiperlipídicos em relação aos do grupo PF, independentemente da restrição de Mg.

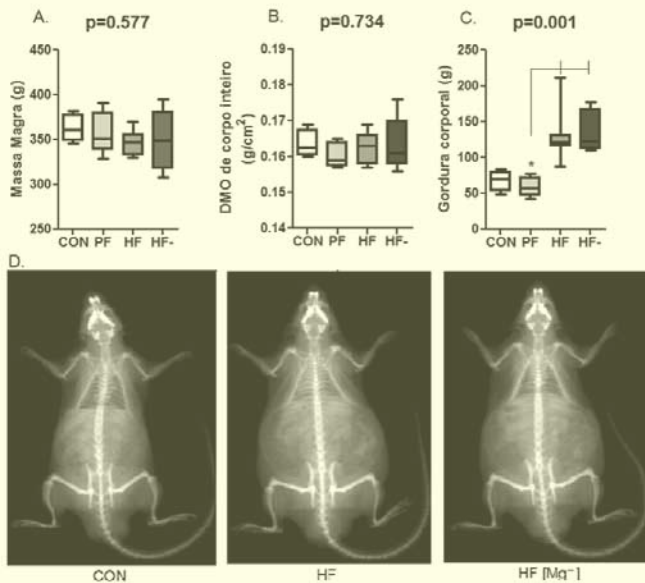


Figura 2 - Composição corporal de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada ou restrita em Mg (HF e HF[Mg-]) após 52 dias de experimento. Em (A) massa magra (g), em (B) Densidade mineral óssea (DMO) (g/cm²), em (C) gordura corporal (g). Em (D) imagem gerada pelo DXA, ilustrando aumento de gordura corporal na região abdominal dos animais dos grupos que receberam ração hiperlipídica. Valores considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. A comparação entre os grupos foi feita usando o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc de Dunn's

Observou-se maior número (por campo de 900μ²) e menor área de adipócitos no tecido adiposo dos animais do grupo controle em relação aos dos grupos hiperlipídicos. Estes resultados foram confirmados pelo maior diâmetro de Feret (grupos HF), medida definida como a distância entre duas linhas tangenciais paralelas e usada para avaliar projeções de um objeto tridimensional sobre um plano bidimensional, estimando o volume da célula.

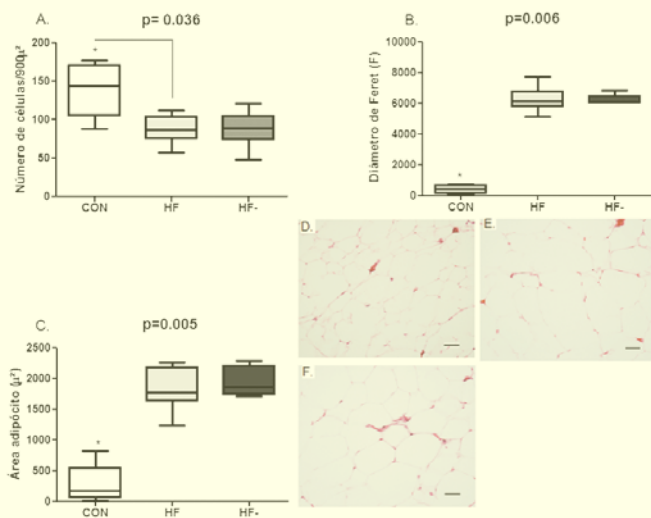


Figura 3 - Parâmetros histomorfométricos e aspecto histológico do tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos que receberam rações controle (CON) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF). Em (A) observa-se a comparação do número de adipócitos por campo microscópico de 900 μ²; em (B) o diâmetro de Feret e em (C) a área do adipócito. Estas medidas foram obtidas por ferramenta do software Image J, a contagem de células foi feita manualmente. O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunn's. De D-F: Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal. Observar tamanho e número de adipócitos no campo de 20x. D. Grupo CON; E. Grupo HF; F. Grupo HF-. HE, barra= 100 μm

O exame histopatológico do tecido adiposo revelou focos de esteatite com predomínio de macrófagos e de células adiposas com citoplasma multivacuolizado nos grupos HF, independente da restrição de Mg.

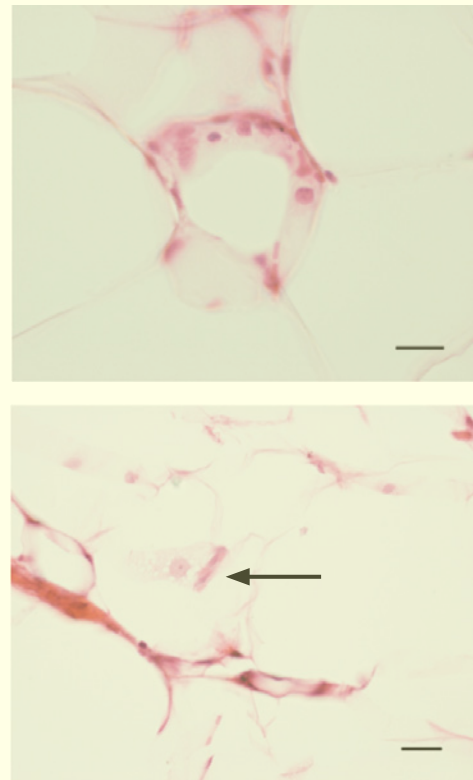


Figura 4 - Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo HF. (A) Foco de esteatite discreta com predomínio de macrófagos; (B) Em destaque, adipócito com citoplasma multivacuolizado. HE, barra= 25 μm

Conclusão: O consumo de dieta hiperlipídica nas condições experimentais testadas foi suficiente para promover expansão do tecido adiposo, secundária à hipertrofia do adipócito, independentemente da restrição dietética de Mg. Entretanto, esta alteração não foi acompanhada por processo inflamatório evidente. Nas condições experimentais deste estudo a restrição de Mg não agravou as alterações observadas. **Agradecimentos:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo No. 2012/16284-5) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo No. 481539/2012-3).

Referências

FAUST, I.M.; JOHNSON, P.R.; STERN, J.S.; HIRSCH, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *American Journal of Physiology*, v.235, 1978.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A.E.; CUSHMAN, S.W.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Computational Biology*, v.5, 2009.

OUCHI, N.; PARKER, J.; LUGUS, J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disorders. *Nature reviews*, v.11, 2011.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of Leukocyte Biology*, v.88, 2012.

HAGITA, S.; OSAKA, M.; SHIMOKADO, K.; YOSHIDA, M. Adipose inflammation initiates recruitment of leukocytes to mouse femoral artery: role of adipose-vascular axis in chronic inflammation. *Plos One*, v.6, n.5, 2011.

KARALIS, K.P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS Journal*, v. 276, 2009.

BES-RASTROLLO, M.; DAM, R.M.; MARTINEZ-GONZALES, M.A.; LI, T.Y.; SAMPSON, L.L.; HU, F.B. Prospective study of dietary energy density and weight gain in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.88, 2008.

ALBEIRTI, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*, v.366, 2005.

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, E.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. *Obesity Surgery*, v. 21, 2011.

CAHILL, E.; SHAHIDI, M.; SHEA, J.; WADDEN, D.; GULLIVER, W.; RANDELL, E.; VASDEV, S.; SUN, G. High Dietary Magnesium Intake Is Associated with Low Insulin Resistance in the Newfoundland Population. *Plos One*, v. 8, n.3, 2013.

JARVANDI, S.; GOUGEON, R.; BADER, A.; DASGUPTA, K. Differences in food intake among obese and nonobese women and men with Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 30, n.4, 2011.

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, E.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. *Obesity Surgery*, v. 21, 2011.

O ENVOLVIMENTO DO C-TERMINUS DA PROTEÍNA S100A9 NA ANGIOGÊNESE, FORMAÇÃO DE TUBOS E PROGRESSÃO TUMORAL

MORAES, N.F.¹; MELO, R.L.²; SAMPAIO, S.C.¹; GIORGI, R¹

¹Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Brasil

²Laboratório de Proteômica Funcional, Instituto Butantan, Brasil

Introdução: Foi demonstrado que tanto a proteína S100A9 inteira, quanto o peptídeo sintético idêntico à porção C-terminal dessa proteína murina (pS100A9m) induzem efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória [1]. Ainda, o pS100A9m inibe as funções de células peritoneais aderentes de camundongo [2; 3], células estas cruciais na interação entre as células tumorais e as células estromais no microambiente tumoral. O crescimento do tumor não é dependente apenas das células tumorais, mas às interações entre essas células, matriz extracelular e células do estroma, resultando em metástase [4]. Foi demonstrado que o complexo S100A8/A9 tem sido constantemente associado à malignidade [5]. Ainda, ensaios realizados *in vitro* demonstraram que o complexo S100A8/A9 em altas concentrações 20–250µg/ml (aproximadamente 1–10µM) exibe propriedades inibitórias sobre o crescimento de diferentes tipos de células tumorais de camundongos e humanas, além de promover a citotoxicidade e apoptose destas células [6]. Apesar dessas evidências, até o momento ainda não foi investigado o efeito do pS100A9m sobre a progressão tumoral e angiogênese. Portanto, o objetivo do presente estudo foi a avaliação do efeito *in vitro* do peptídeo da S100A9m em eventos envolvidos na angiogênese e crescimento tumoral. **Material e métodos:**

Proliferação: 5x10⁴ células endoteliais tímicas (tEnd.1) foram incubadas por 1h com meio RPMI ou com pS100A9m (0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço). Depois, as células foram incubadas por 24h com RPMI, coradas com azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. As células de tumor de Walker 256 (LLC) foram tratadas com o pS100A9m nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço nas mesmas condições. **Migração (wound healing):** 1x10⁶ células tEnd.1 foram plaqueadas em laminulas sensibilizadas com colágeno tipo I e após sua confluência foi realizada a interrupção da monocamada celular. As células foram incubadas com RPMI ou com o pS100A9m nas mesmas concentrações mencionadas acima por 1h. Em seguida, incubadas apenas com RPMI 1% por 24h. Células migradas para o espaço vazio foram contadas em microscopia de luz. **Adesão:** Placas sensibilizadas com fibronectina-3µg/poço, colágeno tipo I-10µg/poço ou laminina-10µg/poço foram incubadas por 1h com BSA 1%. Células tEnd.1 (1x10⁵), pré-tratadas ou não por 1h com pS100A9m (0,585; 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço), foram aderidas por 1h às placas. Depois, foram incubadas com MTT por 3h e com SDS por 18h e a adesão avaliada por ELISA. **Formação de tubos:** Placas polimerizadas com Matrigel foram incubadas por até 6h com 2,5x10⁴ células tEnd.1, pré-tratadas ou não por 1h com o pS100A9m (2,35 ou 4,7µM/poço). Em outro experimento, o pS100A9m permaneceu no ensaio por todo o período da formação dos tubos.

As formações tubulares foram fotografadas em microscopia de luz e contadas.

Resultados: Ensaio de proliferação: As concentrações de 0,585; 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço do pS100A9m foram capazes de inibir a proliferação de tEnd.1, quando comparadas ao grupo controle. Suas porcentagens de inibição foram 51%, 36%, 56% e 43%, respectivamente. Já a concentração de 9,4µM/poço do peptídeo não alterou a proliferação das células endoteliais - Figura 1. Em relação à proliferação de células LLC, o pS100A9m inibiu esse parâmetro nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço, sendo as porcentagens de inibição 27,5%, 34% e 33%, respectivamente - Figura 2.

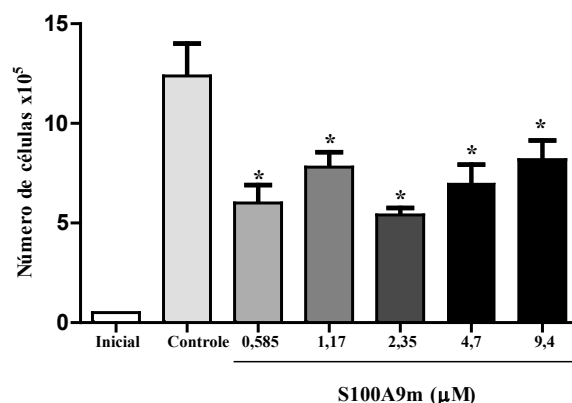


Figura 1 - Efeito do pS100A9m nas concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço sobre a proliferação de 5x10⁴ células endoteliais tímicas (tEnd.1). *p<0,05 em relação ao grupo controle

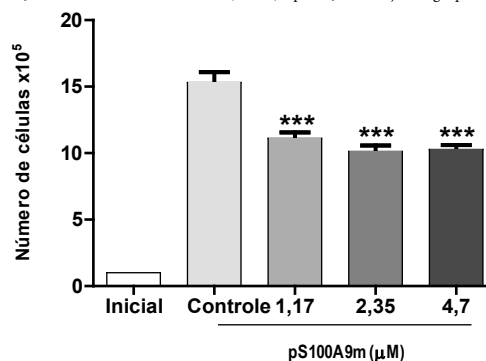


Figura 2 - Efeito do pS100A9m nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço sobre a proliferação de 5x10⁴ células de tumor de Walker 256 (LLC). ***p<0,001 em relação ao grupo controle

Ensaio de wound healing: Com relação à migração das células endoteliais, conforme demonstrado na Figura 3A, foi observada uma ação inibitória do pS100A9m nas concentrações de 0,585µM/poço (25%); 1,17µM/poço (23%); 2,35µM/poço (37%); 4,7µM/poço (21%) ou 9,4µM/poço (28%), quando comparado com o controle. A concentração de 2,35µM/poço induziu efeito inibitório estatisticamente diferente das outras concentrações do pS100A9m avaliadas. As Figuras 3B, 3C e 3D são fotomicrografias representativas das culturas celulares utilizadas para avaliar a migração de células tEnd.1 pelo método do *wound healing*. A Figura 3B corresponde ao tempo 0, período em que a monocamada foi interrompida. A Figura 3C corresponde ao grupo controle, células incubadas apenas com meio de cultura, em que foi observada a migração das células endoteliais tímicas para o campo vazio 24 horas após a interrupção da monocamada. A Figura 3D representa o grupo tratado com o pS100A9m (2,35µM/poço) por 1 hora após a interrupção da monocamada. Após 24 horas deste procedimento, foi observada uma inibição da migração das células endoteliais para o campo vazio, em comparação com grupo controle (representado na figura 3C).