UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica

Luciana Simão do Carmo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica

Luciana Simão do Carmo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Carmo, Luciana Simão do
C287p Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica / Luciana Simão do Carmo. -- São Paulo, 2012.
114p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Hematologia 2. Hematopoiese : Sangue : Fisiologia humana I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

616.15 CDD

Luciana Simão do Carmo

Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, José do Carmo e Ruth Simão do Carmo,
pelas orações, pelo amor e pelo carinho que sempre dedicaram.
Acima de tudo, este trabalho é dedicado a vocês.

A minha avó, Maria Menezes Simão e
à Tia Célia Simão Caetano,
pelas orações e pelo carinho.

Aos meus queridos irmãos, Luisela, Marco Aurélio,
Priscila, e ao meu sobrinho, Luiz Phillip, por acreditarem
que sou capaz e pelo amor que nos une.

À toda minha família, agradeço de coração.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, meu orientador, que me abriu as portas para iniciar essa importante etapa da minha vida profissional e ensinou-me a perseguir os ideais da vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida. É a Ele que dirijo minha maior gratidão. Tu és o maior mestre. E todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o Seu propósito.

Ao Prof. Dr. Paulo Augusto Achucarro Silveira, grande incentivador da minha iniciação no universo da ciência básica, a quem tenho profunda admiração e grande respeito: meu especial agradecimento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero, pelo incentivo a esta dissertação e por ensinar o humanismo com que trata o seu semelhante.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pela atenção e orientação na análise histológica da medula óssea.

À Profa. Dra. Primavera Borelli, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos membros da minha Banca de Qualificação, Dra. Ana Campa, Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca e Dr. Paulo Augusto Achucarro Silveira, pela análise criteriosa do trabalho e pelas sugestões.

À Alexandra Siqueira Mello, Dalila Cunha de Oliveira, Ed Wilson Santos, Fabiana da Silva Lima, Graziela Batista da Silva, Jackeline Soares de Oliveira Beltran, Maristela Tsujita, Mayara Cortez e Mayara Caldas Ramos, do Laboratório de Hematologia Clínica, pelos momentos de descontração e amizade.

Às nutricionistas Maria Carolina Borges, Mônica Yamada, Patrícia Jacob e Tatiana Mieko, pela gratificante convivência e generosidade.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica da UNIFESP, Carlos Márcio Moura Ponce de Leon, Edgar Julian Paredes Gamero e Amanda Nogueira Pedro, sempre prestativos, prontos a ajudar-me em todos os momentos.

À Daniela Bastos Mourão, pela amizade desde a graduação e pela ótima companhia nos momentos mais inusitados.

Às queridas amigas Ana Paula de Deus, Andrea Alves e Elisângela Mendonça, ótimas companhias, pela amizade e pela força em diversas etapas da pesquisa.

À Ana Carolina Moreno, do Laboratório de Bioquímica Clínica, que me auxiliou tão gentilmente na separação das células mononucleares.

À Amanda Rabello Crisma, Karina Nakajima e Mariana Cristina Ferreira, pelo apoio e pelo auxílio profissional.

À Ivanir Santana de Oliveira Pires, ao Francisco Leonardo Torres Leal e ao Emídio Marques de Matos Neto, pelo carinho e pelo auxílio no preparo da ração.

À Renata Chaves Albuquerque, pela ajuda na análise dos resultados do ciclo celular.

À família Dutra: Fátima, Valdo, Pierry, Diógenes, Kenya e Maria Eduarda, por ter me acolhido como parte da família. Agradeço de coração.

Aos funcionários responsáveis pela secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Ana, Edna, Maria Auxiliadora e Sueli, pela atenção e pela ajuda prestada em diversos momentos da realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério do Instituto de Medicina Tropical, Luiz, Carlos e Wilma, pelo auxílio e pela dedicação durante o projeto piloto em que os animais foram mantidos no biotério.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Silvânia, Flávia e Renata, pelo auxílio e pela ajuda.

À Elaine Midori Ychico, ao Edilson Feitosa dos Santos e ao Jorge Alves de Lima, responsáveis pela Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela dedicação em diversos momentos da realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela disponibilidade e pelos serviços prestados.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, e ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado, que permitiram a realização desse trabalho.

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria."

I Coríntios, 13: 1-2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01
1.1 Dieta e transição nutricional 01
1.2 Hematopoese..... 03
1.3 Citocinas e fatores de crescimento..... 06
1.4 Hematopoese e adiposidade central 09
2. OBJETIVOS..... 12
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 13
3.1 Animais..... 13
3.2 Rações..... 13
3.3 Indução do aumento da adiposidade corpórea 15
3.4 Obtenção das amostras sanguíneas..... 15
3.5 Análises bioquímicas..... 18
3.5.1 Determinação de concentração sérica de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triacilgliceróis e da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase 18
3.5.2 Determinação das concentrações séricas de insulina, leptina, adiponectina, IL-6, PAI-1, TNF-α e PCR……..... 20
3.6 Obtenção de células da medula óssea..... 20
3.7 Viabilidade celular..... 21
3.8 Análises hematológicas..... 21
3.8.1 Hemograma e contagem de reticulócitos..... 21
3.8.2 Mielograma..... 22

3.9 Avaliação histopatológica medular..... 24

3.10 Obtenção de células mononucleares da medula óssea..... 24

3.11 Caracterização da porcentagem de células CD34 e CD133 positivas da medula óssea por citometria de fluxo..... 25

3.12 Avaliação do perfil proliferativo das células totais da medula óssea utilizando Iodeto de Propídeo e RNAse, por citometria de fluxo..... 26

3.13 Avaliação do perfil proliferativo de células $CD34^+$ e $CD133^+$ da medula óssea utilizando 7AAD, por citometria de fluxo..... 27

3.14 Ensaio de proliferação das células mononucleares frente a fatores de crescimento IL-3, GM-CSF, G-CSF e EPO: ensaio de cultura líquida 27

3.15 Determinação da proliferação: ensaio de MTT..... 28

3.16 Ensaio clonogênico em meio semissólido..... 30

3.17 Avaliação da capacidade de células totais da medula em sintetizar GM-CSF, G-CSF, IL-1α, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, INF-γ, SCF, TNF-α e VEGF.. 31

3.18 Análise estatística..... 32

4. RESULTADOS..... 33

4.1 Avaliação do consumo de ração, quilocalorias, lipídios e variação do peso corpóreo..... 33

4.2 Avaliação dos coxins adiposos: periepididimal e retroperitoneal..... 34

4.3 Avaliação da concentração sérica de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triacilgliceróis..... 35

4.4 Avaliação da concentração de insulina e glicemia de jejum..... 37

4.5 Avaliação da concentração sérica de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase…….. 38

4.6 Avaliação das concentrações de leptina e adiponectina..... 39

4.7 Avaliação da concentração de corticosterona sérica..... 40

4.8 Avaliação das concentrações circulante de IL-6, PAI-1, TNF-α e PCR 41

4.9 Hemograma…… 42

4.9.1 Eritrograma…..... 42

4.9.2 Índices hematimétricos……. 42

4.9.3 Leucograma..... 45

4.9.4 Determinação da contagem de plaquetas..... 48

4.10 Avaliação da contagem de reticulócitos..... 49

4.11 Mielograma 50

4.11.1 Número total de células nucleadas presentes na medula óssea..... 50

4.11.1.1 Linhagem eritrocitária..... 51

4.11.1.2 Linhagem neutrofílica..... 52

4.11.1.3 Linhagem eosinofílica..... 53

4.11.1.4 Linhagem linfoplasmocitária..... 54

4.11.1.5 Linhagem monomacrofágica……. 55

4.11.1.6 Linhagem megacariocitária…… 56

4.11.1.7 Relação Grânulo-Eritrocitária (G/E) ……..…..... 57

4.11.2 Análise histológica 58

4.11.2.1 Medula óssea 58

4.11.3 Caracterização da porcentagem de células CD133 e CD34 positivas da medula óssea por citometria de fluxo 62

4.11.4 Avaliação do perfil proliferativo das células totais da medula óssea utilizando Iodeto de Propídeo e RNAse, por citometria de fluxo..... 65

4.11.5 Avaliação do perfil proliferativo das células $CD34^+$ e $CD133^+$ da medula óssea utilizando 7AAD, por citometria de fluxo..... 66

4.11.6 Determinação da viabilidade: ensaio de MTT 69

4.11.7 Ensaio de proliferação das células mononucleares frente a fatores de crescimento IL-3, GM-CSF, G-CSF e EPO: ensaio de cultura líquida..... 70

4.11.8 Ensaio clonogênico em meio semissólido .....…...……... 74

4.11.9 Avaliação *in vivo*, de citocinas produzidas a partir de cultura de medula óssea total 77

5. DISCUSSÃO..... 82

6. CONCLUSÃO 96

7. REFERÊNCIAS..... 97

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Hierarquia do sistema hematopoético..... 4

Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo controle mostrando população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação e do grupo experimental evidenciando medula hiperplásica com predomínio granulocítico e exibindo elevada concentração de precursores distribuídos em agregados……. 59

Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo controle mostrando população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação e do grupo experimental evidenciando medula hiperplásica com predomínio granulocítico e exibindo elevada concentração de precursores distribuídos em agregados…… 60

Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo controle e experimental evidenciando o padrão de distribuição de fibras colágenas constituindo discretas lojas em meio ao parênquima hemopoético em ambos os grupos……. 61

Figura 5. Representação da análise da população de células mononucleares da medula óssea por citometria de fluxo. Expressão de $CD133^+$ e $CD34^+$ em animais dos grupos controle e experimental..... 63

Figura 6. Dados de um experimento representativo da análise das células totais da medula óssea por citometria de fluxo marcadas com Iodeto de Propídeo de uma amostra controle e experimental, correspondente às fases do ciclo celular, stage G1 (fase G0/G1), stage S (fase S) e stage G2/M..... 65

Figura 7. Dados de um experimento representativo da análise das células totais da medula óssea, por citometria de fluxo, marcadas com 7AAD de amostras controle e experimental, correspondentes às fases do ciclo celular, dip G1 (fase G0/G1), dip G2 (fase G2/M) e dip S (S)..... 67

Figura 8. Dados de um experimento representativo da análise das células totais da medula óssea, por citometria de fluxo, marcadas com 7AAD de amostras controle e experimental, correspondentes às fases do ciclo celular, dip G1 (fase G0/G1), dip G2 (fase G2/M) e dip S (S)..... 68

Figura 9. Fotomicrografia de colônias CFU-GM e CFU-GEMM presentes na cultura semissólida no 14º dia, estabelecida com células mononucleares da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental estimulada com fatores de crescimento..... 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das rações experimentais..... 14

Tabela 2. Consumo de ração, quilocalorias, lipídiolipídios e variação do peso corpóreo..... 33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva padrão utilizando as seguintes concentrações de células (0, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 x10^3 células/poço) em quadruplicata..... 29

Gráfico 2. Resultados em valores médios ± o SEM do peso em gramas (g) da gordura periepididimal e retroperitoneal em animais dos grupos controle e experimental..... 34

Gráfico 3. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em mg/dL de colesterol total, VLDL-c, HDL-c e LDL-c em animais dos grupos controle e experimental 35

Gráfico 4. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em mg/dL de triacilglicerol em animais dos grupos controle e experimental..... 36

Gráfico 5. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em pg/mL de insulina e glicemia de jejum em animais dos grupos controle e experimental 37

Gráfico 6. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em U/L de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase em animais dos grupos controle e experimental……..... 38

.

Gráfico 7. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em pg/mL de leptina e adiponectina em animais dos grupos controle e experimental 39

Gráfico 8. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em ng/mL de corticosterona em animais dos grupos controle e experimental 40

Gráfico 9. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em pg/mL de IL-6, TNF-α, PCR e PAI-1 em animais dos grupos controle e experimental 41

Gráfico 10. Resultados em valores médios ± o SEM do número de hemácias, concentração de hemoglobina, porcentagem do hematócrito de animais dos grupos controle e experimental 43

Gráfico 11. Resultado, em valores médios ± o SEM do volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração da hemoglobina corpuscular média de animais dos grupos controle e experimental 44

Gráfico 12. Resultado, em valores médios ± o SEM em mm^3 do número total de leucócitos de animais dos grupos controle e experimental ……..……..... 45

Gráfico 13. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do número de neutrófilos segmentados e de eosinófilos dos animais dos grupos controle e experimental 46

Gráfico 14. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do número de linfócitos e número de monócitos de animais dos grupos controle e experimental ……..... 47

Gráfico 15. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do número de plaquetas de animais dos grupos controle e experimental 48

Gráfico 16. Resultado em valores médios ± o SEM em (%) do número de reticulócitos de animais dos grupos controle e experimental..... 49

Gráfico 17. Resultados em valores médios ± o SEM do número total de células nucleadas na medula óssea de animais dos grupos controle e experimental..... 50

Gráfico 18. Resultado em valores médios ± o SEM do número de eritroblastos jovens, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos de animais dos grupos controle e experimental..... 51

Gráfico 19. Resultados em valores médios ± o SEM do número de blastos, formas jovens, formas em anel e segmentados da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental..... 52

Gráfico 20. Resultados em valores médios ± o SEM do número de eosinófilos da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental..... 53

Gráfico 21. Resultados em valores médios ± o SEM do número de linfócitos e plasmócitos da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental 54

Gráfico 22. Resultados em valores médios ± o SEM do número de células monomacrofágicas da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental..... 55

Gráfico 23. Resultados em valores médios ± o SEM do número de megacariócitos de animais dos grupos controle e experimental..... 56

Gráfico 24. Resultados em valores médios ± o SEM da relação G/E da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental..... 57

Gráfico 25. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células da medula óssea, CD133 e CD34 em animais dos grupos controle e experimental……..... 64

Gráfico 26. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células totais da medula óssea na fase G0/G1 e S/G2/M em animais dos grupos controle e experimental..... 66

Gráfico 27. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células totais da medula óssea na fase G0/G1 e S/G2/M em animais dos grupos controle e experimental…….....……..... 67

Gráfico 28. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células totais da medula óssea na fase G0/G1 e S/G2/M em animais dos grupos controle e experimental.. 68

Gráfico 29. Resultados em valores médios ± o desvio padrão do número total de células mononucleares viáveis da medula óssea avaliadas no terceiro e no quinto dias de cultivo em animais dos grupos controle e experimental.... 69

Gráfico 30. Resultados, em valores médios do número total de células mononucleares viáveis da medula óssea, expressos em 10^6 células/mL durante 5 dias de cultivo em meio líquido a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 de animais do grupo controle e experimental. 71

Gráfico 31. Resultados em valores médios do número de blastos, formas jovens, formas em anel e formas segmentadas expressos em 10^5 células/mL durante 5 dias de cultivo em meio líquido a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 em animais dos grupos controle e experimental……..... 72

Gráfico 32. Resultados em valores médios do número de linfócitos, monócitos/macrófagos e precursores eritroides expressos em 10^5 células/mL durante 5 dias de cultivo em meio líquido a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 em animais dos grupos controle e experimental…... 73

Gráfico 33. Resultados representam a média ± do número de "*clusters*", colônias e do número de colônias granulo-monocítica, granulocíticas e grânulo-eritroide-mega-monocítica, em animais dos grupos controle e experimental……..... 76

Gráfico 34. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-1α produzida pela medula óssea total, IL-5, IL-6 e TNF-α em animais dos grupos controle e experimental …..... 78

Gráfico 35. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração em pg/mL de G-CSF produzida pela medula óssea total e GM-CSF em animais dos grupos controle e experimental….....…….... 79

Gráfico 36. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em pg/mL de IL-3 e de SCF após 1 dia de cultivo de células totais da medula óssea a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 de animais dos grupos controle e experimental ……..... 80

Gráfico 37. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração em pg/mL de INF-γ produzida pela medula óssea total, TNF-α e VEGF em animais dos grupos controle e experimental …..... 81

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Determinações realizadas na etapa 1..... 16

Esquema 2. Determinações realizadas na etapa 2..... 17

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN	Instituto Americano de Nutrição
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BFU-E	Unidade formadora de colônias eritroides primária
C	Controle
CT	Colesterol total
CFU-E	Unidade formadora de colônias eritroides
CFU-Eo	Unidade formadora de colônias de eosinófilos
CFU-G	Unidade formadora de colônias de granulócitos
CFU-GEMM	Unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos/macrófagos e megacariócitos
CFU-GM	Unidade formadora de colônias grânulo-monocíticas
CFU-M	Unidade formadora de colônias de monócitos
CFU-Mast	Unidade formadora de colônias de basófilos/mastócitos
CFU-Meg	Unidade formadora de colônias de megacariócitos
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CSF	Fator estimulador de colônia
DCNT	Doença crônica não transmissível
DM2	Diabetes melito tipo 2
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EPO	Eritropoetina
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas

G/E	Relação grânulo/eritrocitária
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
CT-CTH	Célula-tronco hematopoética de curta duração
CTH	Célula-tronco hematopoética
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H/E	Hematoxilina e eosina
HCl	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Lipoproteína de baixa densidade
HL	Hiperlipídica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LT-CTH	Células-tronco hematopoéticas de longa duração
LRlo	Isoforma longa do receptor de leptina
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
M-CSF	Fator estimulante de colônias de monócitos
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1
PBS	Solução de tampão fosfato
PCR	Proteína C reativa

PI	Iodeto de propídeo
PLC	Progenitor linfoide comum
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
SCF	Fator estimulador de célula-tronco
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAG	Triacilglicerol
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume corpuscular médio
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
7AAD	7-Amino-actinomicina

CARMO, L. S. **Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica.** Dissertação de Mestrado, 2012, p. 114 [Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

O aumento da adiposidade corpórea pode gerar diversos mediadores inflamatórios com capacidade de influenciar a proliferação e a diferenciação hematopoética e, consequentemente, a complexa regulação da hematopoese. Por isso, propusemo-nos, neste trabalho, avaliar a influência do aumento da adiposidade corpórea sobre a proliferação e a diferenciação de células hematopoéticas, bem como sua capacidade em sintetizar citocinas. Ratos *Wistar*, machos foram alimentados com uma dieta rica em lipídios durante 14 semanas. Após esse período foram avaliados hemograma, mielograma, perfil lipídico, concentrações séricas de leptina, insulina e adiponectina. Citômetria de fluxo foi utilizada para avaliação da porcentagem de células $CD34^+/CD133^+$, bem como o ciclo celular de células medulares. Células medulares foram utilizadas para avaliar a atividade proliferativa *in vitro* e a capacidade de diferenciação, *in vitro*, na presença de IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF. Animais, alimentados com dieta hiperlipídica, apresentaram maiores concentrações de leptina circulante, com aumento de gordura corporal, aumento da concetração de proteína C reativa, colesterol total, LDL, VLDL e triacilglicerol. O hemograma apresentou neutrofilia absoluta e a medula óssea apresentou-se hipercelular com aumento do número de granulócitos maduros e da população celular $CD133^-/CD34^+$. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram aumento da capacidade de síntese de IL-3 e aumento de G-CSF, com aumento do potencial proliferativo, também evidenciado pelo maior número de células medulares na fase S/G2/M, bem como o aumento da diferenciação granulocítica. Esses resultados sugerem que a leucocitose e neutrofilia observadas em situações de aumento da adiposidade corpórea são decorrentes de uma complexa modulação do sistema hematopoético.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Hematopoese. Citocinas.

CARMO, L. S. **Proliferation and differentiation of bone marrow mononuclear cells *in vitro* after stimulation with growth factors in Wistar rats subjected to high fat diet.** Dissertação de Mestrado, 2012, p. 114 [Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

The body fat increase can generate various inflammatory mediators, that are capable to influence the proliferation and differentiation of hematopoietic cells and consequently modulate the complex regulation of the hematopoiesis. In this study we have proposed to evaluate the effect of increase body fat on the proliferation and differentiation of hematopoietic cells, as well as its ability to synthesize cytokines. Male *Wistar* rats were subjected to a high fat diet during a period of 14 weeks. After that period were evaluated hemogram, mielogram, lipid profile and the serum concentrations of leptin, insulin and adiponectin. Flow cytometry was used to evaluate the percentage of $CD34^+/CD133^+$, as well as the cell cycle of bone marrow cells. Bone marrow cells were used to perform the proliferation and differentiation capacity *in vitro* in the presence of IL-3, EPO, GM-CSF and G-CSF. Animals fed high-fat diet had higher concentrations of circulating leptin with increase body fat, and increase of C-reactive protein, total cholesterol, LDL, VLDL and triacylglycerol concentrations. The hemogram showed absolute neutrophilia and a hypercellular bone marrow with increase of granulocytic mature population and $CD133^-/CD34^+$ cells. The results *in vitro*, showed an increase of IL-3 and G-CSF production, and higher proliferative potential with an increase in S/G2/M bone marrow cell cycle phases, as well as an increase of the granulocytic differentiation. The results suggest that leukocytosis and neutrophilia observed in this model of body fat increase are in fact a result of a complex modulation of the hematopoietic system.

Keywords: High-fat diet. Hematopoiesis. Cytokine

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dieta e transição nutricional

A dieta e a atividade física são fatores importantes na promoção e na manutenção da saúde durante o ciclo da vida. Características da dieta podem determinar não somente a saúde do indivíduo, mas também influenciar o desenvolvimento das doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), como câncer, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes, em período de vida mais tardio (CUPPARI, 2009).

Através de dieta adequada, em quantidade e qualidade, o organismo adquire a energia e os nutrientes necessários para o bom desempenho de suas funções e para a manutenção do bom estado de saúde (MONDINI; MONTEIRO, 1994).

A maioria dos países da América Latina, da Ásia e do norte da África vem demonstrando importantes mudanças, com reflexos evidentes para o perfil nutricional da população (KIM; MOON; POPKIN, 2000; MONTEIRO *et al*., 1995; POPKIN, 1994; 1998; WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997).

A transição nutricional corresponde às mudanças dos padrões nutricionais, modificando a dieta das pessoas e se correlacionando com mudanças sociais, econômicas, demográficas e relacionadas à saúde, o que normalmente está associado à obesidade (POPKIN, 2001). Entretanto, a característica básica foi de crescimento da dieta rica em gorduras, açúcares e alimentos refinados, além da redução em carboidratos complexos e fibras.

A relação entre consumo de gorduras saturadas, níveis plasmáticos de colesterol e risco de doença coronariana foi das primeiras a ser comprovada empiricamente (KEYS, 1970; KEYS *et al*., 1984). Assim como ocorre com as gorduras saturadas, o consumo elevado de colesterol também pode aumentar o risco de doença coronariana (STAMLER; SHEKELLE, 1988).

Uma das características marcantes do processo de transição nutricional no Brasil é o antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade. Ao mesmo tempo em que declina a ocorrência da desnutrição em crianças e adultos num ritmo bem acelerado, aumenta a prevalência de excesso de peso e obesidade na população brasileira (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

A prevalência da obesidade está aumentando, sendo que alguns dos fatores que contribuem para ascensão desta epidemia é a transição nutricional, com aumento do fornecimento de energia pela dieta e redução da atividade física, o que podemos chamar de estilo de vida ocidental contemporâneo (KUMANYAKA, 2001).

O acúmulo de evidências que associam características da dieta ao estado de saúde dos indivíduos foi determinante para que a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelecesse limites máximos para o consumo de gorduras (30% do consumo calórico total), ácidos graxos saturados (10% do consumo calórico total), açúcar (10% do consumo calórico total), colesterol (300 mg por dia ou 100 mg/1.000 kcal) e sal (6 g por dia) e estimulasse o consumo de carboidratos complexos (mínimo de 50% do consumo calórico total), de legumes, de verduras e de frutas (400 g por dia ou cerca de 7% do consumo calórico total) (JAMES *et al.*, 1988; WHO, 1990).

No Brasil, a disponibilidade domiciliar de frutas, legumes e verduras, com base nos dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi estimada em 2,3% do total de calorias. Essa disponibilidade permanece aquém do nível ideal em todas as regiões e em todos os estratos econômicos da população (IBGE, 2004).

A OMS estima que aproximadamente 2,7 milhões de mortes por ano em todo mundo podem ser atribuídas ao consumo inadequado de frutas, legumes e verduras, constituindo um dos dez fatores centrais na determinação da carga global de doenças (WHO, 2002).

O risco do câncer de mama, de próstata e de cólon-reto parece aumentar com o consumo total de gordura e com o consumo de gordura de origem animal; enquanto dietas com legumes, verduras e frutas cítricas, ou seja, ricas em fibras, vitaminas e minerais, certamente protegem os indivíduos de cânceres de pulmão, boca, faringe, esôfago, estômago e cólon-reto (WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997).

1.2 Hematopoese

Em mamíferos, durante a vida embrionária e fetal, a hematopoese ocorre em diferentes localizações histoanatômicas, como a esplâncnopleura para-aórtica, o saco vitelino, a região aorto-gônado-mesonéfrica, o fígado, o baço, o timo e a medula óssea (DZIERZAK; MEDVINSKY; BRUIJN, 1998). Em seres humanos, após o nascimento, a medula óssea constitui-se no único local de produção das

células sanguíneas, enquanto que em ratos, tanto o baço como a medula óssea permanecem, fisiologicamente, como órgãos hemopoéticos (MORRISON *et al.*, 1997).

A hematopoese é um fenômeno complexo, altamente regulado e influenciado por vários estímulos, levando à contínua produção de células hematopoéticas maduras, como os leucócitos, as hemácias e as plaquetas (**Figura 1**).

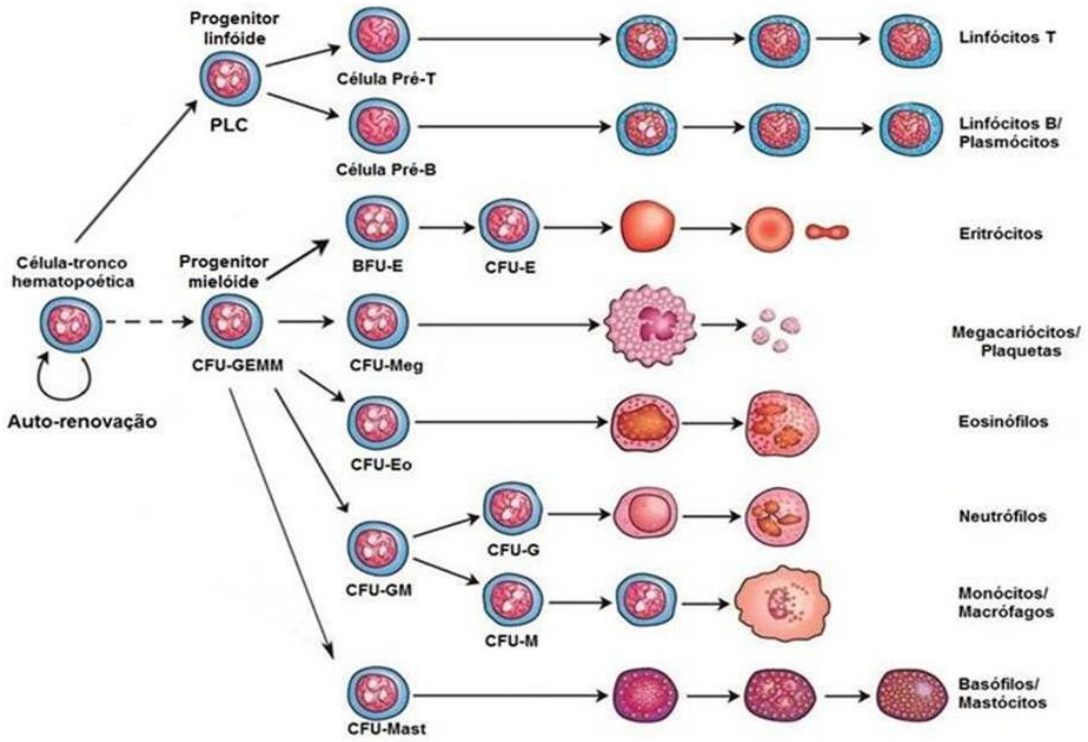


Figura 1. Hierarquia do sistema hematopoético. As células-tronco hematopoéticas (CTH) apresentam alta capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação. A partir da CTH, diferenciam-se progenitores comprometidos com a linhagem linfoide e mieloide. Progenitor linfoide comum (PLC) e um progenitor mieloide/CFU-GEMM (unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos/macrófagos e megacariócitos); BFU-E e CFU-E (unidade formadora de colônias de eritrócitos); CFU-Meg (unidade formadora de colônias de megacariócitos); CFU-Eo (unidade formadora de colônias de eosinófilos; CFU-GM (unidade formadora de colônias de granulócitos e monócitos), CFU-G (unidade formadora de colônias de granulócitos), CFU-M (unidade formadora de colônias de monócitos), CFU-Mast (unidade formadora de colônias de basófilos e mastócitos) que darão origem às células maduras do sangue.

Fonte: Modificado de Metcalf, D. Stem Cells, vol. 25:p. 2390-2395, 2007.

A produção das células hematopoéticas maduras depende da CTH e do microambiente adequado para que a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação dessas células ocorram de maneira organizada (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004). A compreensão deste processo e da biologia das CTH é importante para o tratamento de desordens onco-hematológicas, desordens congênitas, citopenias pós-quimioterapia e transplante de medula óssea (TMO) (LEMISCHKA, 2001; SMITH, 2003; WEISSMAN, 2000).

As células hematopoéticas presentes na medula óssea podem ser classificadas, quanto a sua capacidade proliferativa, em três compartimentos funcionais: *(I)* compartimento das células-tronco ou progenitores hematopoéticos pluripotenciais, compreendendo pequena população de células indiferenciadas com capacidade de gerar todos os tipos de células sanguíneas e alta capacidade de autorrenovação (SMITH, 2003); *(II)* compartimento de células progenitoras com potencial limitado de gerar células de diferentes linhagens sanguíneas e células progenitoras unipotenciais com capacidade restrita de desenvolvimento de uma única linhagem celular; e *(III)* células reconhecidas morfologicamente, que ainda apresentam capacidade proliferativa, como na série granulocítica, que compreende a fase de mieloblasto a mielócito.

A hematopoese é influenciada por vários estímulos que atuam em diferentes níveis do processo: desta maneira, há que se considerar: as interações célula-célula e célula-estroma, que ocorrem tanto no microambiente indutor da hematopoese como em outras localizações (MOHANDAS; PRENANT, 1978; TRENTIN, 1978); a ação dos diferentes fatores de crescimento e citocinas; a ação hormonal; a ação de mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória; e o estado nutricional do indivíduo (ATHENS *et al.*, 1961;

BORELLI; MARIANO; BROJEVIC, 1995; BORELLI *et al*., 1998; BORELLI; NARDELLI, 2001; PETERS *et al.*, 1972).

O microambiente é que permite a formação das diferentes linhagens sanguíneas; histologicamente é constituído por células hematopoéticas em diferentes etapas de diferenciação e maturação; por células estromais (fibroblastos, células reticulares, macrófagos, células endoteliais e adipócitos), de uma matriz extracelular composta por diferentes tipos de colágenos, proteínas adesivas não colagênicas, proteoglicanos; e por substâncias solúveis produzidas localmente ou oriundas da circulação (BRACH; HERRMANN, 1991; EAVES *et al.*, 1991; MAYANI; GUILBERT; JANOWSA-WIECZOREK, 1992).

1.3 Citocinas e fatores de crescimento

As citocinas compõem um grupo heterogêneo de polipeptídeos, que, funcionalmente, podem ser denominados de peptídeos regulatórios, atuando na ordem de pico ou namomoles e que modificam as funções de diferentes tipos celulares.

A maioria das citocinas é produzida indutivamente, por diferentes células, regulando as respostas imune e inflamatória, podendo controlar a proliferação e a diferenciação celulares, além da apoptose, e ativando ou inibindo células maduras efetoras (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; ASSENMACHER *et al*., 1996; QUESENBERRY, 1995; WALKER *et al*., 1995).

Algumas citocinas foram denominadas de fatores estimuladores de colônia (CSF), pela capacidade de estimularem a proliferação e a formação de colônias *in vitro* (DEXTER; GARLAND; TESTA, 1990). Entre as principais

citocinas regulatórias da hematopoese, encontram-se o fator estimulador de células-tronco (SCF), a interleucina 3 (IL-3), os fatores estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), de monócitos (M-CSF) e de granulócitos (G-CSF), a eritropoietina (EPO) e os fatores provavelmente inibitórios, como fator de necrose tumoral (TNF) e de transformação β (TGF-β) (ARAI *et al.*, 1990; CUTLER *et al.*, 1985; HAYLOCK *et al.*, 1994; OGAWA, 1993; SMITH, 2003).

Certos fatores de crescimento hematopoéticos estimulam a proliferação de células progenitoras comprometidas com mais de uma linhagem**,** ou mais primitivas, como GM-CSF e IL-3. A IL-3 estimula o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência de célula-tronco hematopoética e atua sobre ampla faixa de linhagens, com atividade estimulante de colônia sobre as unidades formadoras de colônias de: grânulo-monocítica (CFU-GM), eritroide primária (BFU-E), megacariocítica (CFU-Meg), granulócitos, eritrócitos, monócitos e macrofágos (CFU-GEMM) (METCALF; NICOLA, 1995).

O GM-CSF é um fator de crescimento que exerce papel central na função e na ativação de precursores e células maturas da linhagem grânulo-monocítica (WEISS *et al.*, 1993), que estimula as divisões mitóticas finais e a maturação celular terminal dos progenitores hemopoéticos diferenciados, progenitores que estão comprometidos com a produção celular, dentro de uma única linhagem sanguínea. Em alguns casos, esse fator de crescimento também ativa as funções efetoras das células maturas finais naquela linhagem. O GM-CSF induz ao aumento na taxa de proliferação em progenitores comprometidos, *in vivo*, como demonstrado pelo aumento significativo no número de CFU-GM e no percentual de precursores medulares reconhecidos

morfologicamente em fase S. Foi demonstrado que o tratamento com GM-CSF quase triplica a produção medular de células grânulo-monopoéticas. Embora a grânulo-monocitose seja o efeito mais evidente da administração do GM-CSF, outras linhagens mieloides, como a eritroide e a megacariocítica, também respondem ao tratamento (BURGESS; METCALF, 1980).

A EPO promove proliferação e hemoglobinização de células progenitoras eritroides mais maduras (METCALF, 1992, 1993, 1997; METCALF; NICOLA, 1995). Além disso, a eritropoetina promove a proliferação de células comprometidas com a linhagem eritroide, enquanto que, em células progenitoras eritroides mais tardias, atua na sobrevivência celular (SAWADA, *et al.*, 1990; SPIVAK; HOGANS, 1989; SPIVAK *et al*., 1992; SPIVAK *et al*., 1996).

Os fatores de crescimento hematopoéticos, assim como outras citocinas, não apresentam atividade enzimática intrínseca, exercendo atividade através da ligação a receptores específicos associados à membrana celular. Os receptores para fatores de crescimento hematopoéticos possuem aspectos estruturais semelhantes, agrupados, portanto, na superfamília dos receptores de citocinas classe I (SOEDE-BOBOK; TOUW, 1997).

Os fatores de crescimento são relativamente específicos em suas ações em células maduras e são um dos maiores reguladores fisiológicos dos níveis de granulócitos, eosinófilos, células eritroides e plaquetas (G-CSF, IL-5, eritropoietina e trombopoietina, respectivamente) (METCALF; NICOLA, 1995; SMITH, 2003), exercendo múltiplas ações em células alvo, podendo atuar nos mecanismos da apoptose, estimular a proliferação celular e induzir a diferenciação e a ativação funcional das células.

1.4 Hematopoese e adiposidade central

O tecido sanguíneo caracteriza-se por sua alta taxa de renovação celular, por sua flexibilidade, e por sua adaptação frente a diferentes situações fisiopatológicas (OGAWA, 1993; QUESENBERRY, 1995).

Sabe-se que a proliferação e a diferenciação de progenitores hemopoéticos, assim como a sobrevida destas células, podem ser induzidas pela combinação de diversas citocinas (RANE; REDDY, 2002), que podem ser produzidas por diversos componentes do microambiente hemopoético ou de outros tecidos (ARAI *et al.*, 1990; CUTLER *et al.*, 1985; HAYLOCK *et al.*, 1994; OGAWA, 1993; SMITH, 2003).

A obesidade está associada com aumento dos níveis de leptina e de adipócitos; este último sendo o principal produtor de leptina, bem como de outros mediadores, principalmente inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), a IL-1 e a IL-6, que podem atuar direta ou indiretamente nas células hematopoéticas (AHIMA; FLIER, 2000; OZCAN; YILMAZ; OZCAN, 2006; SAWDEY; LOSKUTOFF, 1991; SCHAFFLER; SCHOLMERICH; SALZBERGER, 2007).

A produção de citocinas inflamatórias, comumente observada em situações de obesidade, pode ter efeitos sobre a hematopoese, induzindo ou inibindo a proliferação e a diferenciação das células presentes na medula óssea. Mediadores inflamatórios também possuem a capacidade de induzir outros tipos celulares a produzirem diferentes mediadores que por ventura possam influenciar o complexo mecanismo hematopoético. Algumas exercem efeito ativador e/ou de proliferação (como, por exemplo, o GM-CSF), enquanto

outras aparentemente apresentam efeito inibitório sobre a proliferação hematopoética (TNF-α e IFN-γ, por exemplo) (ARAI *et al.*, 1990; CUTLER *et al.*, 1985; HAYLOCK *et al.*, 1994; OGAWA, 1993; SMITH, 2003).

A literatura demonstra que a leptina pode ter efeito direto na proliferação de células hematopoéticas mais jovens, também possuindo capacidade de estimular a diferenciação de células das linhagens eritroide e mieloide (CLAYTON *et al.*, 1997; GAINSFORD *et al.*, 1996; HIROSE *et al.*, 1998; KONOPLEVA *et al.*, 1999; MIKHAIL *et al.*, 1997). No entanto, estes efeitos sobre a célula-tronco $CD34^+$ não estão bem claros.

Estudos também têm demonstrado que a leptina pode agir sinergicamente com a eritropoetina (EPO), aumentando a produção de células da linhagem eritroide, indicando que a leptina atua ao nível de células progenitoras. Em ratos obesos, o baço mostra redução da expressão de células da linhagem eritroide marcadas pelo TER 119, enquanto que o número de células TER 119^+ na medula é quase o dobro em comparação ao controle. No rato adulto, o baço contribui para a eritropoese normal; então, o aumento de células TER 119^+ na medula reflete um mecanismo compensatório para a diminuição do débito esplênico (BENNETT *et al.*, 1996).

Análise hematopoética em ratos *db/db* revelou déficit na linfopoese. De acordo com a atividade proliferativa da leptina sobre as populações de células-tronco, esse déficit parece estender-se para a fase de células pró-B, como indicado pela redução das células $B220^+$ e $CD43^+$ na medula óssea de ratos *db/db* (BENNETT *et al.*, 1996).

A linfopoese foi afetada pela redução dos níveis de linfócitos no sangue periférico e pela incapacidade deste componente de se recuperar totalmente

após a irradiação. Não existe correlação entre os níveis de glicose no sangue e de linfócitos no sangue periférico, indicando que o déficit de linfócitos em ratos *db/db* não é resultado de um estado diabético (BENNETT *et al.*, 1996).

A leptina aumenta a produção de IL-2 e de interferon gama (INF-γ), enquanto diminui os níveis de IL-4. Portanto, a leptina pode desempenhar papel importante na regulação do equilíbrio T helper Th_1 e Th_2. A leptina modula também a produção de citocinas de monócitos/macrófagos. O aumento de lipopolissacarídeo (LPS) induz a produção de TNF-α, IL-6 e IL-12 em macrófagos peritoneais (LOFFREDA *et al.*, 1998; SANTOS-ALVAREZ *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

Considerando que o aumento da adiposidade corpórea pode gerar diversos mediadores inflamatórios com capacidade de influenciar a hematopoese, propusemo-nos a investigar os efeitos da ingestão de uma dieta hiperlipídica sobre a proliferação e a diferenciação das células mononucleares da medula óssea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Em nosso modelo de adiposidade experimental, utilizamos ratos *Wistar*, machos, com 2 meses de idade, não isogênicos, adultos, provenientes do Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP). O projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP (**Anexo 01**).

3.2 Rações

As rações controle e hiperlipídica foram preparadas em nosso laboratório, na forma granulada, e conservadas a 4°C até o momento do uso. As rações foram preparadas para ratos adultos, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN – 93M) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A quantidade de tertbutil hidroquinona foi aumentada em razão da maior susceptibilidade da ração hiperlipídica à oxidação (PANG ; CHOI; PARK, 2008) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição das rações experimentais.

Ingredientes	Ração Controle (I)	Ração Hiperlipídica (II)
	gramas por kg de ração	
Amido	620,69	193,38
Sacarose	100,00	133,56
Caseína	140,00	186,98
Óleo de soja	40,00	53,42
Banha de porco	--	300,00
Celulose	50,00	66,78
Mistura salina	35,00	46,74
Mistura vitamínica	10,00	13,36
L-cistina	1,80	2,40
Bitartarato de colina	2,50	3,34
Tertbutil hidroquinona	0,01	0,04

Mistura Salínica (1.000,0 g): ácido bórico 0,085 g; carbonato de cálcio 357,0 g; carbonato de cobre 0,30 g; carbonato de manganês 0,63 g; carbonato de níquel 0,0318 g; carbonato de zinco 1,65 g; citrato de potássio 28,0 g; citrato férrico 6,06 g; cloreto de lítio 0,0174 g; cloreto de sódio 74,0 g; fluoreto de sódio 0,0635 g; fosfato monopotássico 250,0 g; iodato de potássio 0,01 g; metassilicato de sódio 1,45g; óxido de magnésio 24,0 g; paramolibdato de amônia 0,00795 g; sacarose 209,806 g; selenato de sódio 0,01025 g; sulfato de cromo 0,275 g; sulfato de potássio 46,6 g; vanadato de amônia 0,0066 g.

Mistura Vitamínica (1.000,0 g): vitamina B_{12} 0,00030 g; vitamina B_6 0,500 g; bitartarato de colina 200,0 g; vitamina A 500 UI; vitamina D 50,0 UI; vitamina E 5,0 UI; vitamina K 2UI; ácido p-aminobenzoico 10,0 g; niacina 5,0 g; biotina 0,0030 g; ácido fólico 0,200 g; ácido ascórbico 100,0 g; ácido nicotínico 1,7 g; inositol 100,0 g; sacarose q.s.p. 1.000,0 g.

3.3 Indução do aumento da adiposidade corpórea

Após o período de adaptação, aproximadamente 10 dias, os animais foram pesados e distribuídos em gaiolas de criação, sob condições ambientais controladas, com ciclo de iluminação 12h claro (luz acesa às 7:00 h) e 12h escuro, temperatura ambiente de 22 ± 2°C, umidade relativa de 55 ± 10%, sendo alimentados *ad libitum,* com água e ração.

Após este período, os animais foram separados em dois grupos: um grupo recebeu dieta controle (C) enquanto o outro grupo recebeu dieta hiperlipídica (HL). Após 14 semanas de indução do processo de adiposidade, os animais de ambos os grupos foram eutanasiados para a obtenção das amostras biológicas.

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada na determinação do peso corporal, realizada a cada 48 horas, e no consumo diário das rações, obtido através da diferença entre quantidade de ração fornecida e ingerida.

3.4 Obtenção das amostras sanguíneas

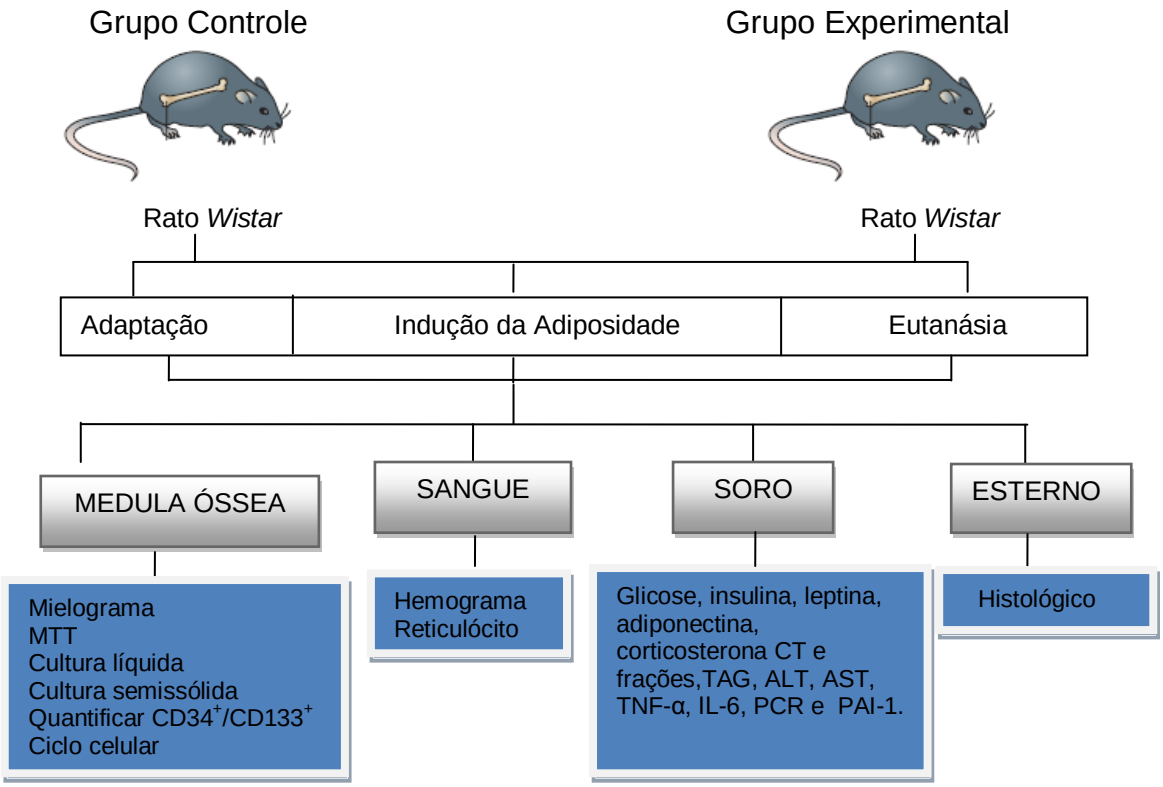
As amostras sanguíneas foram obtidas por punção arterial, em ratos previamente anestesiados com 50mg/Kg de peso de cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer) e 100mg/Kg de peso de cloridrato de cetamida (Ketamina®, Cristália). Esse procedimento foi realizado de forma rápida, minimizando qualquer forma de sofrimento ou estresse dos animais. A eutanásia foi realizada no período da manhã, entre 8 e 12 h.

As amostras foram coletadas utilizando-se, como anticoagulante, o ácido etileno diaminotetracético (EDTA), 10% na proporção de 50 µL para cada 1,0 ml de sangue, sendo utilizadas para realização do hemograma e da contagem de reticulócitos.

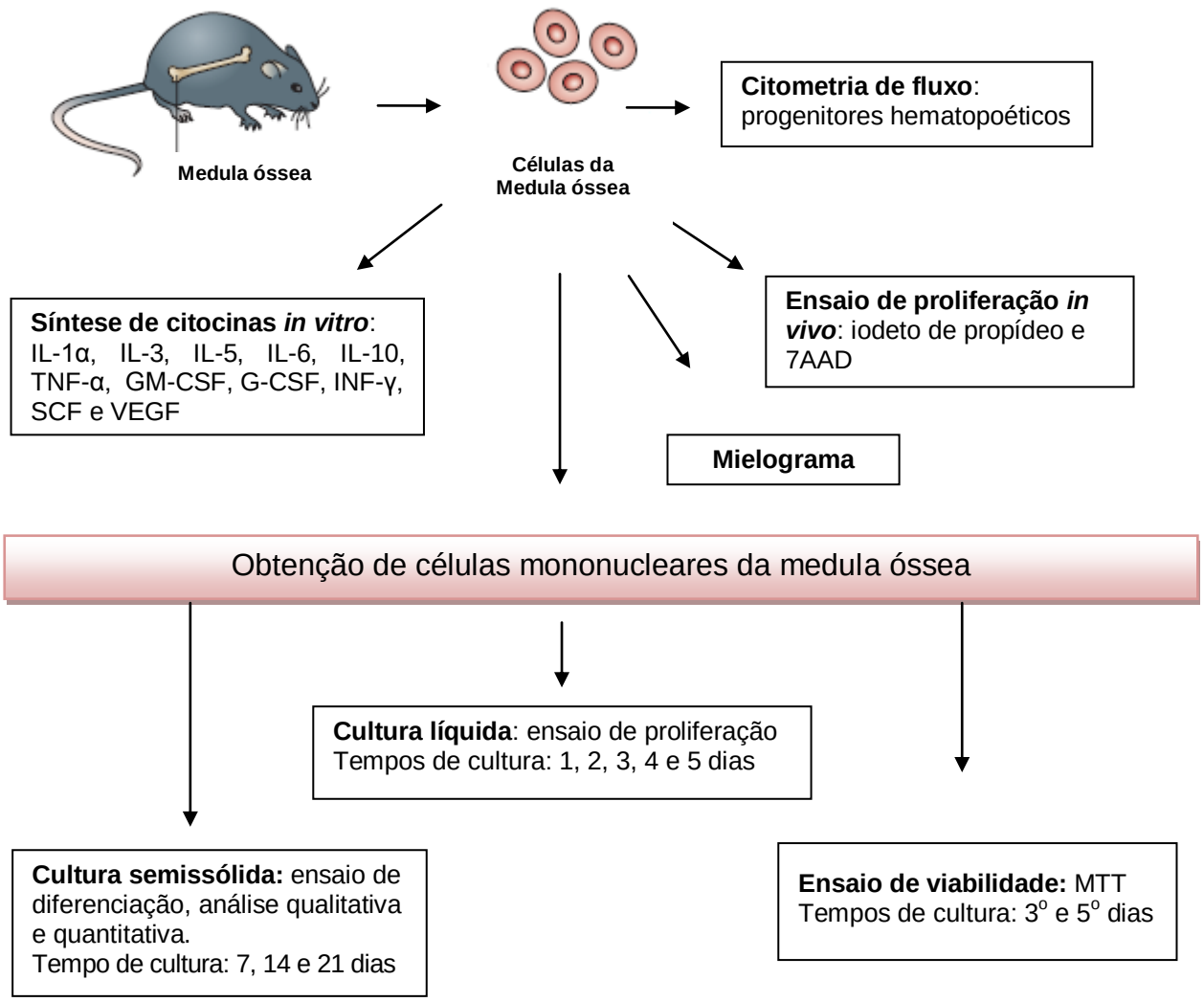
As amostras sanguíneas coletadas, dos animais de ambos os grupos, sem anticoagulante, foram utilizadas para obtenção do soro, que foi separado por centrifugação (1.300 rpm por 10 minutos a 4ºC), congelado em alíquotas e utilizado para determinação de glicose, insulina, colesterol total e frações, triacilgliceróis, ALT, AST, leptina, adiponectina, corticosterona, TNF-α, IL-6, PCR e PAI-1.

Posteriormente à coleta do sangue e à eutanásia, os coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal foram pesados.

Esquema 1. Determinações realizadas na etapa 1.



Esquema 2. Determinações realizadas na etapa 2.



3.5 Análises bioquímicas

3.5.1 Determinação da concentração sérica de glicose, colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis e determinação da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase

A concentração sérica de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis e a atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificadas por meio de *kits* comerciais em analisador automático multicanal (*Architect C 8000 Abbott Diagnostics*).

A determinação de colesterol total foi efetuada por meio de *kit* baseado em método enzimático (*Abbott Laboratories,* Chicago, IL, EUA). Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol e a ácidos graxos livres. O colesterol livre foi, então, oxidado pela colesterol oxidase a coleste-4-ene-3-ona e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 reagiu com o ácido hidroxibenzoico e com a 4-aminoantipirina para formar um cromóforo, que foi quantificado a 500 nm.

A dosagem de HDL-colesterol sérico também foi feita por método enzimático, utilizando o *kit* comercial *Randox HDL Cholesterol Direct* (*Randox Laboratories,* Crumlin, Reino Unido). O ensaio consiste em duas reações distintas: (1) eliminação de quilomícrons, VLDL-colesterol e LDL-colesterol, pelas enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e catalase, e (2) medição específica do HDL-colesterol após a liberação do colesterol da HDL pela ação de compostos detergentes.

A concentração sérica de triacilgliceróis (TAG) foi determinada por meio de *kit* baseado em método enzimático (*Abbott Laboratories,* Chicago, IL, EUA). Os TAG são hidrolisados por lipases. O glicerol produzido é fosforilado pela glicerol quinase, formando glicerol 3 fosfato, o qual é oxidado a diidroxiacetona fosfato pela glicerol fosfato oxidase, produzindo H_2O_2. Em uma reação catalisada por peroxidase, o H_2O_2 reage com a 4-aminoantipirina e com o 4-clorofenol, resultando em um composto de coloração vermelha, cuja absorbância é proporcional à concentração de TAG na amostra.

A atividade sérica das enzimas ALT e da AST foi avaliada com o auxílio de *kits* comerciais (*Abbott Laboratories,* Chicago, IL, EUA). A técnica baseia-se na medida da taxa de diminuição da absorbância a 340nm devido à oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A ALT presente na amostra catalisa a transferência do grupo amino da L-alanina ao α-cetoglutarato, formando piruvato e L-glutamato. O piruvato, na presença de NADH e lactato desidrogenase, é reduzido a L-lactato, enquanto o NADH é oxidado a NAD. A AST presente na amostra catalisa a transferência do grupo amino do L-aspartato ao α-cetoglutarato, formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato, na presença de NADH e malato desidrogenase, é reduzido a L-malato e o NADH é oxidado a NAD.

A concentração sérica de glicose foi quantificada com o *kit* Glicose HK Liquiform (Labtest Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brasil). A adenosina trifosfato (ATP) promove a fosforilação da glicose em uma reação catalisada pela hexoquinase. A glicose-6-fosfato produzida é oxidada a 6-fosfogluconato, na presença de NAD, em reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase. O

NADH produzido é diretamente proporcional à concentração da glicose na amostra. A absorbância resultante é medida a 340 nm.

3.5.2 Determinação das concentrações séricas de insulina, leptina, adiponectina, IL-6, PAI-1, TNF-α e PCR

As concentrações séricas de insulina, leptina e adiponectina, IL-6, PAI-1, TNF-α e PCR foram quantificadas utilizando-se o *kit* Lincoplex (Linco Research Inc., St. Charles, MO), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.6 Obtenção de células da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral, imediatamente após os animais serem anestesiados com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, eutanasiados e exsanguinados. Em condições assépticas, as células da medula óssea foram obtidas pela lavagem da cavidade femoral com meio Iscove's (Sigma®, Chemical Company, USA), pH 7,4, estéril suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab do Brasil®) e com 100 UI/mL de penicilina G sódica e 100 μg/mL de estreptomicina (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão celular foi colocada em tubos Falcon, cuidadosamente homogeneizada com pipeta Pasteur e mantida em banho de gelo. As células obtidas foram utilizadas para realizar mielograma, cultura de células e citometria de fluxo.

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico. Todo o material utilizado para a realização dos experimentos envolvendo células da medula óssea estava estéril e apirogênico.

3.7 Viabilidade celular

A viabilidade celular de todos os materiais biológicos foi avaliada por meio do teste de exclusão do azul de tripano 1% (CZARNETZKY; COWAN; BELCHER, 1975; FALLON *et al.*, 1962; KING *et al.*, 1959). Os resultados obtidos foram superiores a 90% de células viáveis para todos os ensaios realizados.

3.8 Análises hematológicas

3.8.1 Hemograma e contagem de reticulócitos

A partir de sangue total, foram realizados o hemograma e a contagem de reticulócitos. A dosagem de hemoglobina, a determinação do volume do hematócrito e a contagem global de hemácias e leucócitos foram feitas pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX DIAGNOSTICS).

Utilizando-se a relação entre hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos foi possível calcular os índices hematimétricos: volume corpuscular

médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

As contagens diferenciais dos leucócitos foram feitas em extensões sanguíneas preparadas imediatamente após a coleta e coradas pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, contando-se, no mínimo, 100 leucócitos. Os reticulócitos foram determinados pela coloração supravital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949).

3.8.2 Mielograma

A partir das amostras da suspensão total de células da medula óssea e imediatamente após a coleta, os diferentes tipos celulares foram avaliados pela análise morfológica realizada em lâmina, previamente submetidos à citocentrifugação (Incibras®) e corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947); para a análise diferencial foram contadas 300 células ao microscópio óptico. A contagem total de células foi realizada em hemocitômetro de Neubauer, após diluição das amostras da suspensão celular com meio de cultura Iscove's.

A classificação das células da linhagem granulocítica foi baseada na relação núcleo-citoplasma, na afinidade tintorial do citoplasma, na presença ou não de granulações primária e secundária no citoplasma, no padrão de

cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, no diâmetro e segmentação ou não do nucléolo. Na série granulocítica, consideramos quatro etapas maturativas: *(i)* blastos envolvendo o hemocitoblasto e o mieloblasto; *(ii)* formas jovens englobando o promielócito e o mielócito; *(iii)* formas em anel correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; *(iv)* segmentados envolvendo as formas segmentadas a partir de dois lóbulos nucleares (BORELLI; MARIANO; BROJEVIC, 1995).

Os precursores eritroides foram classificados em: *(i)* eritroblastos jovens envolvendo proeritroblastos e eritroblastos basófilos; *(ii)* eritroblastos policromáticos englobando todas as etapas em que as células apresentaram cromatina condensada e citoplasma policromático; *(iii)* eritroblastos ortocromáticos incluindo células com núcleo apresentando cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico. Quando as células apresentaram assincronismo maturativo, prevaleceu aspecto da cromatina nuclear para identificação da etapa maturativa.

A identificação dos monoblastos e dos plasmoblastos seguiu os critérios morfológicos do padrão de cromatina nuclear e basofilia do citoplasma.

Promonócitos, monócitos e macrófagos foram reunidos em um grupo de células denominadas de monomacrofágicas.

As células da linhagem linfoide envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos. As células da linhagem plasmocitária foram agrupadas como plasmócitos.

3.9 Avaliação histopatológica medular

Para a obtenção do material histológico, os animais foram anestesiados conforme descrito no item 3.4 e eutanasiados por decapitação, procedendo-se a retirada do esterno dos animais de ambos os grupos. O esterno foi colocado dentro de cassetes, deixando-o imerso e sob agitação, em paraformaldeído 4% por 24 horas para fixação. Posteriormente, o cassete foi transferido para uma solução de EDTA 10%, pH 7,4 durante 7 dias para descalcificação.

Os tecidos foram emblocados em parafina e os cortes, de aproximadamente 5 µm, corados por hematoxilina e eosina (H/E). As preparações histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.10 Obtenção de células mononucleares da medula óssea

As células mononucleares da medula óssea foram obtidas utilizando Fycoll-Hypaque (Gibco, Grand Island, NY, USA). Após coleta das células da medula óssea com meio Iscove's (Sigma®, Chemical Company, USA), pH 7,4, estéril e contagem em hemocitômetro de Neubauer, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 1.500 rpm e as células ressuspensas em 3 mL de meio Iscove's. Adicionou-se a suspensão celular no tubo falcon contendo 3 mL de Fycoll-Hypaque, sendo a suspensão novamente centrifugada por 30 minutos a 400 g. À suspensão celular foram adicionados 2 mL de meio Iscove's para

neutralizar a ação do Fycoll-Hypaque, que foi lavada 2 vezes, em centrífuga a 1.500 rpm, durante 10 minutos. Após a última lavagem, o sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de meio Iscove's, pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina G sódica e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma® Chemical Company, USA). A contagem de células totais e a viabilidade celular foram avaliadas com o azul de tripan 1% em hemocitômetro de Neubauer.

3.11 Caracterização da porcentagem de células CD34 e CD133 positivas da medula óssea por citometria de fluxo

As células da medula óssea foram utilizadas para avaliação da porcentagem de células CD34 e CD133 positivas. As células foram obtidas como descrito no item 3.6 e centrifugadas por 10 minutos a 300 g. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 400 µL de PBS, pH 7,2. Para cada $1x10^6$ células/mL de suspensão celular, de ambos os grupos, foram utilizados 2 a 5 µL dos anticorpos, CD34 e CD133, sendo incubado por 20 minutos, em temperatura de 20 a 25°C. Após este período, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 300 g, o sobrenadante retirado e o sedimento celular lavado duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS), sendo que, após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 400 µL de PBS e submetido à análise por citometria de fluxo. O total de 100.000 eventos foi adquirido em citômetro de fluxo contendo *laser* de argônio de 488nm e 15mW modelo FACS CALIBUR (Becton Dickinson) e as análises foram realizadas

empregando-se o programa Cell Quest Pro. Em todos os casos, foi feita, como controle, a marcação para o isotipo de cada cadeia do anticorpo.

3.12 Avaliação do perfil proliferativo das células totais da medula óssea utilizando iodeto de propídeo e RNAse, por citometria de fluxo

As suspensões de células da medula óssea foram obtidas como descrito no item 3.6. Foram utilizadas $1x10^6$ células da medula óssea, que foram centrifugadas por 10 minutos, 300 g a 4^oC. O sobrenadante foi retirado e o sedimento celular lavado com PBS (solução de tampão fosfato, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de iodeto de propídeo (PI) (BD Biosciences Pharmigem) em $1x10^6$ células.

Após este período, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300 g, o sobrenadante retirado e o sedimento celular lavado duas vezes com PBS, sendo que, após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de PBS. Foram adicionados 200 µL de solução de iodeto de propídeo para marcação (5 µL de Triton–X100, 20 µL de RNAse a 20 mg/mL, 50 µL de uma solução estoque de PI a 50 µg/mL) e submetida à análise por citometria de fluxo.

3.13 Avaliação do perfil proliferativo de células $CD34^+$ e $CD133^+$ da medula óssea utilizando 7AAD, por citometria de fluxo

As células mononucleares foram obtidas conforme item 3.10 e fixadas em paraformaldeído 2% por 30 minutos, permeabilizadas com saponina 0,01% por 15 minutos e tratadas com 4 mg/ml RNase a 37°C por 1 h. A seguir, procedeu-se às marcações. Foram utilizados os anticorpos primários CD34 e CD133 por 40 min. O anticorpo CD34 foi revelado com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. O anticorpo CD133 foi revelado com anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 647. As amostras foram marcadas com anti-CD34 e anti-CD133. O DNA foi marcado com 7AAD 10 μg/ml, cuja emissão é capturada no detector FL-1.

A análise do ciclo celular foi realizada quantificando-se a porcentagem das regiões sub-G_0/G_1, G_1/G_0 e $S/G_2/M$, utilizando os programas CELLQuest (versão 3.4, Becton Dickinson) e ModFit 3.0.

3.14 Proliferação das células mononucleares frente a fatores de crescimento IL-3, GM-CSF, G-CSF e EPO: ensaio de cultura líquida

Após a coleta, a suspensão de células totais foi submetida à separação de células mononucleares, por meio de gradiente de concentração utilizando

Histopac®. Em 3 mL de Histopac foi adicionada a suspensão celular, que foi centrifugada por 30 minutos a 1.500 rpm. Após a centrifugação, a camada mononuclear foi separada, lavada 3 vezes em meio de cultura, durante 10 minutos a 1.300 rpm cada lavagem, e, ao final, ressuspensa em 1 mL de meio. A contagem de células totais e a viabilidade celular foram avaliadas com o azul de tripan 1% em hemocitômetro de Neubauer.

Após determinação da viabilidade e do número total de células, foram plaqueadas $1x10^6$ células por poço em placas de 24 poços de baixa aderência (SARTDEST®, EUA), em meio Iscove's, pH 7,4, estéril, suplementado com 10% de soro bovino fetal e fatores de crescimento (IL3 – 0,1 ng/mL; EPO – 1UI; GM-CSF – 0,2 ng/mL e G-CSF – 2 ng/ml) em volume final de 1 mL/poço. As placas de cultura foram mantidas por 5 dias a 37°C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Como controle negativo, foram plaqueadas, em quadruplicata, $1x10^6$ células/poço em meio Iscove's, pH 7,4, estéril, suplementado com 10 % de soro bovino fetal, porém, sem os fatores de crescimento. O número de células viáveis foi avaliado a cada 24 horas durante 5 dias.

3.15 Determinação da proliferação: ensaio de MTT

A suspensão de células mononucleares da medula óssea foi centrifugada por 10 minutos a 300 g e ressuspensa em 1 mL de meio Iscove's, pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina G sódica e 100 µg/mL de estreptomicina. Após determinação da viabilidade celular com azul de tripan 1%, foram plaqueadas, em quadruplicata , $1x10^4$

células mononucleares da medula óssea em placas de 96 *wells* (para a adesão das células estromais) em meio Iscove's suplementado com 10% de soro bovino fetal e fatores de crescimento (IL3 – 0,1 ng/mL; EPO – 1 UI; GM-CSF – 0,2 ng/mL e G-CSF – 2 ng/ml) em volume final de 150 µL/poço.

As placas de cultura foram mantidas por 5 dias a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Como controle negativo foram plaqueadas, em quadruplicata , 1x10^4 células/poço em meio Iscove's suplementado com 10% de soro bovino fetal, porém, sem os fatores de crescimento. Foi realizada uma curva padrão conforme amostragem abaixo (**Gráfico 1).**

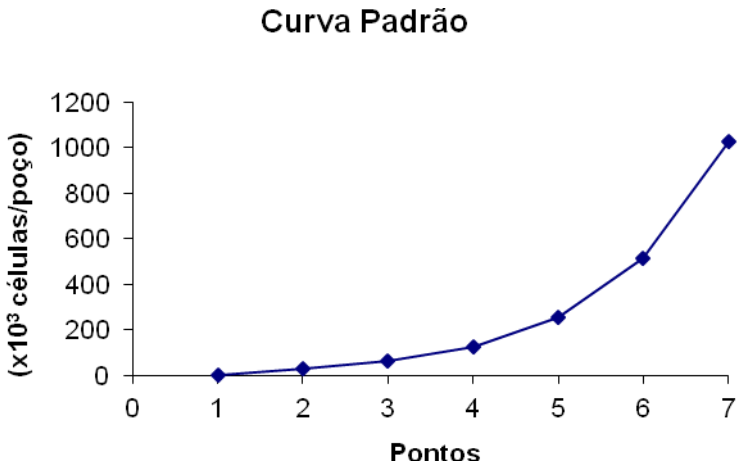


Gráfico 1. Curva padrão utilizando as seguintes concentrações de células: 0, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 x10^3 células/poço (em quadruplicata).

Posteriormente, tanto nas amostras previamente incubadas quanto na curva padrão foram adicionados 10 µL da solução de MTT (azul de tiazol) em cada poço, na concentração de 5mg/mL, sendo as placas novamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, por 4 horas. Após esse período de

incubação, foram adicionados 100 μL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% em ácido clorídrico (HCl) 0,01M em cada poço, seguido de nova incubação de 12 a 48 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Em um leitor de placas (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instrumentals, Inc) foram obtidas as absorbâncias a 550nm.

3.16 Ensaio clonogênico em meio semissólido

Após a coleta, a suspensão de células totais foi submetida à separação de células mononucleares conforme descrito no item 3.10. A contagem de células totais e a viabilidade celular foram avaliadas com o azul de tripan 1% em hemocitômetro de Neubauer.

Foram plaqueadas, em quadruplicata, $5x10^5$ células mononucleares/poço da medula óssea em meio metilcelulose (MethoCult®, Schnologies Inc.) e fatores de crescimento (IL3 – 0,1 ng/mL; EPO – 1 UI; GM-CSF – 0,2 ng/mL e G-CSF – 2 ng/ml) em volume final de 1 mL/poço. Foram utilizadas placas de cultura de plásticos 35 mm (Nunc, IL, USA).

As placas de cultura de plásticos 35 mm foram mantidas por 21 dias a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Como controle negativo, foram plaqueadas, em quadruplicata, $5x10^5$ células/poço contendo todos os reagentes, exceto fatores de crescimento.

O número de *clusters* e colônias, além do número de células viáveis e a morfologia, foram avaliados nos dias 7, 14 e 21 da cultura. As colônias foram

definidas, inicialmente pelo seu aspecto morfológico, como sendo GM-CSF (granulócitos e/ou macrófagos), unidade formadora de colônia de granulócitos (CFU-G), BFU-E (dois ou mais *clusters* de células eritroides) e CFU-GEMMcom células mistas.

As células foram analisadas sob microscopia óptica convencional, nos períodos de 7, 14 e 21 dias de cultura, contando-se no mínimo 200 células em cada lâmina (BORELLI; MARIANO; BROJEVIC, 1995).

3.17 Avaliação da capacidade de células totais da medula em sintetizar GM-CSF, G-CSF, IL-1α, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, INF-γ, SCF, TNF-α e VEGF

As células da medula óssea, de ambos os grupos, foram coletadas conforme descrito no item 3.6. Foram plaqueadas, em quadruplicata, $1x10^6$ células totais/poço da medula óssea em meio Iscove's, pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina G sódica e 100 µg/mL de estreptomicina. As placas de cultura foram mantidas por 24 horas a 37 ^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

Posteriormente, o sobrenadante foi colhido, aliquotado em frascos estéreis livres de pirogênio e congelado até o momento da análise para a detecção de citocinas.

A quantificação *in vitro* de GM-CSF, G-CSF, IL-1α, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, INF- γ, SCF, TNF-α e VEGF foi realizada por multiplex.

3.18 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *Graph Pad Prism 5.* Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva normal (curva gaussiana). Dados obtidos em nossos experimentos foram submetidos à análise estatística por teste “t”, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p<0,05$. Os resultados obtidos da cultura líquida e ensaios clonogênicos da medula óssea de animais controle e hiperlipídicos foram analisados usando 3-way ANOVA e foram comparados entre si usando o teste de Duncan ($p \leq 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do consumo de ração, quilocalorias, lipídios e variação do peso corpóreo

Os animais do grupo experimental apresentaram significativa redução do consumo de ração, aumento do consumo de lipídios, porém, o consumo de quilocalorias não apresentou diferenças estatisticamente significativas. A porcentagem da variação final do peso corporal, ou seja, o ganho de peso durante as 12 semanas do processo de indução da adiposidade corpórea, dos animais do grupo experimental, apresentou aumento estatístico significativo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Consumo de ração, quilocalorias, lipídios e variação do peso corpóreo.

Grupos	**Controle (n=14)**	**Experimental (n=14)**
Consumo de ração (g/dia/animal)	24,93 ± 3,03	17,39 ± 2,19 ***
Consumo de quilocalorias (kcal/dia/animal)	99,48 ± 12,1	96,54 ± 12,17
Consumo de lipídios (g/dia/animal)	1,03 ± 0,12	6,53 ± 0,82 ***
Variação do peso corpóreo (%)	+66,5 ± 6,48	+80,1 ± 14,10 *

Resultados em valores médios do peso em gramas (g) do consumo de ração, quilocalorias em kcal, lipídiolipídios em (g) e variação do peso corpóreo (%). * Valores significativos para p≤ 0,05 e *** p≤ 0,001. **n** representa o número de animais avaliados.

4.2 Avaliação dos coxins adiposos: periepididimal e retroperitoneal

A avaliação dos pesos dos coxins adiposos revelou que os animais do grupo experimental apresentaram maior peso de gordura periepididimal e de gordura retroperitoneal quando comparados com os respectivos controles (**Gráfico 2**), indicando depósito central de gordura.

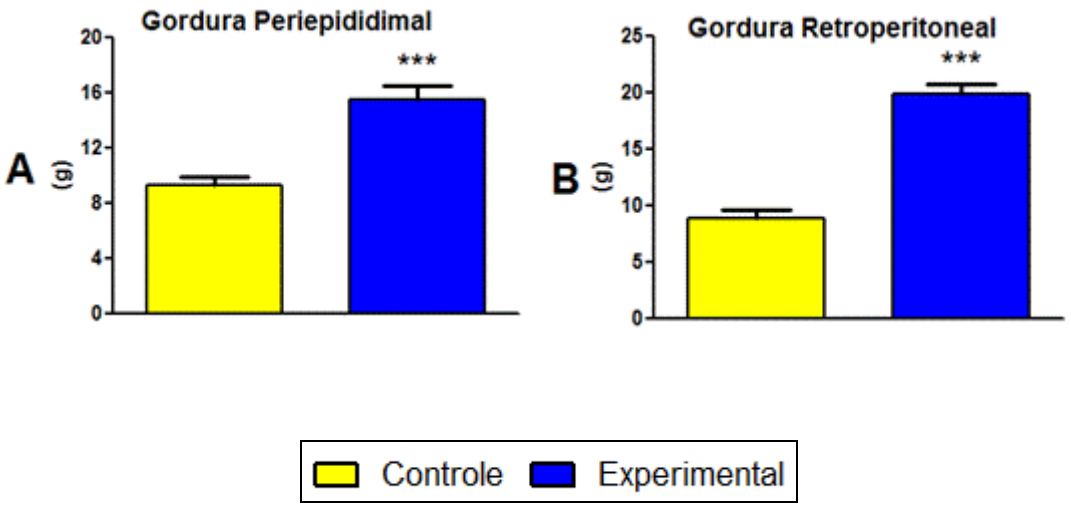


Gráfico 2. Resultados em valores médios ± o SEM do peso em gramas (g) da **(A)** gordura periepididimal **(B)** retroperitoneal em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *** Valores significativos para p≤ 0,001. **n** representa o número de animais avaliados.

4.3 Avaliação da concentração sérica de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triacilgliceróis

A avaliação da concentração sérica de colesterol total, VLDL-c, HDL-c e LDL-c revelou que os animais experimentais apresentaram aumento significativo quando comparados com os controles, caracterizando hipercolesterolemia. No entanto, não houve diferença entre os grupos ao avaliarmos a concentração de HDL (**Gráfico 3**).

Os animais do grupo experimental apresentaram aumento de triacilglicerol quando comparado com o controle (**Gráfico 4**).

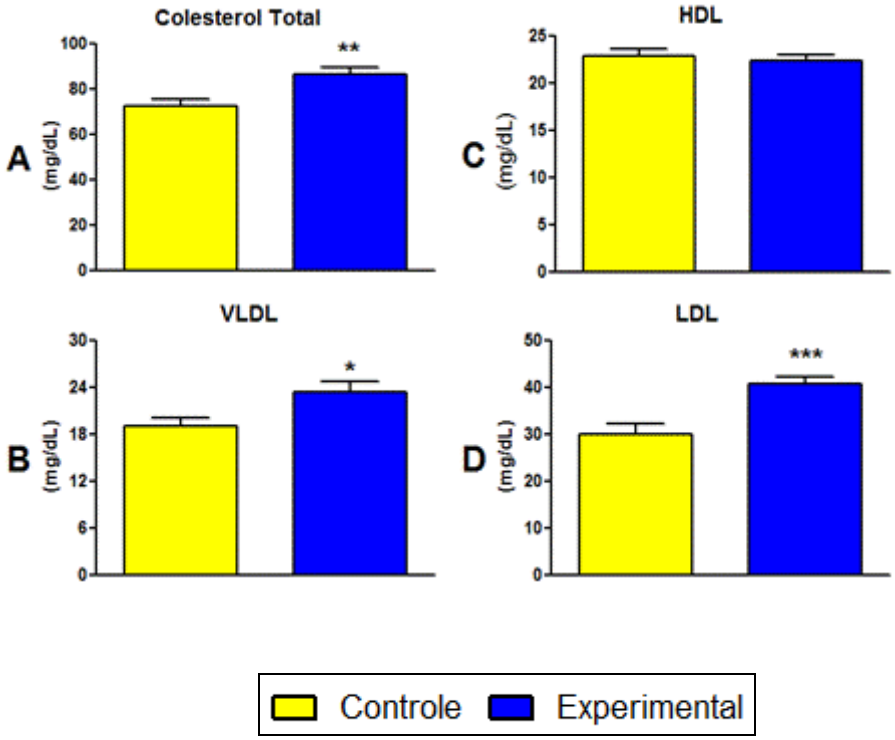


Gráfico 3. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em mg/dL de **(A)** colesterol total **(B)** VLDL-c **(C)** HDL-c e **(D)** LDL-c em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05 ,** p≤ 0,01 e *** p≤ 0,001. **n** representa o número de animais avaliados.

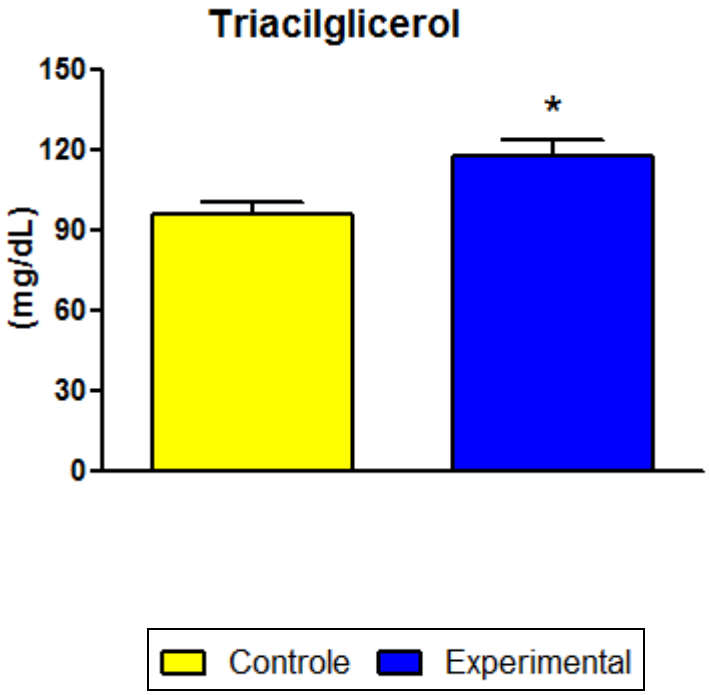


Gráfico 4. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em mg/dL de triacilglicerol em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.4 Avaliação da concentração de insulina e glicemia de jejum

Ao avaliarmos a concentração de insulina (**Gráfico 5 A**) e de glicemia de jejum (**Gráfico 5 B**); observamos que não houve diferença significativa entre o grupo experimental e o grupo controle.

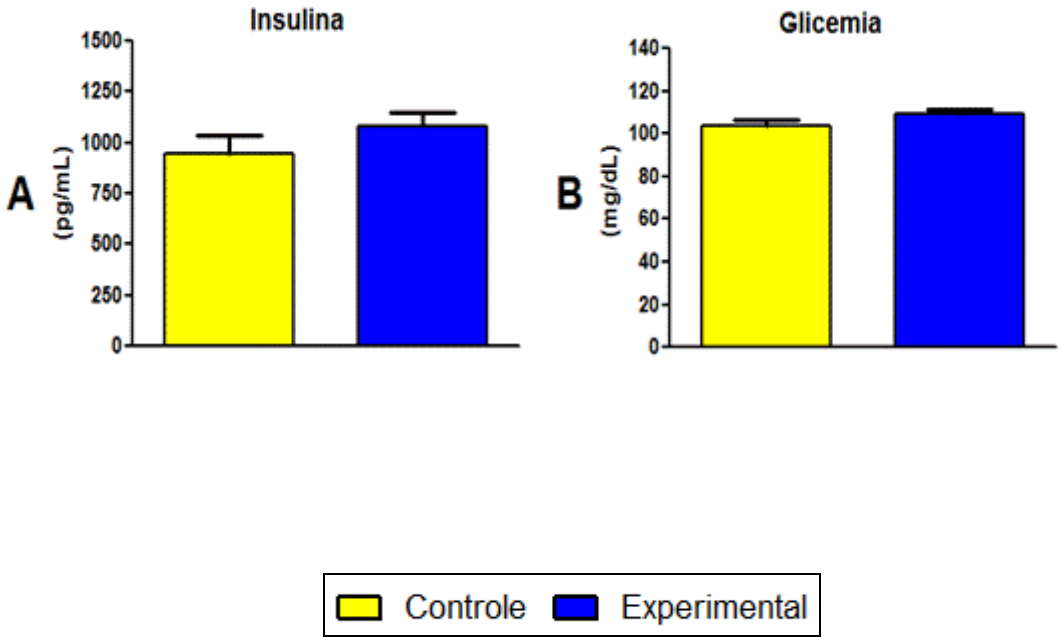


Gráfico 5. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em pg/mL de **(A)** insulina e **(B)** glicemia de jejum em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.5 Avaliação da concentração sérica de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase

Ao avaliarmos a concentração sérica de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) observamos que não houve diferença significativa entre os grupos (**Gráfico 6**).

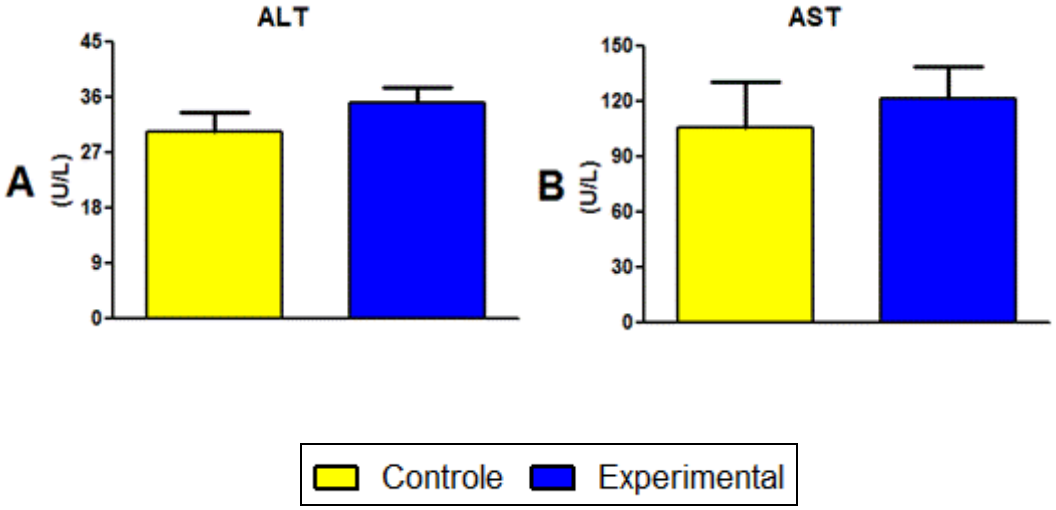


Gráfico 6. Resultados em valores médios ± o SEM da concentração sérica em U/L de **(A)** alanina aminotransferase e **(B)** aspartato aminotransferase em animais dos grupos **controle** (n=6 animais) e **experimental** (n=6 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.6 Avaliação das concentrações de leptina e adiponectina

Os animais do grupo experimental apresentaram concentração de leptina significativamente maior quando comparados com os animais do grupo controle (**Gráfico 7 A**). Ao analisarmos a concentração de adiponectina verificamos que não houve diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 7 B**).

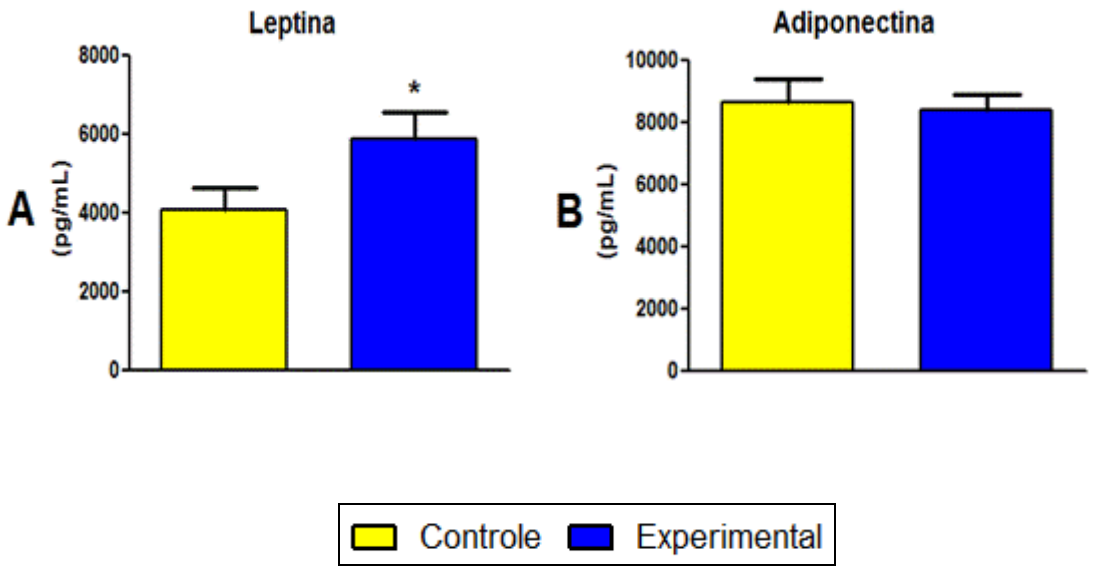


Gráfico 7. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em pg/mL de **(A)** leptina e **(B)** adiponectina em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

4.7 Avaliação da concentração de corticosterona sérica

A dosagem de corticosterona realizada no soro dos animais de ambos os grupos apresentou aumento significativo nos animais do grupo experimental quando comparado com o grupo controle (**Gráfico 8**).

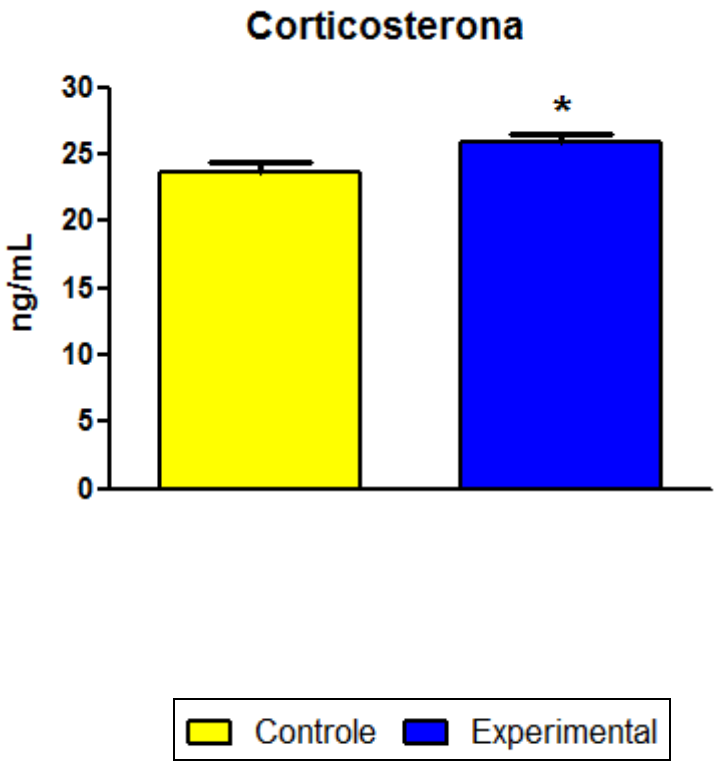


Gráfico 8. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em ng/mL de **(A)** corticosterona em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.8 Avaliação das concentrações circulantes de IL-6, PAI-1, TNF-α e PCR

Nos resultados apresentados no **Gráfico 9 A, B e D** pode-se notar que a produção de IL-6, TNF-α e PAI-1 não difere estatisticamente quando comparamos o grupo experimental com os respectivos controles. A concentração da proteína C reativa (PCR) foi significativamente maior nos animais experimentais quando comparados com o grupo controle (**Gráfico 9 C)**.

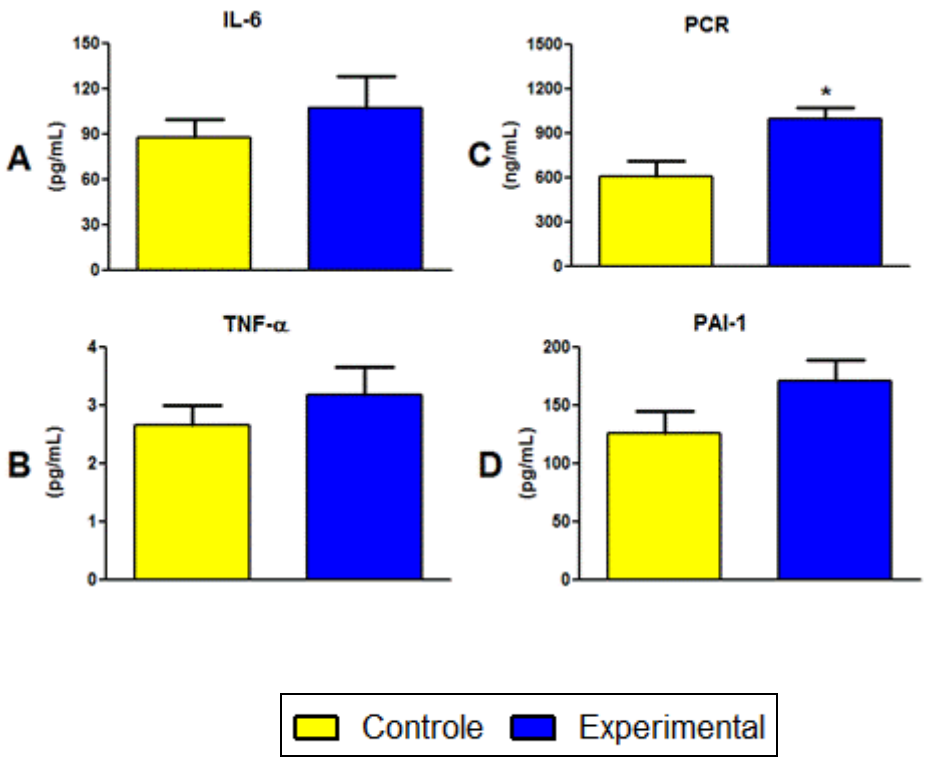


Gráfico 9. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração sérica em pg/mL de **(A)** IL-6 **(B)** TNF-α **(C)** PCR e **(D)** PAI-1 em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.9 Hemograma

4.9.1 Eritrograma

A dieta hiperlipídica não foi capaz de alterar a série vermelha dos animais. Verificou-se que o número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito do grupo experimental não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados aos respectivos controles (**Gráfico 10 A, B e C**).

4.9.2 Índices hematimétricos

Quando analisamos os índices hematimétricos, verificamos que não houve diferença entre os grupos. Observa-se que VCM, HCM e CHCM dos animais do grupo experimental, quando comparados com os respectivos controles, não diferem estatisticamente (**Gráfico 11 A, B e C**).

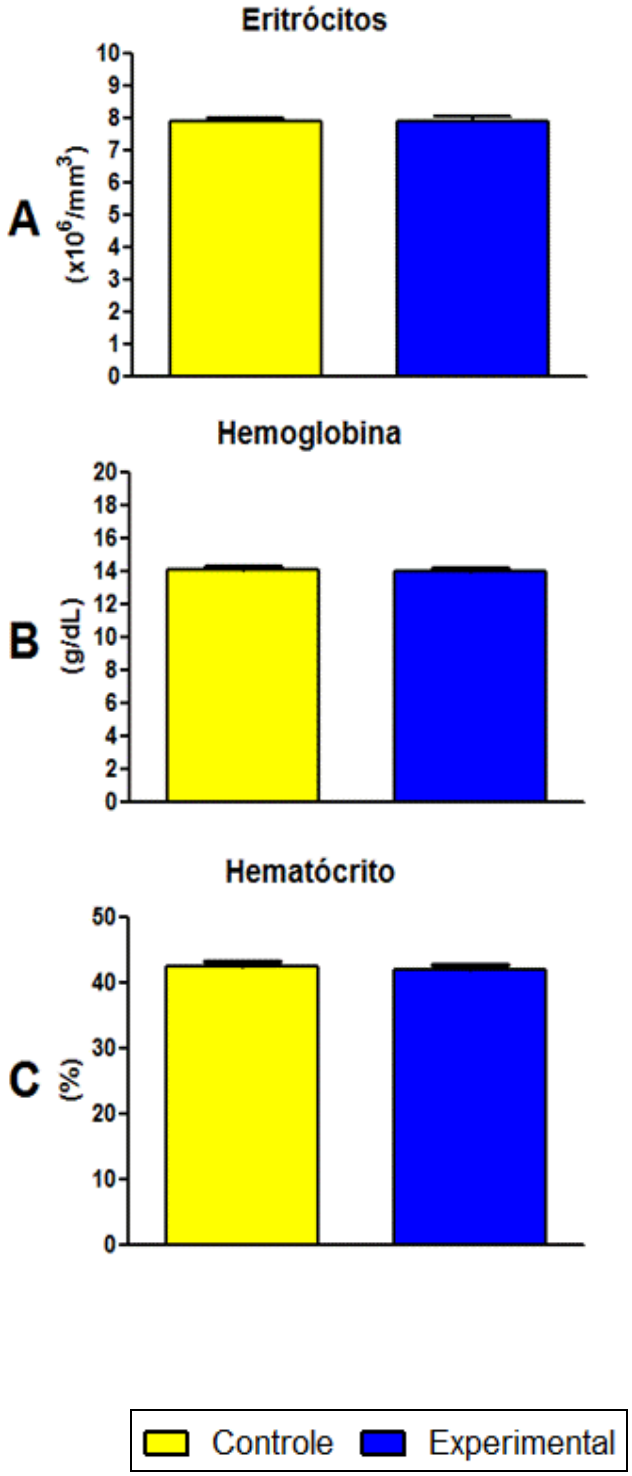


Gráfico 10. Resultados em valores médios ± o SEM do **(A)** número de hemácias **(B)** concentração de hemoglobina e **(C)** porcentagem do hematócrito de animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais).

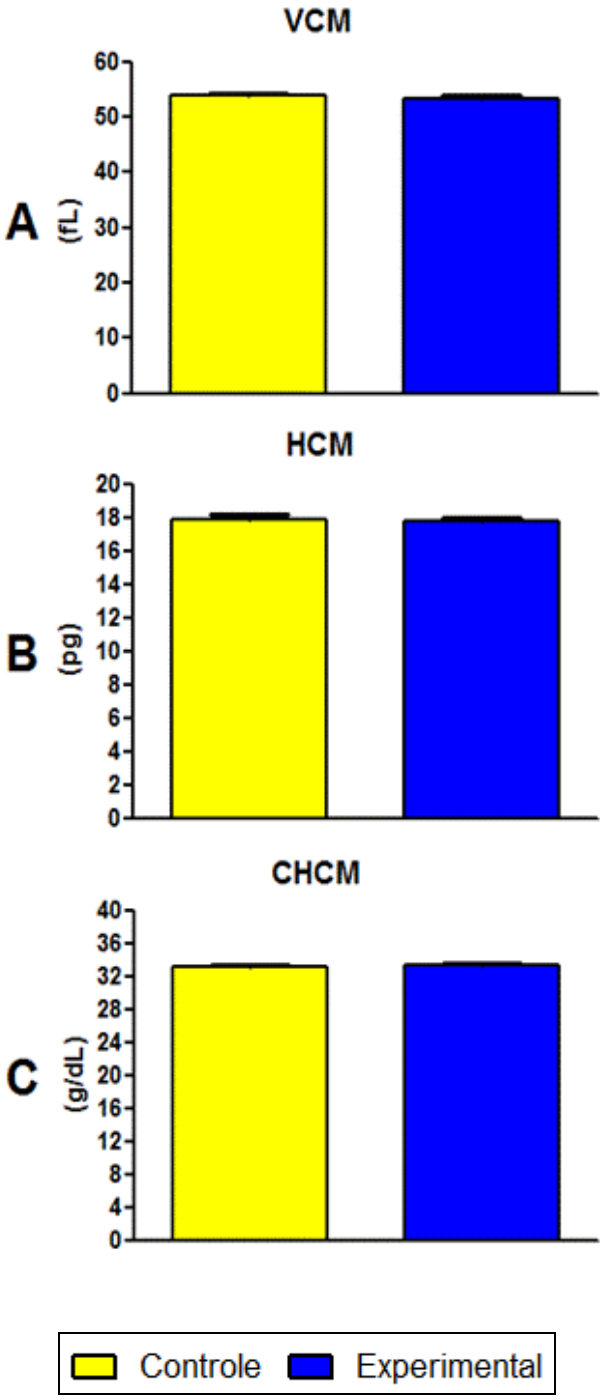


Gráfico 11. Resultado, em valores médios ± o SEM de **(A)** volume corpuscular médio, **(B)** hemoglobina corpuscular média e **(C)** concentração da hemoglobina corpuscular média de animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais).

4.9.3 Leucograma

Ao avaliarmos o número de leucócitos totais do grupo experimental, verificamos que não houve diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle (**Gráfico 12**).

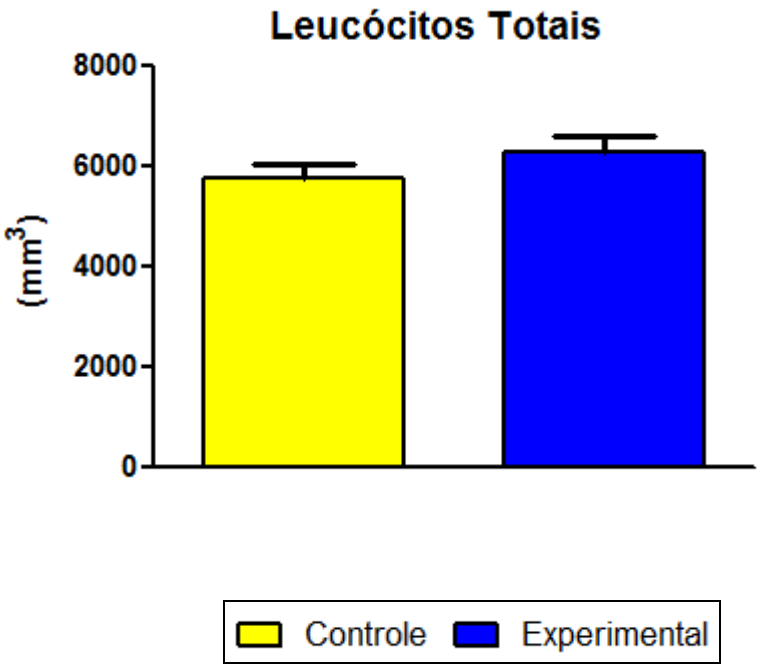


Gráfico 12. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do número total de leucócitos de animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

No entanto, a análise da série leucocitária apresentou aumento significativo do número de neutrófilos nos animais do grupo experimental quando comparado com os animais do grupo controle (**Gráfico 13 A**). O número de eosinófilos foi significativamente menor nos animais do grupo experimental quando comparados com os animais controles (**Gráfico 13 B**).

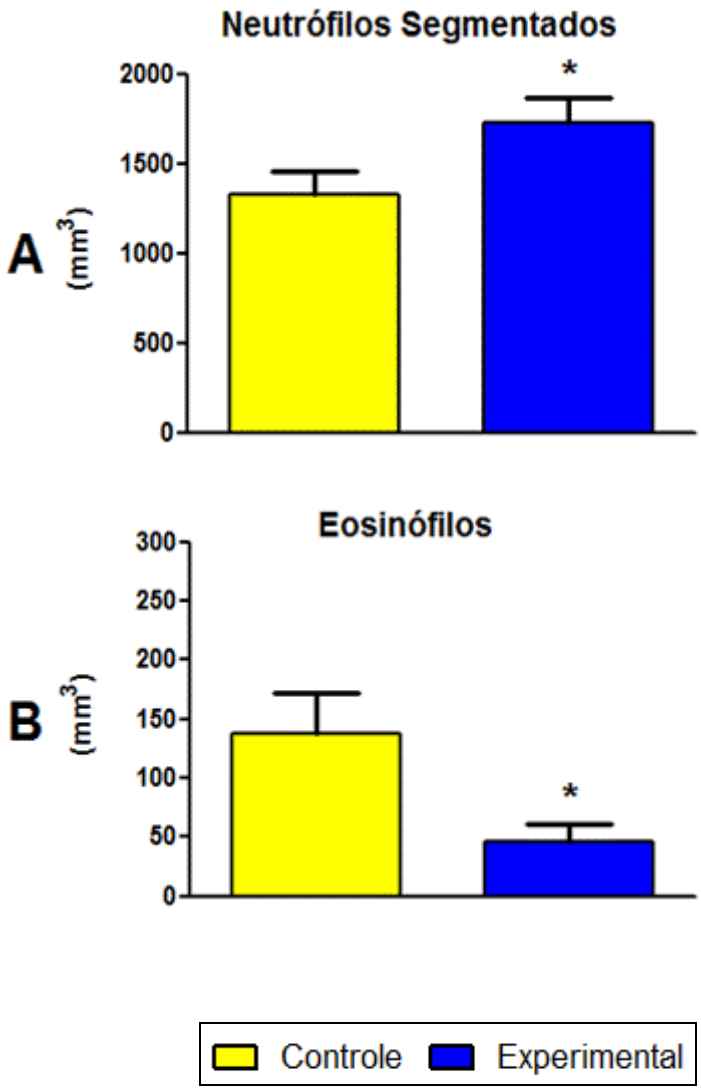


Gráfico 13. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do **(A)** número de neutrófilos segmentados e do **(B)** número de eosinófilos dos animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

Ao analisarmos o número de linfócitos do grupo experimental, observamos que não houve diferença estatística significativa quando comparado com o grupo controle (**Gráfico 14 A**). O número de monócitos não difere estatisticamente entre os grupos experimental e controle (**Gráfico 14 B**).

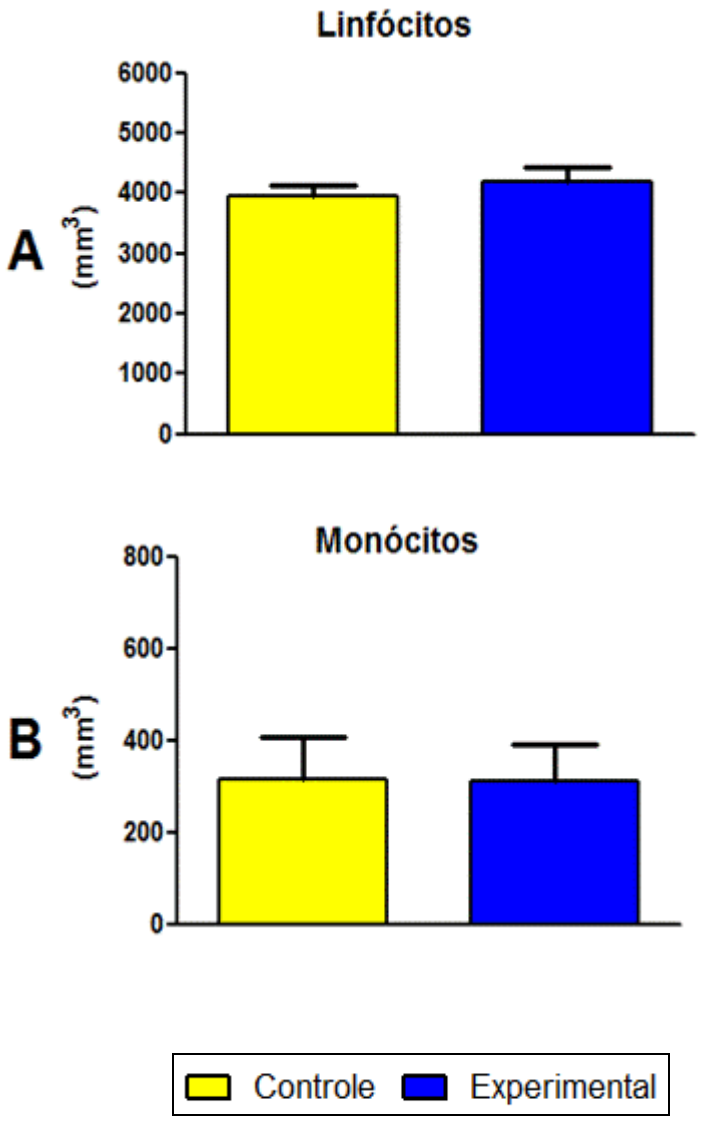


Gráfico 14. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do **(A)** número de linfócitos e do **(B)** número de monócitos de animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais). * Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

4.9.4 Determinação da contagem de plaquetas

A dieta hiperlipídica não alterou a série plaquetária. A análise do número de plaquetas no sangue periférico não apresentou diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 15**).

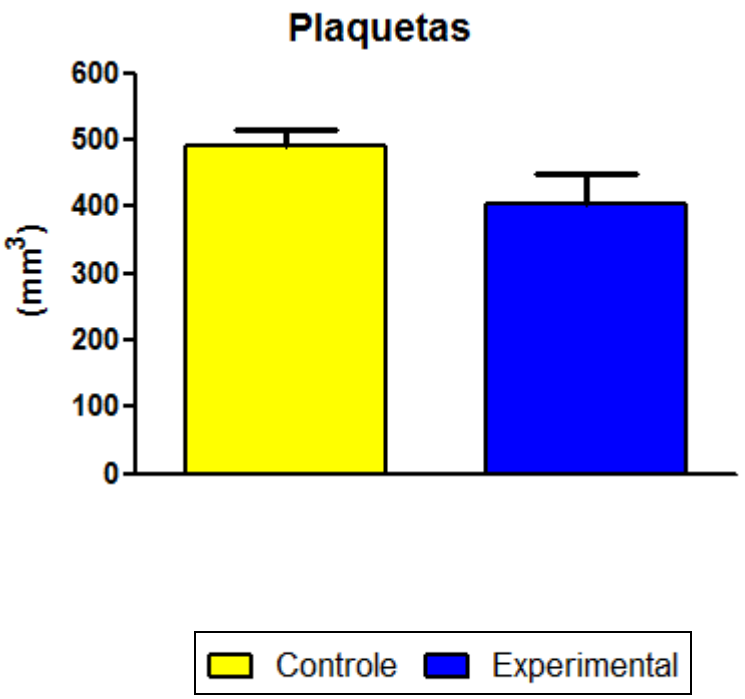


Gráfico 15. Resultados em valores médios ± o SEM em mm^3 do número de plaquetas de animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais). *****Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

4.10 Avaliação da contagem de reticulócitos

Em relação à contagem de reticulócitos, não foram observadas diferenças significativas quando comparamos o grupo experimental e o grupo controle (**Gráfico 16**).

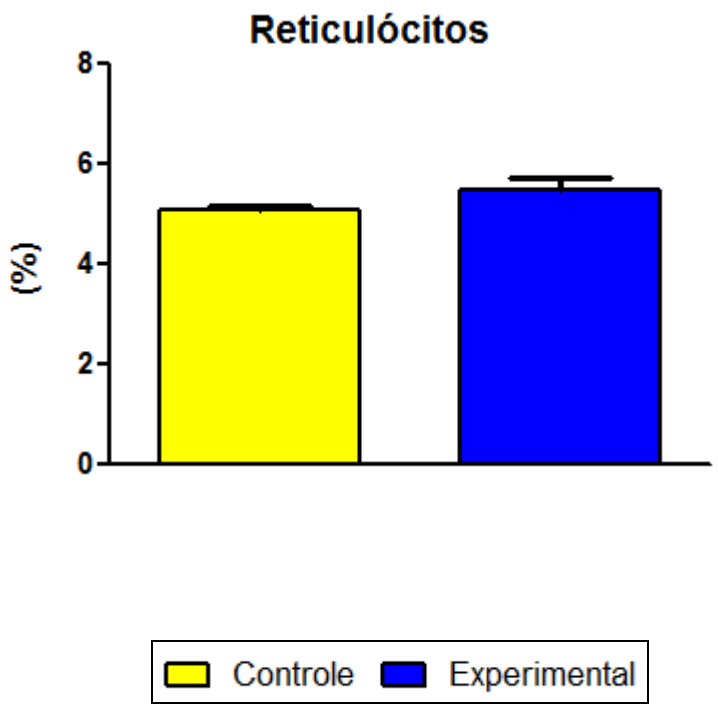


Gráfico 16. Resultado em valores médios ± o SEM em (%) do número de reticulócitos de animais dos grupos **controle** (n=13 animais) e **experimental** (n=13 animais). *****Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11 Mielograma

4.11.1 Número total de células nucleadas presentes na medula óssea

O número total de células nucleadas da medula óssea dos animais do grupo experimental foi significativamente maior quando comparado com o grupo controle (**Gráfico 17**).

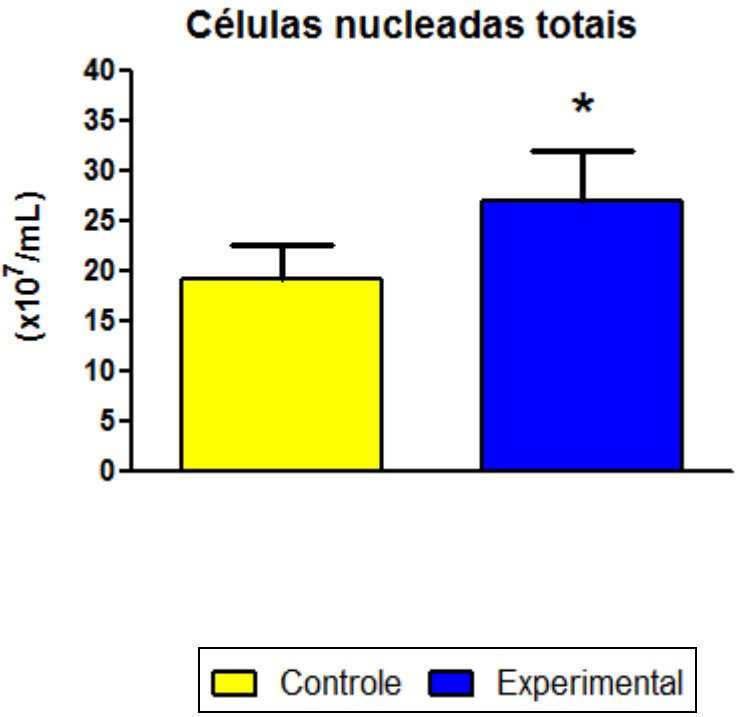


Gráfico 17. Resultados em valores médios ± o SEM do número total de células nucleadas na medula óssea de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.1 Linhagem eritrocitária

Quando analisamos a linhagem eritrocitária (eritroblastos jovens, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos) da medula óssea, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos (**Gráfico 18**).

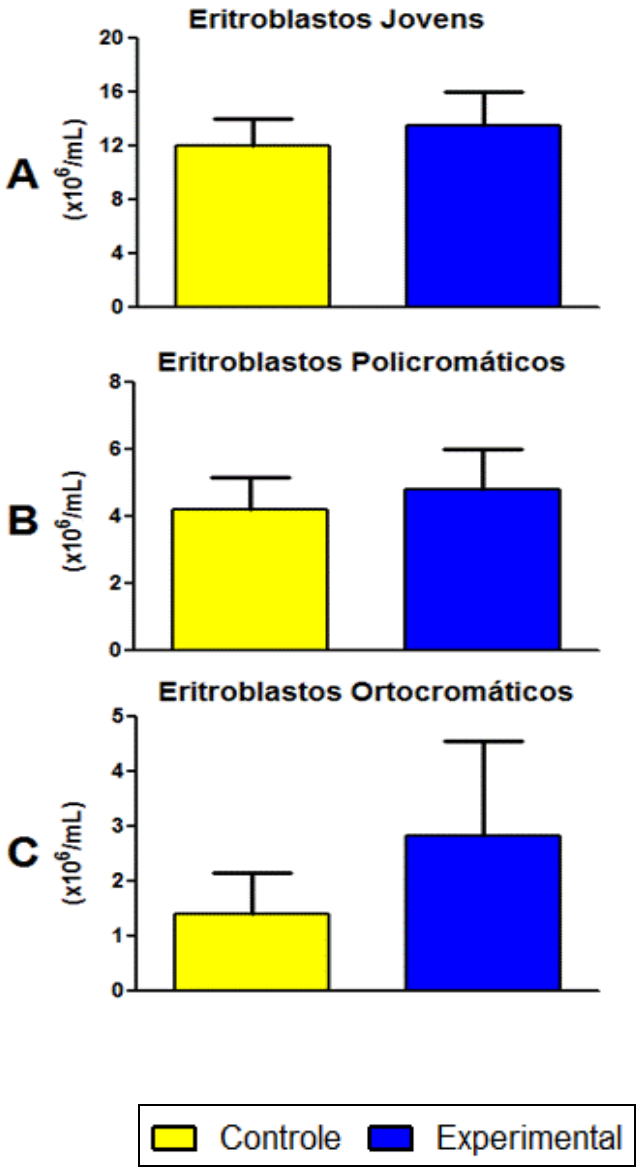


Gráfico 18. Resultado em valores médios ± o SEM do **(A)** número de eritroblastos jovens **(B),** eritroblastos policromáticos e **(C)** eritroblastos ortocromáticos de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). ***Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.2 Linhagem neutrofílica

Podemos observar que a dieta hiperlipídica foi capaz de alterar a série leucocitária. Ao avaliarmos o número de blastos, a forma em anel e a forma jovem (**Gráfico 19 A, B e C**), observamos aumento nos animais do grupo experimental, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

No entanto, os animais do grupo experimental apresentaram aumento estatisticamente significativo no número de neutrófilos segmentados da medula óssea quando comparados com os animais do grupo controle (**Gráfico 19 D**).

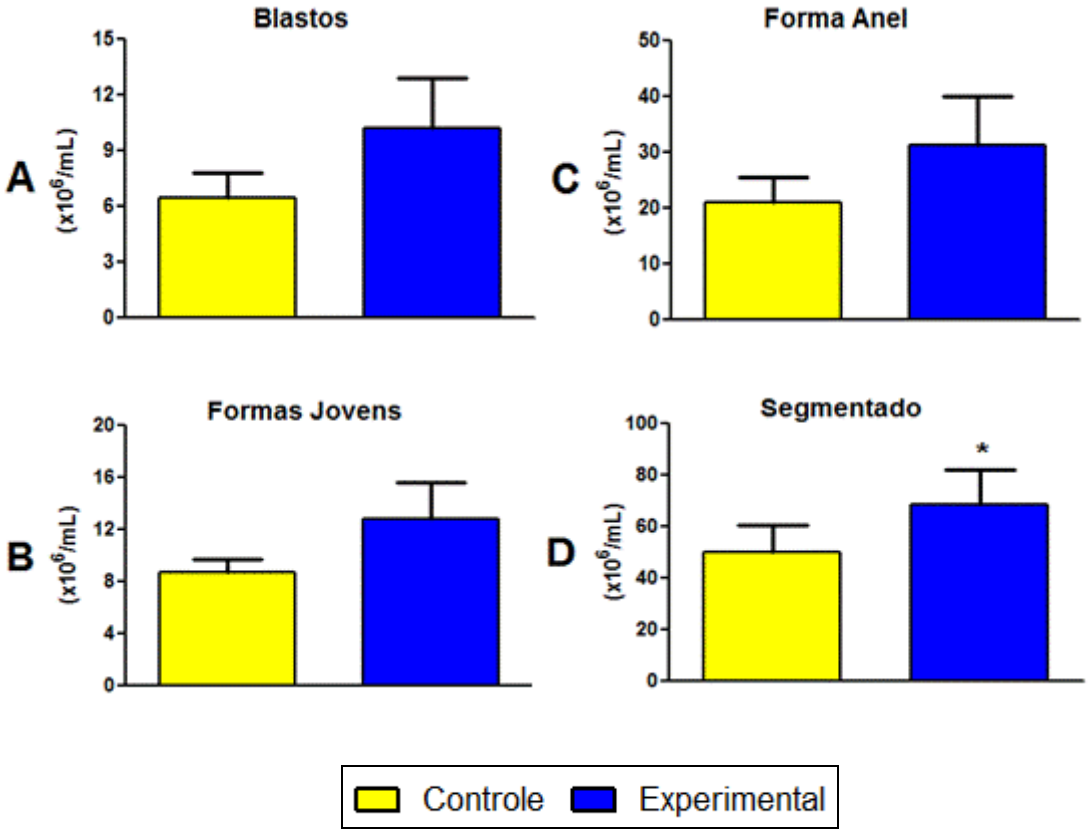


Gráfico 19. Resultados em valores médios ± o SEM do **(A)** número de blastos **(B)** formas jovens, **(C)** formas em anel e **(D)** segmentados da medula óssea de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.3 Linhagem eosinofílica

Os animais do grupo experimental apresentaram aumento significativo do número de eosinófilos quando comparados com os animais do grupo controle (**Gráfico 20**).

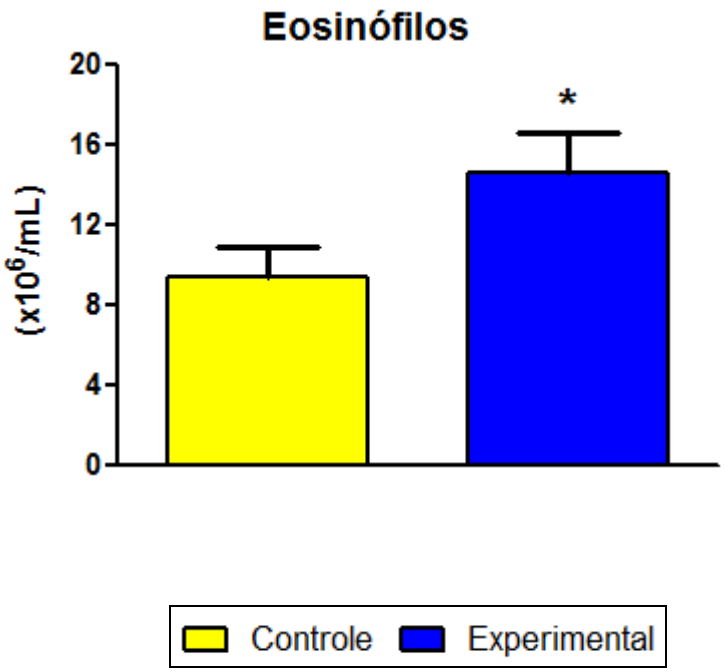


Gráfico 20. Resultados em valores médios ± o SEM do número de eosinófilos da medula óssea de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.4 Linhagem linfoplasmocitária

Os animais do grupo experimental apresentaram aumento estatisticamente significativo do número de linfócitos, quando comparado com os animais do grupo controle (**Gráfico 21 A**). Ao avaliarmos o número de plasmócitos verificamos que não houve diferença entre os grupos (**Gráfico 21 B**).

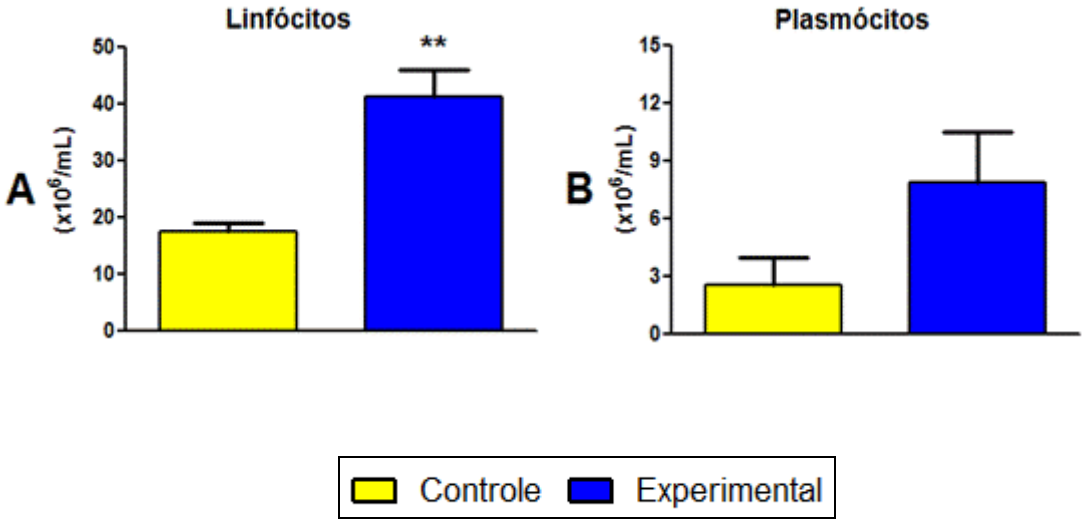


Gráfico 21. Resultados em valores médios ± o SEM do **(A)** número de linfócitos e **(B)** plasmócitos da medula óssea de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). **Valores significativos para $p \leq 0,01$. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.5 Linhagem monomacrofágica

Os animais do grupo experimental apresentaram aumento do número de monócitos, porém essa diferença não foi significativa (**Gráfico 22**).

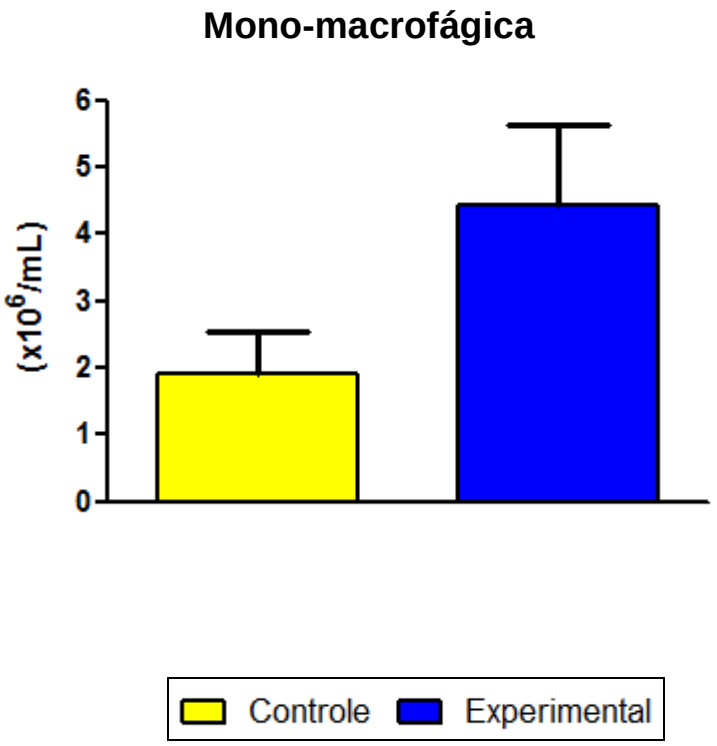


Gráfico 22. Resultados em valores médios ± o SEM do número de células monomacrofágicas da medula óssea de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.6 Linhagem megacariocitária

Ao analisarmos a linhagem megacariocitária de ambos os grupos, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 23**).

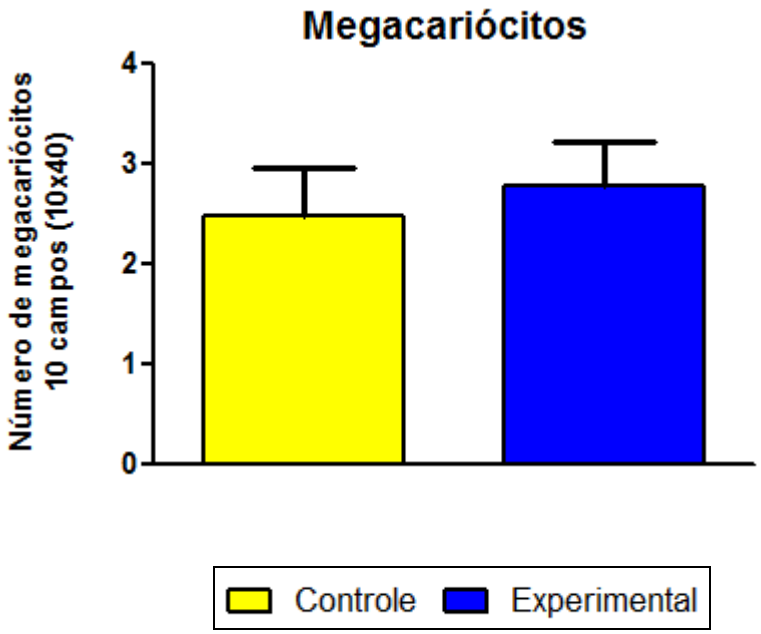


Gráfico 23. Resultados em valores médios ± o SEM do número de megacariócitos de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.1.7 Relação grânulo-eritrocitária (G/E)

A relação grânulo-eritrocitária na medula óssea dos animais do grupo experimental apresentou tendência de aumento em relação aos animais controles, decorrente do aumento da linhagem neutrofílica observada nos animais do grupo experimental (**Gráfico 24**).

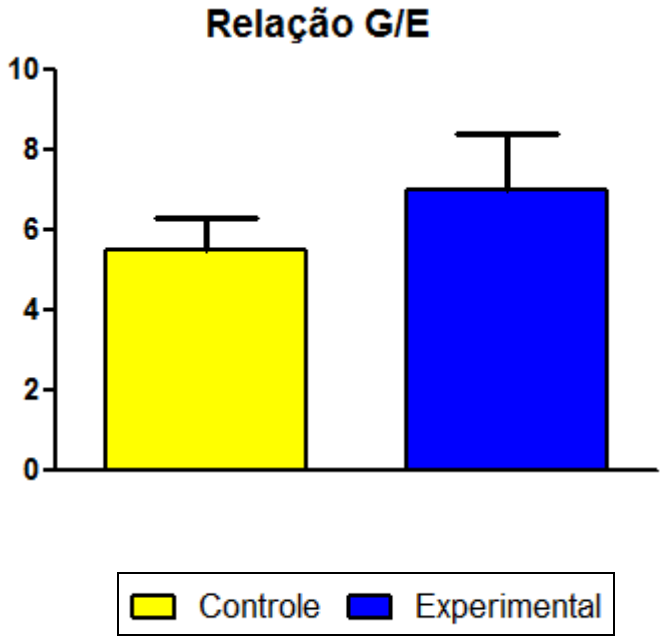


Gráfico 24. Resultados em valores médios ± o SEM da relação G/E da medula óssea de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.2 Análise histológica

4.11.2.1 Medula óssea

Nos animais do grupo experimental, observamos preservação arquitetural, porém com aumento da celularidade, caracterizando a hiperplasia medular. Há predomínio de polimorfonucleares com diferenciação preferencialmente granulocítica, destacando-se o aumento do número de precursores com características mieloides, constituindo agregados com distribuição aleatória pelo parênquima (**Figuras 2 B e 3 B**), ocupando a superfície abluminal sinusoidal. A matriz extracelular encontra-se íntegra, sem evidências de expansão.

Em cortes corados pelo método da reticulina, evidenciou-se preservação no padrão de distribuição de fibras colágenas, com eventual delimitação de pequenas lojas em meio ao parênquima medular (**Figura 4**).

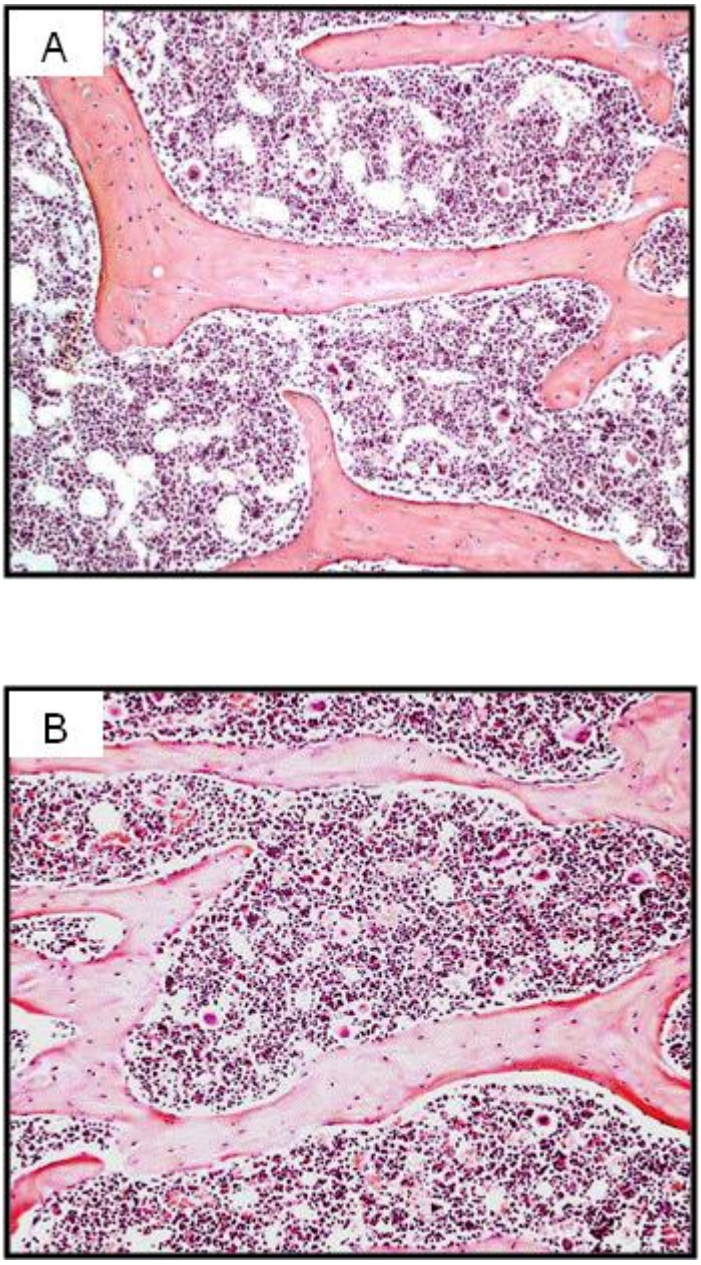


Figura 2. **(A)** Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo **controle** mostrando população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação. Coloração hematoxilina-eosina (aumento de 10x). **(B)** Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo **experimental** evidenciando medula hiperplásica com predomínio granulocítico e exibindo elevada concentração de precursores (setas) distribuídos em agregados. Coloração hematoxilina-eosina (aumento de 10x).

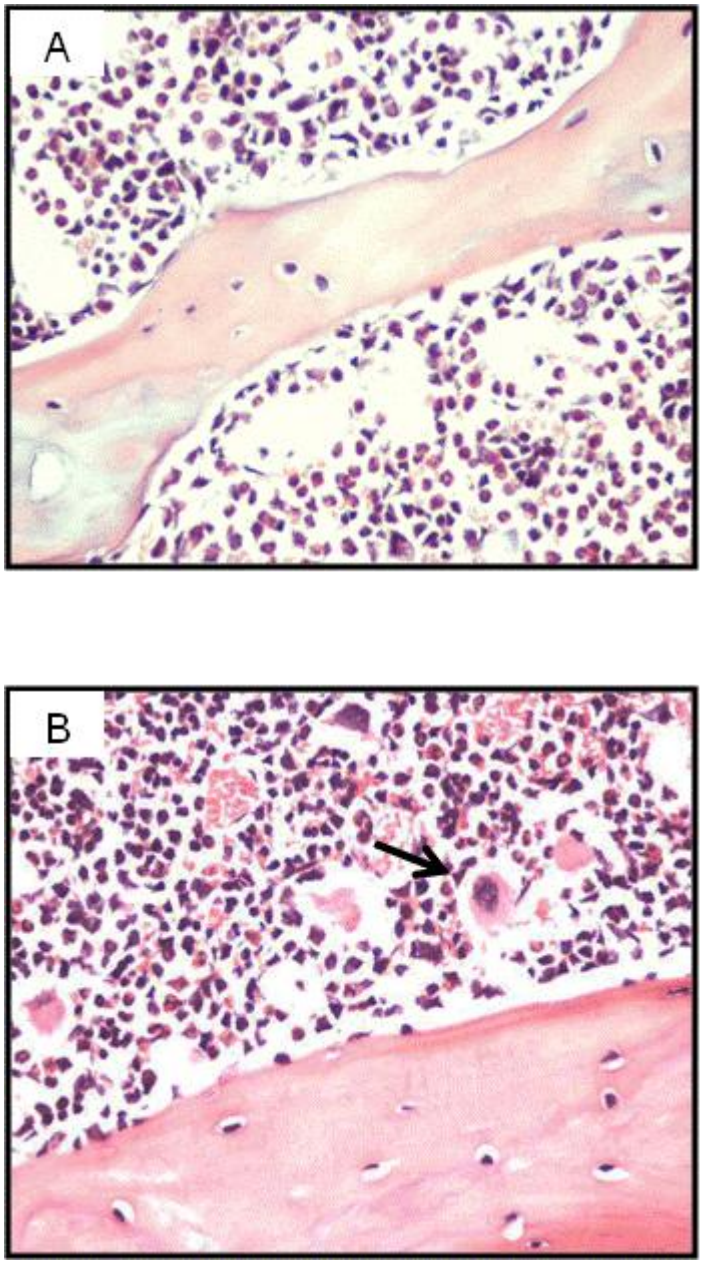


Figura 3. **(A)** Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo **controle** mostrando população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação. Coloração hematoxilina-eosina (aumento de 40x). **(B)** Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* do grupo **experimental** evidenciando medula hiperplásica com predomínio granulocítico e exibindo elevada concentração de precursores (setas) distribuídos em agregados. Coloração hematoxilina-eosina (aumento de 40x).

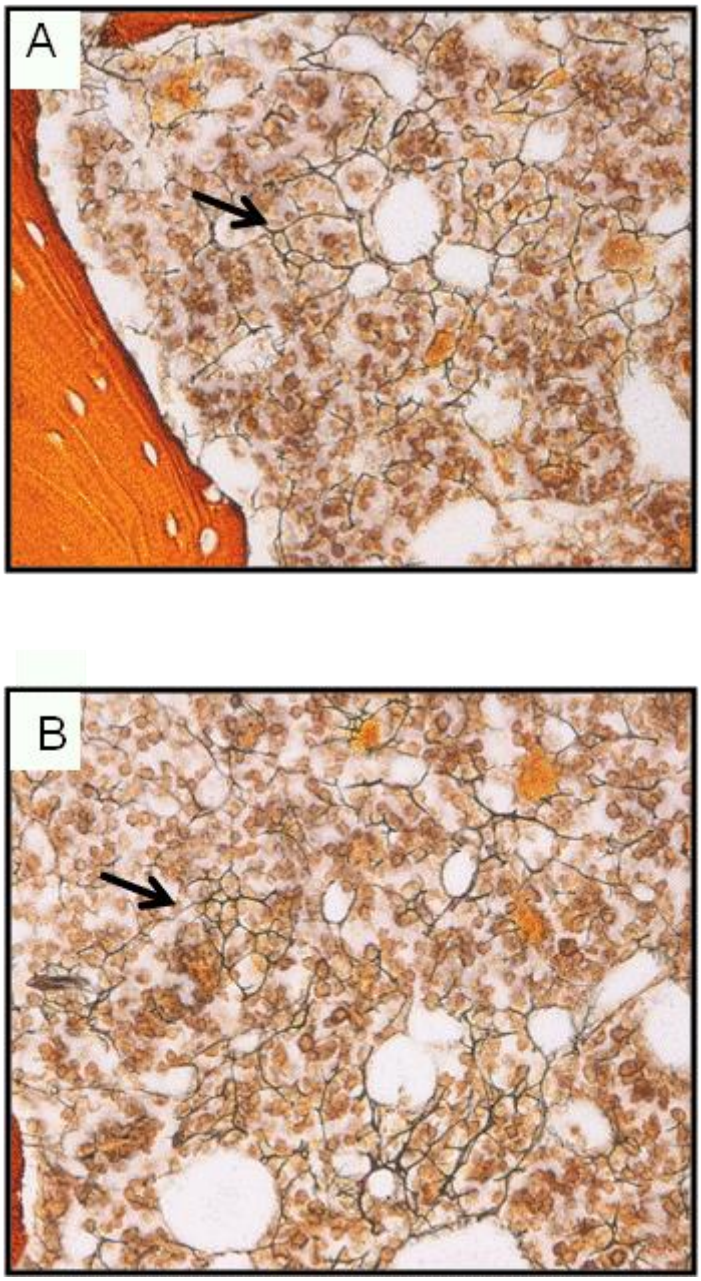


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de ratos *Wistar* dos grupos **controle (A)** e **experimental (B)**, evidenciando o padrão de distribuição de fibras colágenas, constituindo discretas lojas em meio ao parênquima hemopoético em ambos os grupos. Coloração de Reticulina (aumento de 40x).

4.11.3 Caracterização da porcentagem de células CD133 e CD34 positivas da medula óssea por citometria de fluxo

Dentre a população de células totais da medula óssea observa-se aumento da porcentagem de células $CD34^+$ nos animais experimentais quando comparados com os do grupo controle (**Figura 5**). Observa-se aumento dos progenitores hematopoéticos $CD133^-/CD34^+$ nos animais experimentais quando comparados com os do grupo controle (**Gráfico 25 A**). Em relação à dupla marcação $CD133^+/CD34^-$ e $CD133^+/CD34^+$, verifica-se que não houve diferença estatística significativa (**Gráfico 25 B e C**).

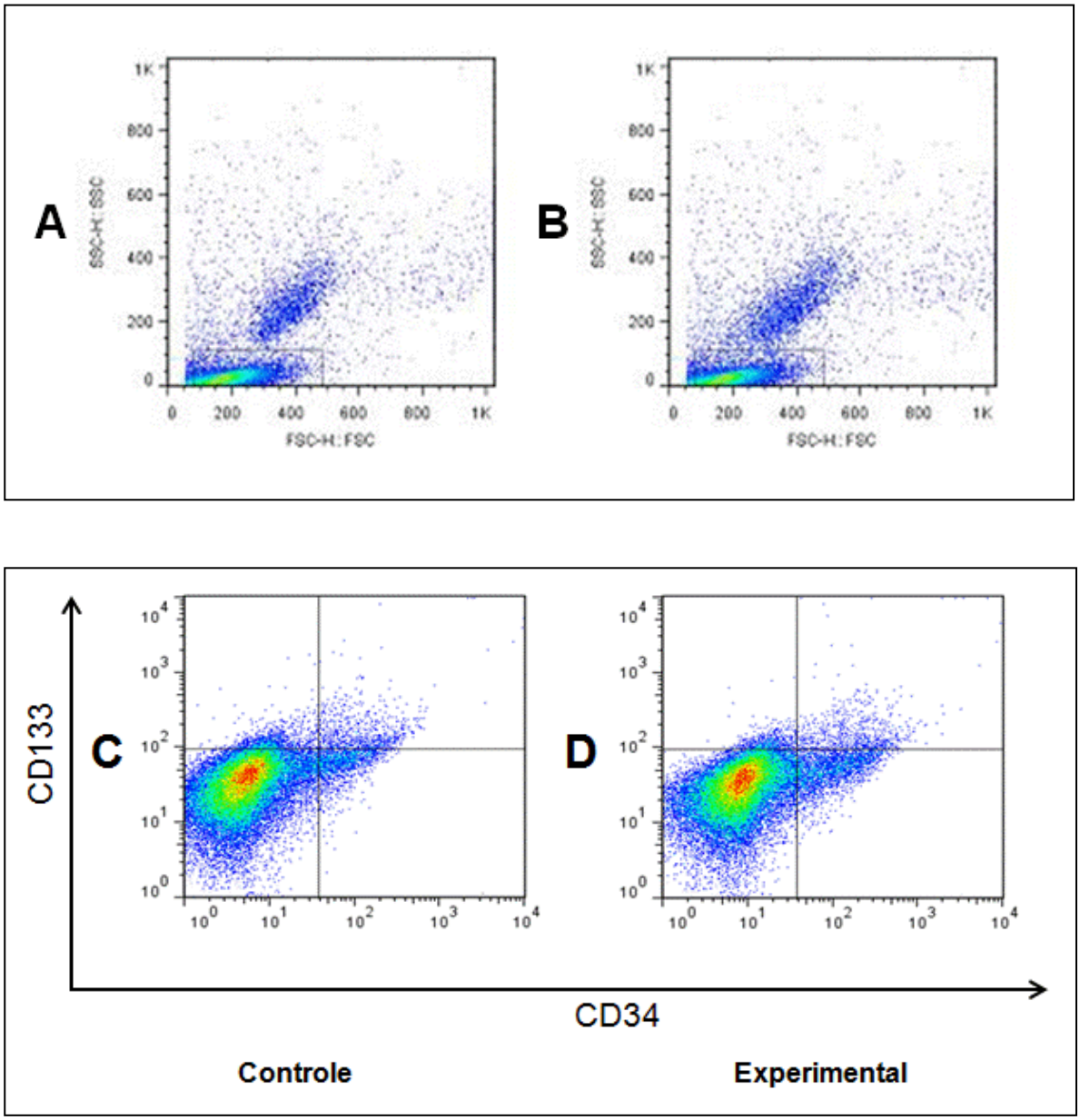


Figura 5. Representação gráfica da análise da população de células mononucleares da medula óssea por citometria de fluxo. Em **A**, tem-se dados da população de células mononucleares da medula óssea em uma amostra **controle**, em **B**, dados da população de células mononucleares da medula óssea em uma amostra **experimental**; em **C**, expressão de $CD133^+$ e $CD34^+$ em animais do grupo **controle** (n=6); e, em **D**, expressão de $CD133^+$ e $CD34^+$ em animais do grupo **experimental** (n=6).

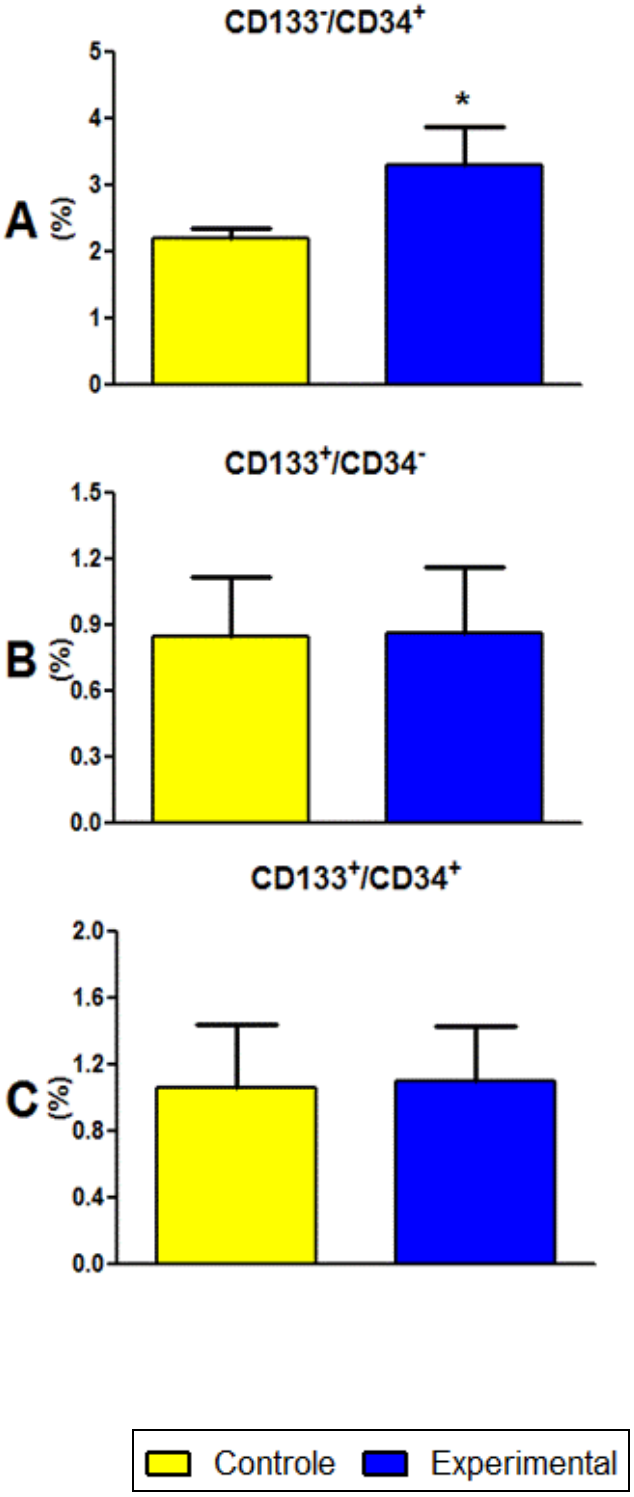


Gráfico 25. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células da medula óssea, CD133 e CD34 em animais dos grupos **controle** (n=6 animais) e **experimental** (n=6 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.4 Avaliação do perfil proliferativo das células totais da medula óssea utilizando Iodeto de Propídeo e RNAse, por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular (**Figura 6**) indicou aumento da fase S/G2/M nos animais experimentais quando comparado com os animais do grupo controle (**Gráfico 26 B**) – fases em que se observam o aumento da ploidia da célula. Em relação à fase inicial do ciclo celular, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos (**Gráfico 26 A**).

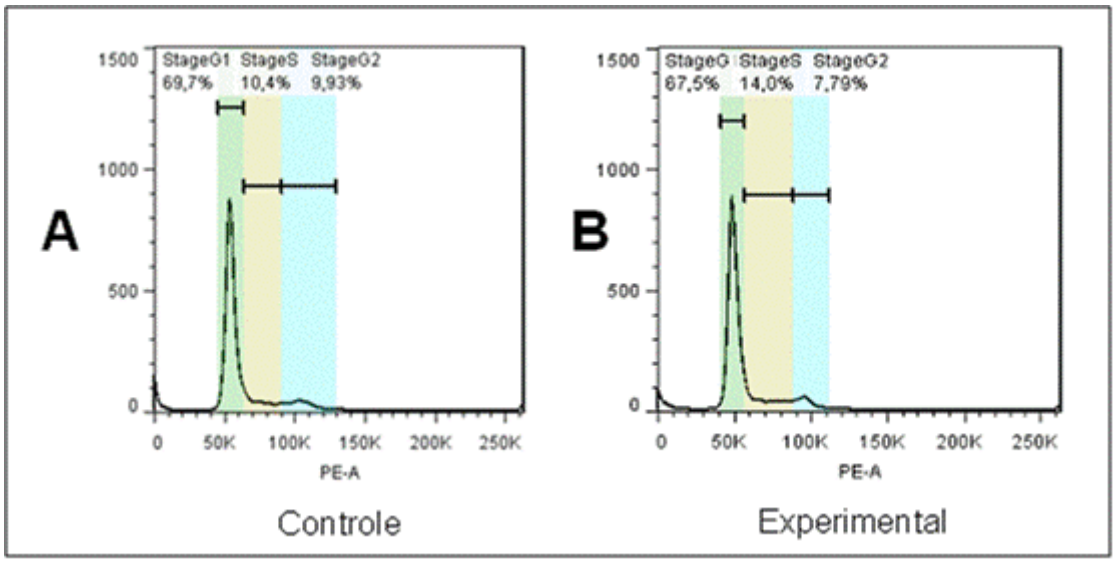


Figura 6. Dados de um experimento representativo da análise das células totais da medula óssea, por citometria de fluxo, marcadas com Iodeto de Propídeo. Em **A**, tem-se dados de uma amostra **controle** (n=6) e em **B** dados de uma amostra **experimental** (n=6), correspondente às fases do ciclo celular, *stage* G1 (fase G0/G1), *stage* S (fase S) e *stage* G2/M.

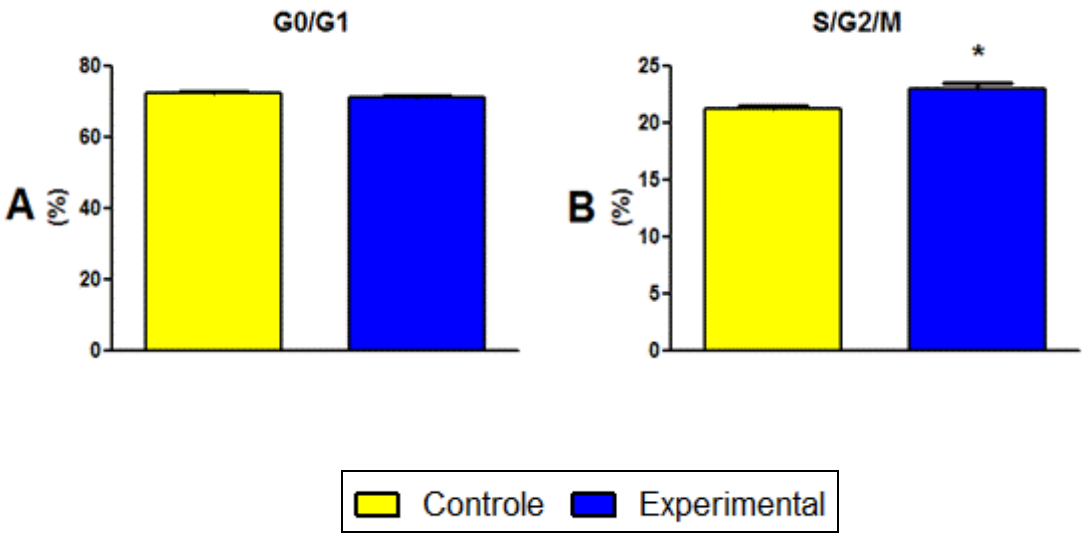


Gráfico 26. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células totais da medula óssea na **(A)** fase G0/G1 e **(B)** na fase S/G2/M em animais dos grupos **controle** (n=6 animais) e **experimental** (n=6 animais). * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.5 Avaliação do perfil proliferativo das células CD34$^+$ e CD133$^+$ da medula óssea utilizando 7AAD, por citometria de fluxo

Ao avaliarmos as fases do ciclo celular das células da medula óssea, observamos aumento na fase S/G2/M das células CD34$^+$ quando comparadas com às do grupo controle (**Figura 7 e Gráfico 27**). Não foram observadas diferenças significativas nas fases do ciclo celular das células CD133$^+$ (**Figura 8 e Gráfico 28**).

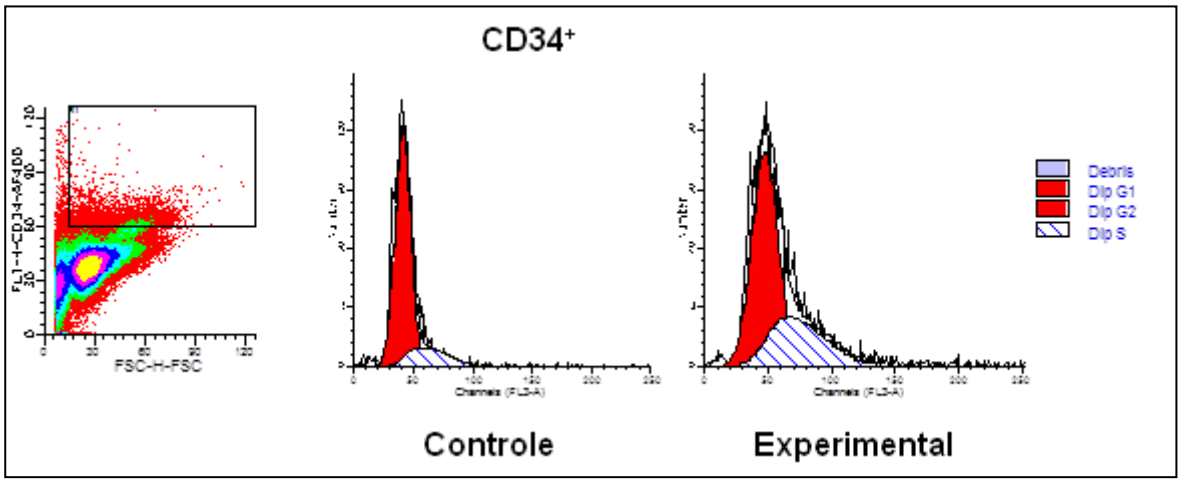


Figura 7. Dados de um experimento representativo da análise das células totais da medula óssea, por citometria de fluxo, marcadas com 7AAD de amostras **controle** (n=6) e **experimental** (n=6), correspondentes às fases do ciclo celular, dip G1 (fase G0/G1), dip G2 (fase G2/M) e dip S (S).

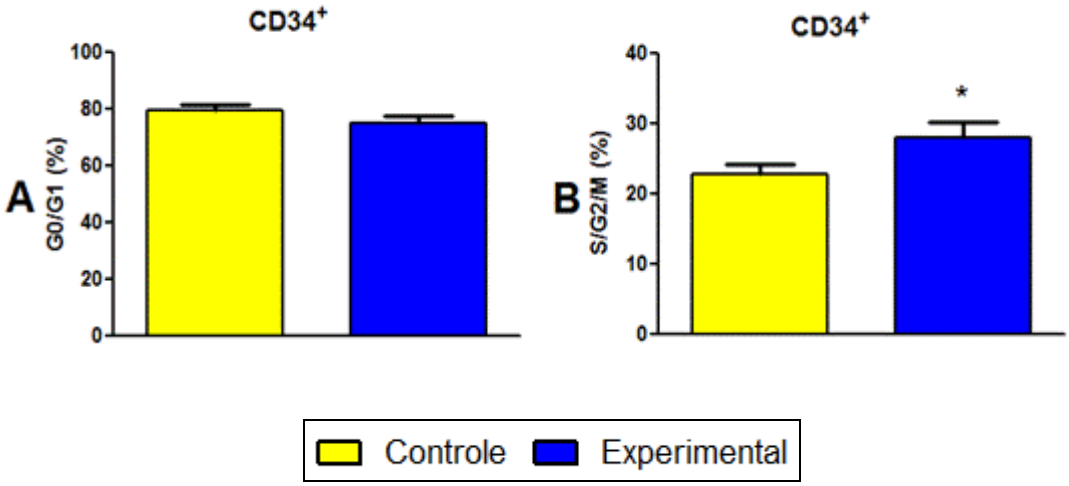


Gráfico 27. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células totais da medula óssea na **(A)** fase G0/G1 e **(B)** na fase S/G2/M em animais dos grupos **controle** (n=6 animais) e **experimental** (n=6 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

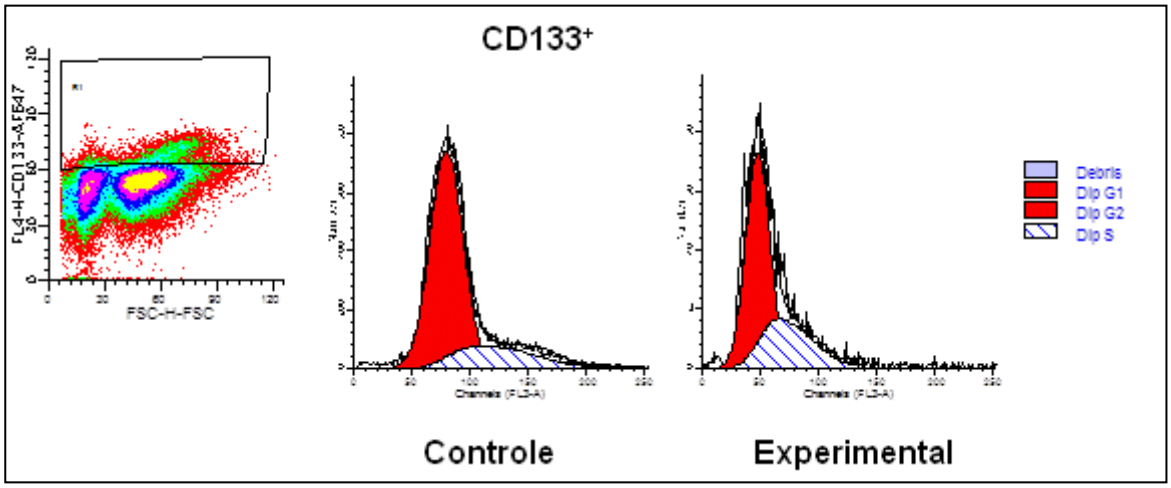


Figura 8. Dados de um experimento representativo da análise das células totais da medula óssea, por citometria de fluxo, marcadas com 7AAD de amostras **controle** (n=6) e **experimental** (n=6), correspondentes às fases do ciclo celular, dip G1 (fase G0/G1), dip G2 (fase G2/M) e dip S (S).

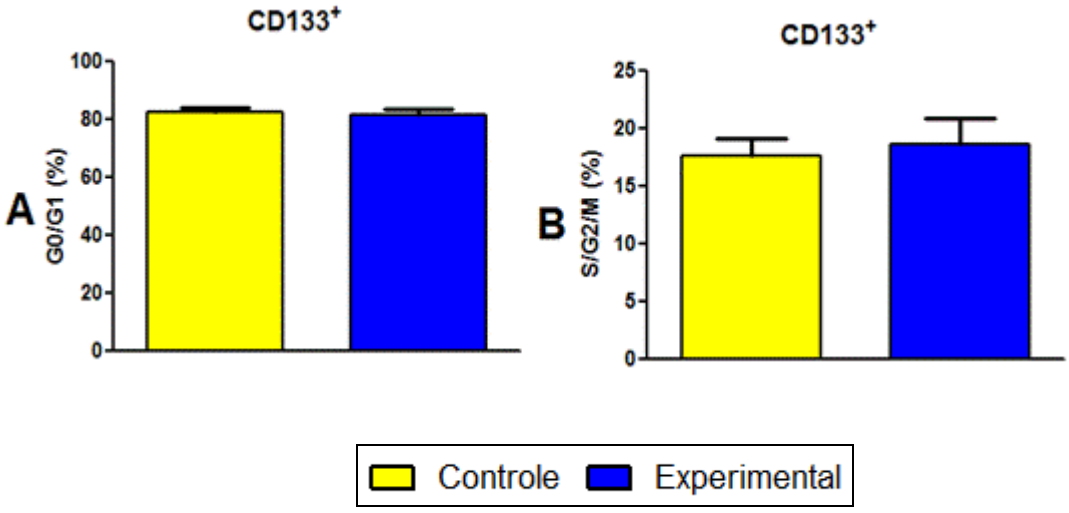


Gráfico 28. Resultados em valores médios ± o SEM da porcentagem de células totais da medula óssea na **(A)** fase G0/G1 e **(B)** na fase S/G2/M em animais dos grupos **controle** (n=6 animais) e **experimental** (n=6 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.6 Determinação da viabilidade: ensaio de MTT

Observamos, no 5º dia de cultura, aumento da proliferação das células mononucleares da medula óssea em animais do grupo experimental quando estimuladas com IL-3, GM-CSF, G-CSF e EPO. Ao compararmos o crescimento das células mononucleares da medula óssea na ausência de fatores de crescimento IL-3, EPO, G-CSF e GM-CSF, verificamos, em ambos os grupos, que o crescimento foi gradativo, mas não houve diferença estatística (**Gráfico 29**).

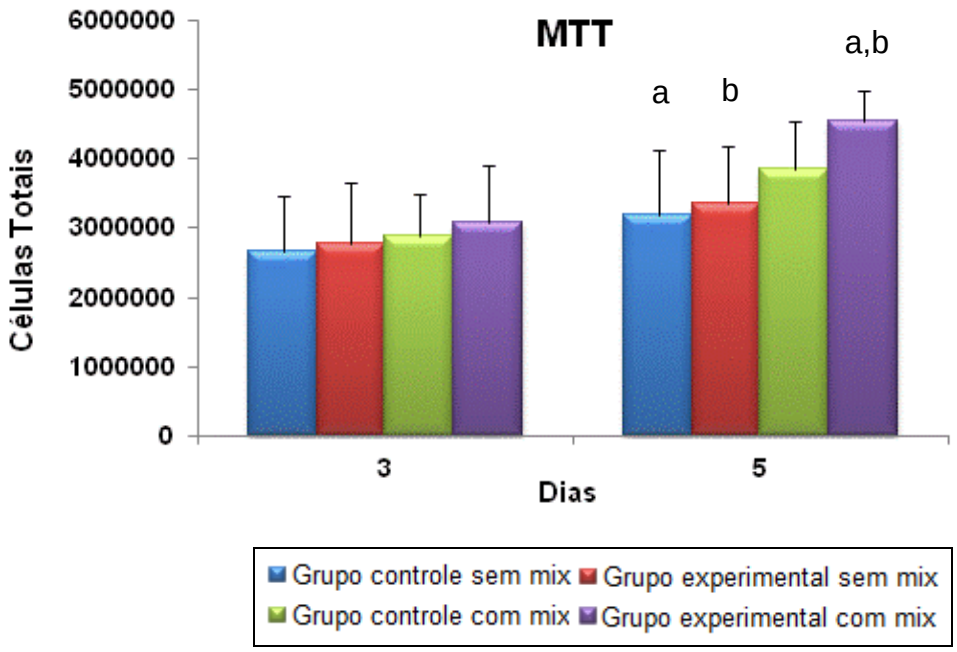


Gráfico 29. Resultados em valores médios ± o desvio padrão do número total de células mononucleares viáveis da medula óssea avaliadas no terceiro e no quinto dias de cultivo em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). [a] $p \leq 0,05$ quando comparado o grupo controle sem mix com o grupo experimental com mix; [b] $p \leq 0,05$ quando comparado o grupo experimental sem mix com o grupo experimental com mix. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.7 Proliferação das células mononucleares frente a fatores de crescimento IL-3, GM-CSF, G-CSF e EPO: ensaio de cultura líquida

Observamos que, tanto para os animais controle quanto para os animais experimentais, na ausência dos fatores de crescimento IL-3, GM-CSF, G-CSF e EPO, denominados de controle negativo da cultura, as células mononucleares apresentaram menor capacidade proliferativa.

No entanto, no ensaio de proliferação em cultura líquida efetuado com a combinação de IL-3, EPO, G-CSF e GM-CSF, originando CFU-GEMM, observou-se que as células mononucleares da medula óssea, ao final do 5º dia de cultura, mostram-se significativamente maiores nos animais experimentais em relação aos animais controles (**Gráfico 30**).

O número de blastos diminuiu progressivamente nos 2º e 3º dias, em cultura de células provenientes de animais experimentais (**Gráfico 31 A**). Observa-se aumento das formas jovens no 4º dia de cultura de células obtidas de animais experimentais (**Gráfico 31 B**). No grupo experimental, as formas em anel apresentaram diminuição estatisticamente significativa no 5º dia de cultura (**Gráfico 31 C**), quando comparadas com às do grupo controle. Em relação às formas segmentadas, verificou-se aumento no 5º dia de cultura em células obtidas dos animais experimentais (**Gráfico 31 D**). O número de linfócitos não diferiu estatisticamente entre os grupos (**Gráfico 32 A**). A proliferação de monócitos/macrófagos foi significativamente maior no 5º dia de cultura, em células de animais do grupo experimental, quando comparada com

o grupo controle (**Gráfico 32 B**). Por outro lado, o número de precursores eritroides não diferiu entre os grupos (**Gráfico 32 C**).

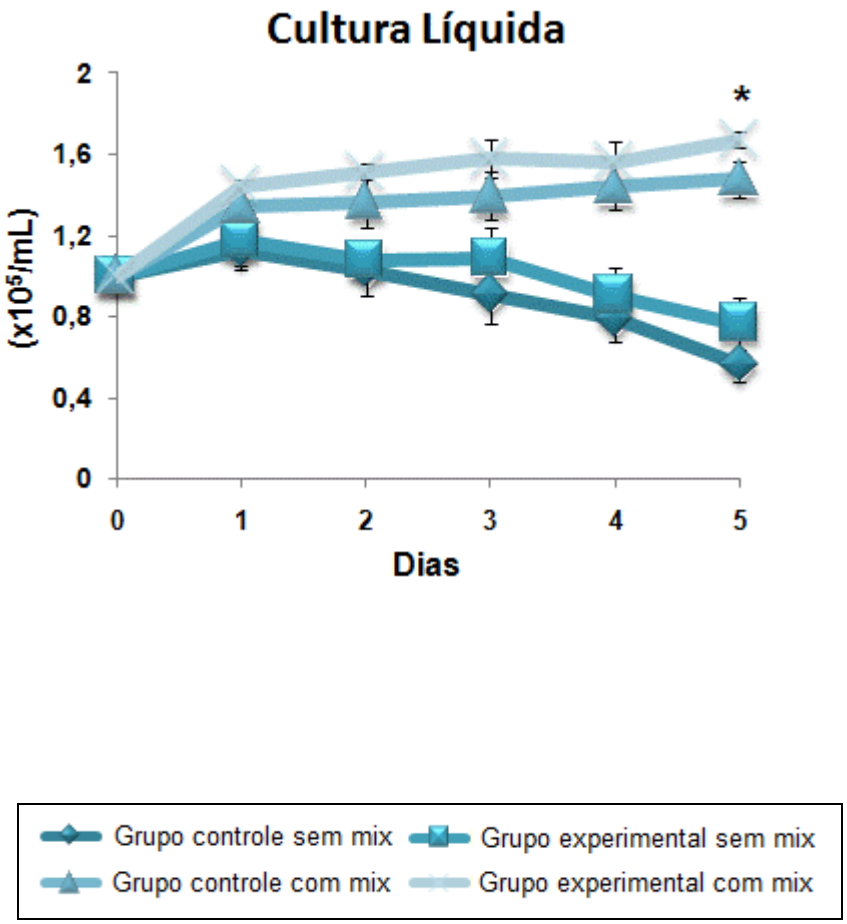


Gráfico 30. Resultados, em valores médios, do número total de células mononucleares viáveis da medula óssea, expressos em 10^6 células/mL durante 5 dias de cultivo em meio líquido a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 de animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). Valores monitorados a cada 24 horas durante 5 dias. *Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

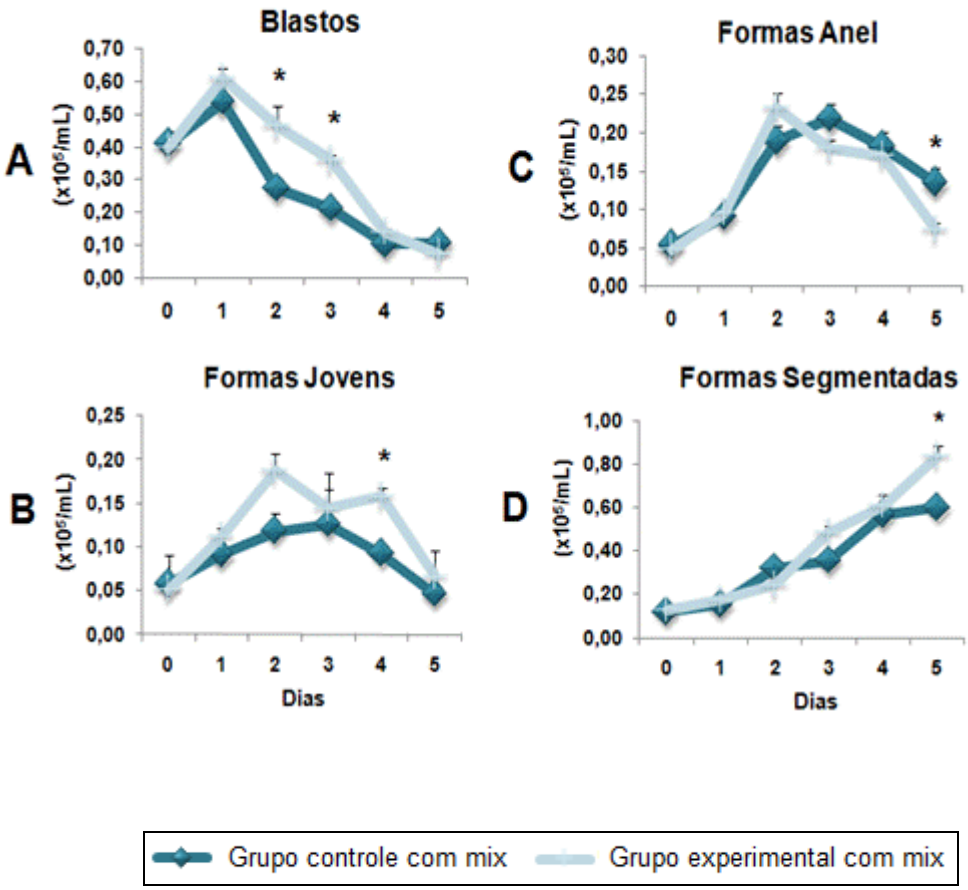


Gráfico 31. Resultados, em valores médios, do **(A)** número de blastos **(B)**, das formas jovens **(C)**, das formas em anel e **(D)** das formas segmentadas, expressos em 10^5 células/mL durante 5 dias de cultivo em meio líquido a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). Valores monitorados a cada 24 horas durante 5 dias. *Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

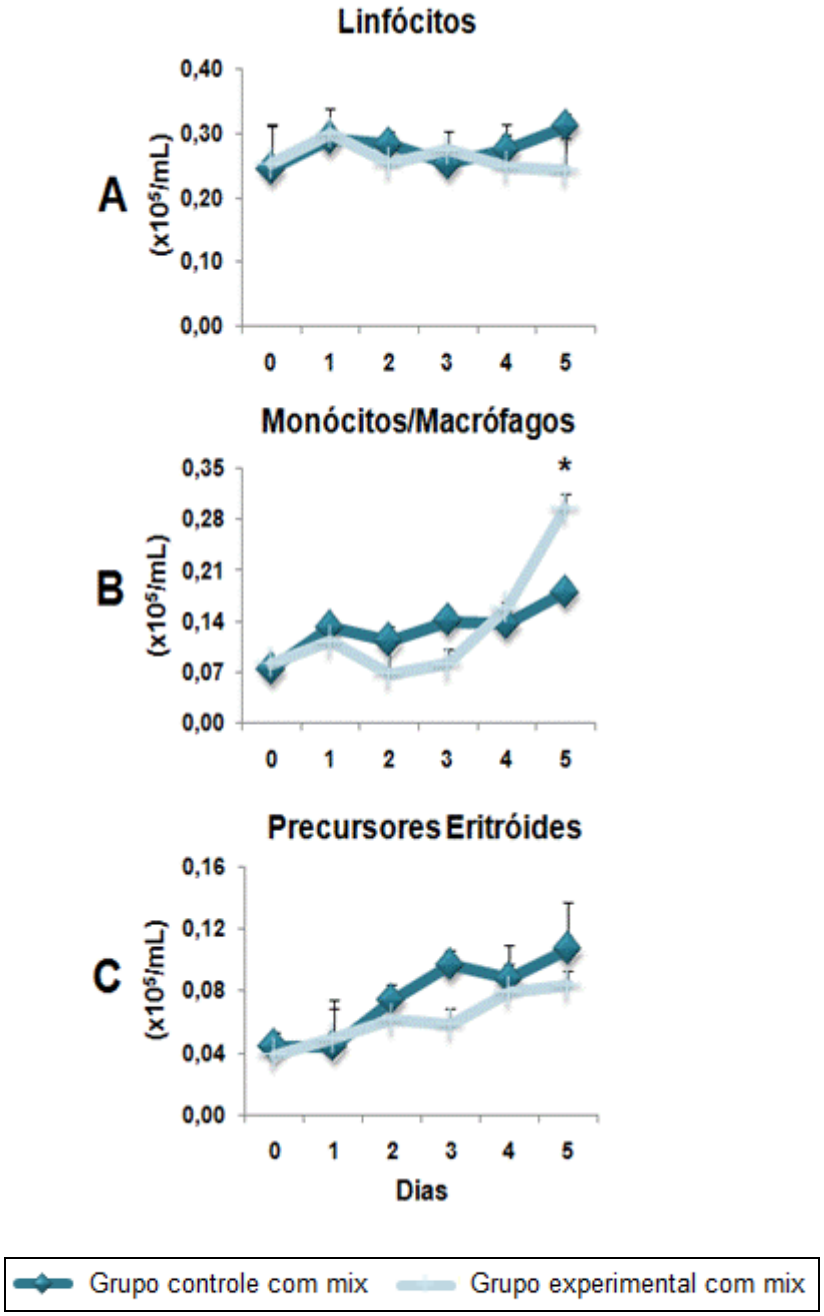


Gráfico 32. Resultados em valores médios do **(A)** número de linfócitos **(B)**, dos monócitos/macrófagos e **(C)** dos precursores eritroides, expressos em 10^5 células/mL durante 5 dias de cultivo em meio líquido a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 em animais dos grupos **controle** (n=12 animais) e **experimental** (n=14 animais). Valores monitorados a cada 24 horas durante 5 dias. *Valores significativos para $p \leq 0,05$. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.8 Ensaio clonogênico em meio semissólido

Os ensaios clonogênicos realizados com animais controles e animais experimentais apresentaram aumento na formação de colônias[1] e diminuição de *clusters*[2]. As células progenitoras hematopoéticas formadas por colônias de granulócitos, macrófagos, eritrócitos e mistas foram analisadas qualitativamente (**Figura 9**) e quantitativamente nos 7º, 14º e 21º dias de cultura.

O maior crescimento de colônia CFU-G foi observado no 21º dia dos animais experimentais estimulados com fatores de crescimento IL-3 (0,1 ng/mL); GM-CSF (0,2 ng/mL); G-CSF (0,2 ng/mL) e EPO (1 UI) (**Gráfico 33 B**). Houve aumento progressivo do 1º ao 21º dia de cultura. Não encontramos colônias BFU-E e CFU-E nos ensaios com células mononucleares da medula óssea de ambos os grupos.

[1] referem-se à contagem de 50 ou mais células.
[2] referem-se à contagem de 2 a 49 células.

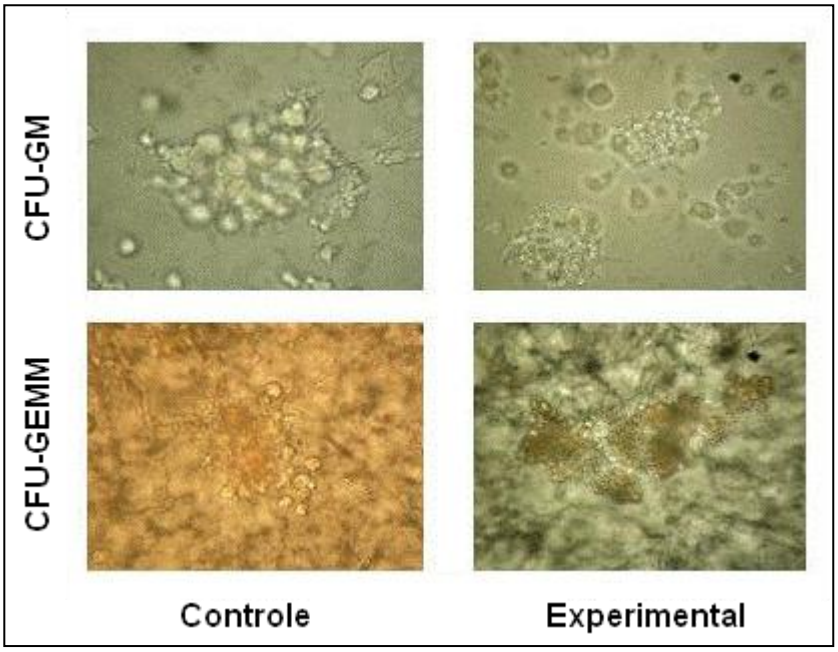


Figura 9. Fotomicrografia de colônias CFU-GM e CFU-GEMM presentes na cultura semissólida no 14º dia, estabelecida com células mononucleares da medula óssea de animais dos grupos controle e experimental estimulada com fatores de crescimento (aumento de 200x).

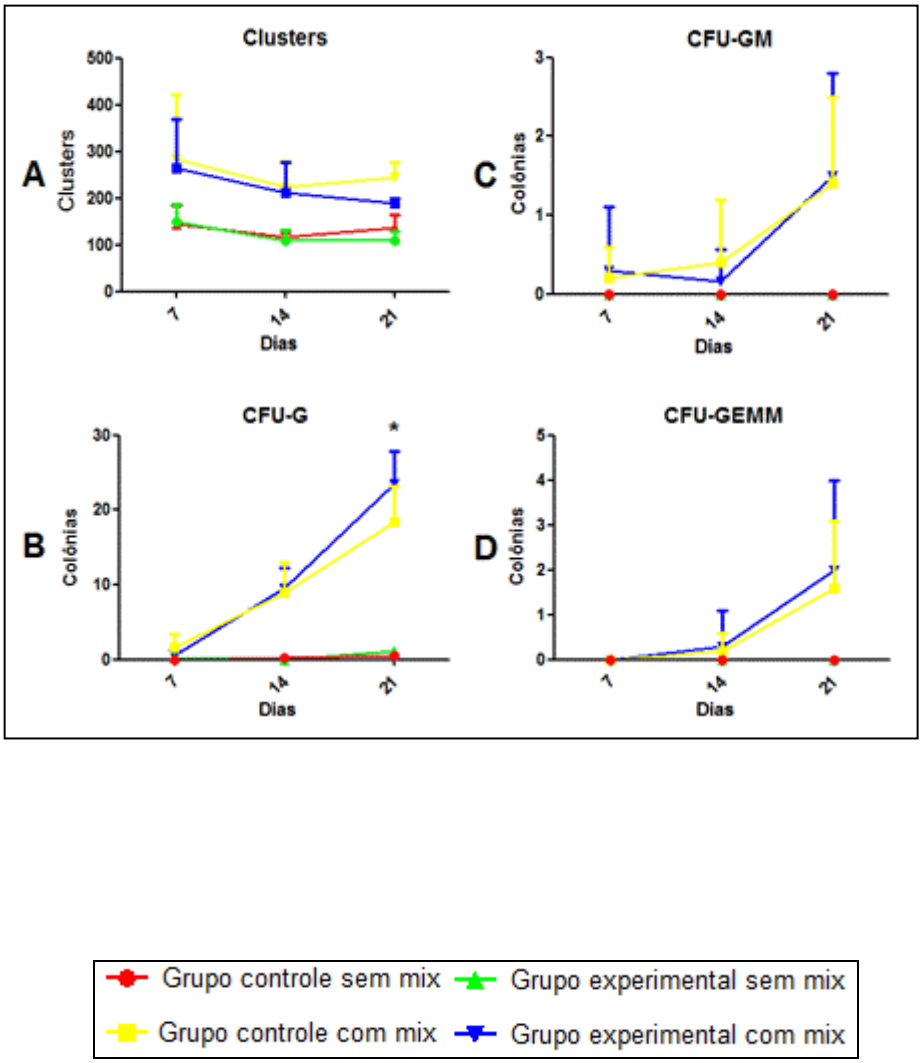


Gráfico 33. Resultados representam a média ± do número de *clusters*, colônias **(A)** e do número de colônias grânulo-monocítica **(B)** granulocíticas **(C)** e grânulo-eritróide-mega-monocítica **(D)**, em animais dos grupos **controle** (n=7animais) e **experimental** (n=9 animais). *Valores estatisticamente significativos p≤0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

4.11.9 Avaliação *in vivo* de citocinas produzidas a partir de cultura de medula óssea total

A partir da cultura de células totais da medula óssea, foi coletado o sobrenadante para a quantificação de citocinas que participam da regulação da hematopoese. Entretanto, não foi possível avaliar a leptina, uma vez que os valores apresentaram-se abaixo dos valores de detecção do método.

Nos resultados apresentados, podemos observar a diminuição na concentração de IL-1α nos animais do grupo experimental, porém não diferindo estatisticamente dos animais do grupo controle (**Gráfico 34 A**).

Em relação à concentração de IL-5, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 34 B**).

Ao analisarmos a concentração de IL-6, observamos aumento na concentração de IL-6 nos animais do grupo experimental, mas não diferindo estatisticamente do grupo controle (**Gráfico 34 C**).

Ao avaliarmos a concentração de TNF-α, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 34 D**).

Os animais do grupo experimental apresentaram aumento estatisticamente significativo da capacidade de produção de G-CSF por células totais da medula óssea, quando comparados com os animais do grupo controle (**Gráfico 35 A**). No entanto, ao se avaliar a capacidade das células totais da medula óssea em produzir GM-CSF, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 35 B**).

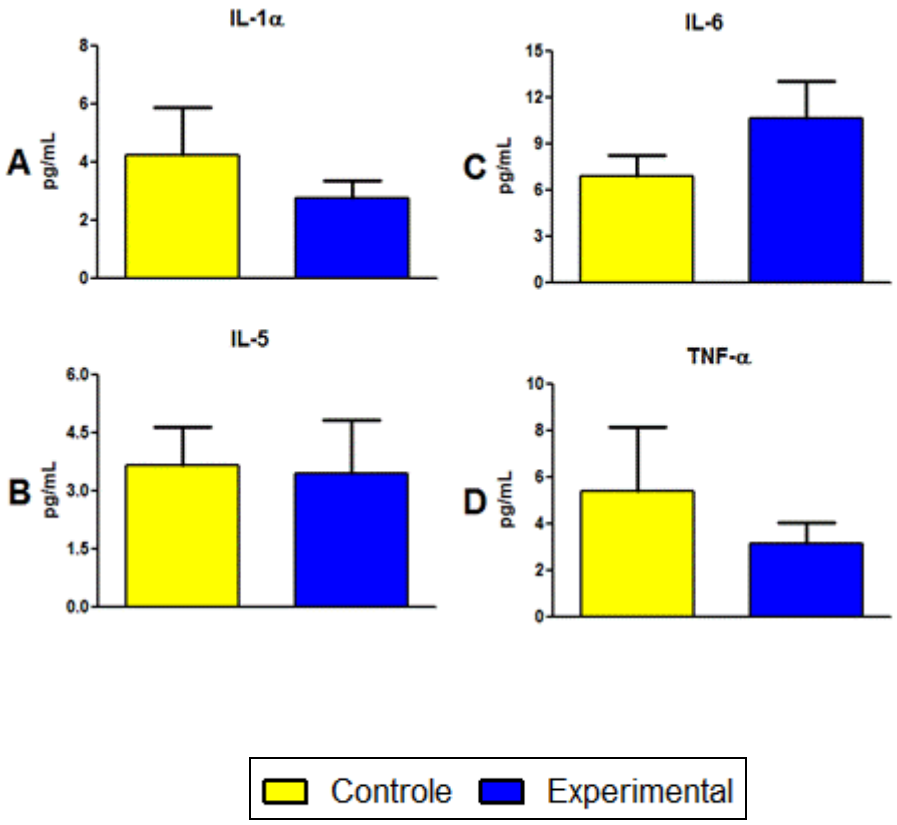


Gráfico 34. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração em pg/mL de **(A)** IL-1α produzida pela medula óssea total, **(B)** IL-5, **(C)** IL-6 e **(D)** TNF-α em animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

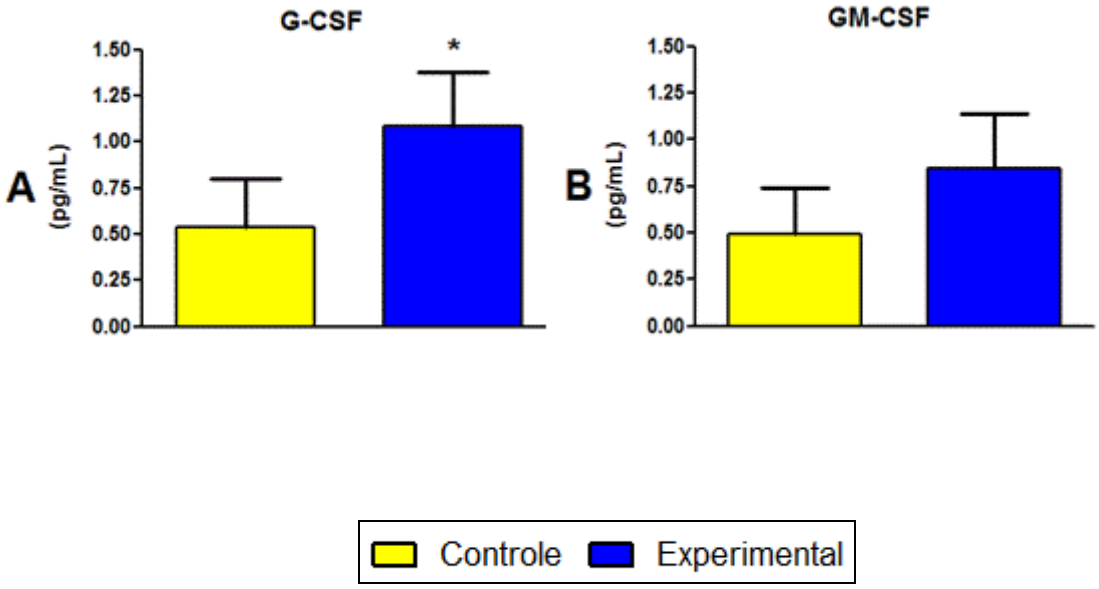


Gráfico 35. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração em pg/mL de **(A)** G-CSF produzida pela medula óssea total **(B)** GM-CSF em animais dos grupos **controle** (n=8animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

Observa-se aumento de IL-3 nos animais experimentais quando comparado com o controle (**Gráfico 36 A**). A produção de SCF não apresentou diferença estatística entre os grupos (**Gráfico 36 B**).

Ao avaliarmos a capacidade das células totais da medula óssea em sintetizar INF-γ, IL-10 e VEGF, observamos que não houve diferença estatística significativa entre os grupos (**Gráfico 37 A, B e C**).

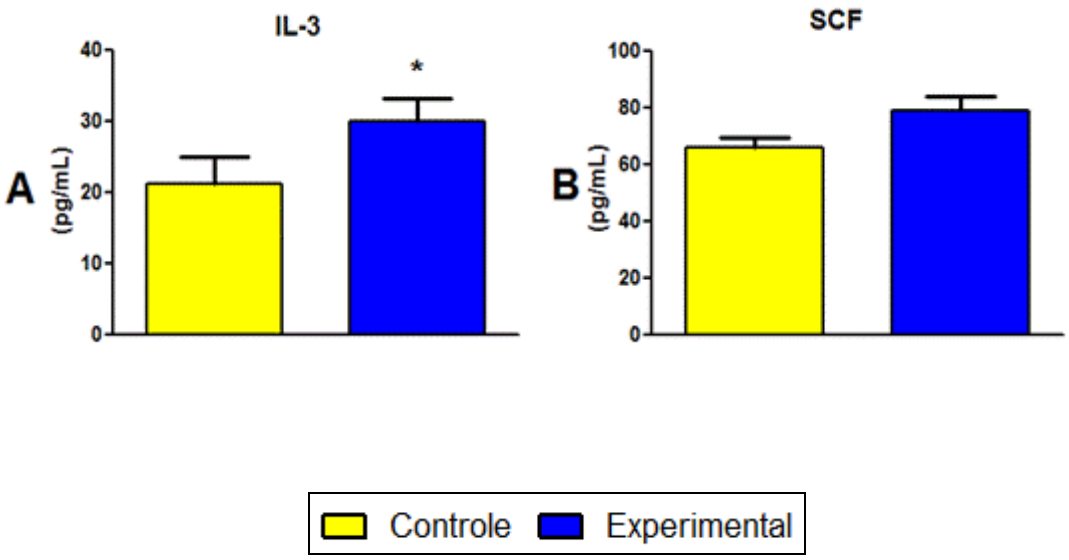


Gráfico 36. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da **(A)** concentração sérica em pg/mL de IL-3 e **(B)** SCF após 1 dia de cultivo de células totais da medula óssea a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 de animais dos grupos **controle** (n=8 animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

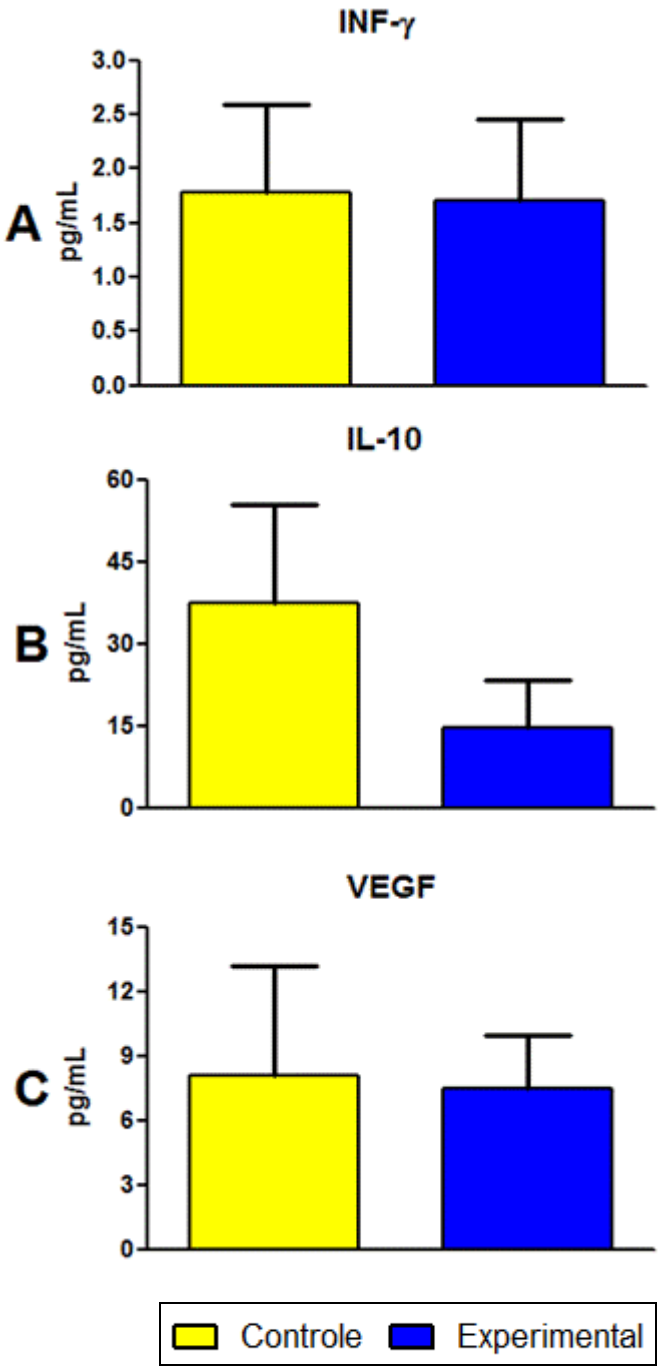


Gráfico 37. Resultados em valores médios ± o desvio padrão da concentração em pg/mL de **(A)** INF-γ produzida pela medula óssea total, **(B)** TNF-α e **(C)** VEGF em animais dos grupos **controle** (n=8animais) e **experimental** (n=12 animais). *Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

5.DISCUSSÃO

Ao induzirmos o modelo animal de adiposidade corpórea, optamos por elaborar as dietas controle e hiperlipídica considerando os teores de vitaminas, sais minerais e proteínas necessários para fornecer uma alimentação adequada aos animais; sendo que a ração dos animais experimentais foi acrescida de banha de porco em substituição ao amido de milho, o que visa aumentar o teor de lipídios da dieta e, consequentemente, favorecer a indução de ganho de peso em ratos.

A dieta hiperlipídica utilizada em nosso modelo possui 30% a mais de energia do que a dieta controle e está de acordo com estudos que têm promovido obesidade induzida por dieta (DOUMASHKIN *et al*., 2005; RELLING *et al*., 2006; WOODS *et al*., 2003).

Ao desenvolvermos o modelo de dieta hiperlipídica no nosso laboratório, optamos por trabalhar com ratos *Wistar*, machos, para evitarmos as variações hormonais que ocorrem nas fêmeas, variações estas que alteram a mobilização celular. Utilizamos, ainda, ratos adultos porque já atingiram a estabilização hematológica, pois, em animais jovens, assim como em seres humanos antes da puberdade, ocorrem importantes modificações fisiológicas na hematopoese. Por fim, utilizamos animais não isogênicos porque procuramos nos aproximar o mais possível das condições reais da população humana.

Animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram tendência em diminuir a quantidade de ração ingerida, na tentativa de controlar o ganho calórico. Dietas ricas em gordura reduzem a eficiência alimentar e aumentam a

eficiência metabólica. Na verdade, tem sido sugerido que os ratos tornam-se mais obesos com o consumo de dietas de baixa densidade de nutrientes e adição de ingredientes de baixa qualidade e ricas em gordura ao invés de dietas ricas em gordura e balanceadas (DUARTE *et al.*, 2006; ESTADELLA *et al.*, 2004; GAÍVA *et al.*, 2001; HARIRI; THIBAULT, 2010; SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000). Entretanto, em nosso modelo, os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram variação final de peso corpóreo, após 12 semanas de experimento, maior do que os animais tratados com a dieta controle.

Os animais do grupo experimental apresentaram aumento elevado no consumo de lipídios. O aumento na ingestão lipídica leva ao balanço lipídico positivo e, consequentemente, ao acúmulo na massa adiposa corporal (FLATT, 1987; 1995). No entanto, alguns autores acreditam que o tipo de lipídio ingerido na dieta também pode influenciar o acúmulo de adiposidade, visto que alguns trabalhos mostram significativa correlação entre o percentual de gordura corporal e o percentual de gorduras saturada e monoinsaturada ingeridos na alimentação (ROMIEU *et al*., 1988).

Além disso, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento no peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, indicando aumento nas adiposidades central e visceral, como demonstrado por outros trabalhos da literatura (DUARTE *et al*., 2006; ESTADELLA *et al*., 2004; GAÍVA *et al*., 2001; SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000). Ressalta-se que, neste estudo, a adiposidade central refere-se ao acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal e a adiposidade visceral ao acúmulo dos tecidos adiposos epididimal e visceral.

A quantidade e a natureza da gordura ingerida diariamente influenciam a concentração do colesterol plasmático. Níveis elevados de colesterol no sangue estão relacionados com a incidência de doenças vasculares ateroscleróticas, especialmente doenças coronarianas (CHAMPE; HARVEY, 2000; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998;).

Quanto ao perfil lipídico, o consumo excessivo de gordura está relacionado com o desenvolvimento de dislipidemias (DINIZ *et al*., 2004; GAUTHIER *et al*., 2003; IOSSA *et al*., 2003; SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000; WOODS *et al*., 2003). Nossos resultados vêm ao encontro à literatura, uma vez que observamos que a dieta hiperlipídica em ratos foi capaz de aumentar as concentrações séricas de triacilglicerol, colesterol total, VLDL e LDL.

Segundo DUVILLARD (1997), dietas ricas em ácidos graxos saturados elevam os níveis séricos de colesterol total e LDL-c, aumentando a formação de placas de ateromas e, consequentemente, o risco de doença coronariana, juntamente com baixos níveis de HDL-c. Em nosso modelo experimental, encontramos quantidades elevadas de colesterol total e LDL, bem como de triacilglicerol, o que poderia aumentar as chances de distúrbios metabólicos.

Apesar da ausência de diferença significativa quanto ao consumo calórico entre os animais envolvidos neste estudo, dados do nosso grupo demonstraram que a análise da carcaça apresentou maior teor de gordura para os animais alimentados com dieta hiperlipídica (BORGES, 2011). Este resultado é concordante com relatos da literatura, segundo os quais humanos (MILLER, 1991) e ratos (STORLIEN *et al*., 1996) submetidos a dietas com alto teor lipídico tendem a acumular significativamente mais gordura corporal que seus correspondentes submetidos à dieta balanceada. Portanto, o conteúdo

lipídico da dieta parece ter sido o principal responsável pelo acúmulo de gordura tecidual, reforçando relatos que ressaltam a composição da dieta como fator tão ou mais importante que o teor calórico da mesma para o acúmulo de gordura tecidual (AUGUSTO, 1994; BLAIR *et al*., 1996; MILLER, 1991).

A dieta hiperlipídica, além de induzir o ganho de gordura, favoreceu a perda de massa magra (dados não mostrados). O efeito da dieta hiperlipídica na massa magra pode ser atribuído à redução física na quantidade de água corporal, uma vez que os animais de ambos os grupos apresentaram teores semelhantes de proteína corporal. O ganho de gordura é substituído pela massa magra, por isso a diferença na gordura da carcaça não se reflete no peso corporal (BORGES, 2011).

Foram dosadas enzimas hepáticas, ALT e AST, na tentativa de avaliar a esteatose hepática. A aspartato aminotransferase (ALT) e a alanina aminotransferase (AST) são aminotransferases de interesse clínico. A AST existe tanto na forma mitocondrial quanto na citoplasmática, sendo encontrada principalmente em: fígado, coração, músculo esquelético e rim. A ALT exclusivamente citoplasmática é encontrada principalmente no fígado e no rim (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

A ALT e a AST são importantes no diagnóstico de lesões hepáticas e cardíacas, provocadas por infarto do miocárdio, substâncias tóxicas e infecções, já que, após esses eventos, várias enzimas, incluindo as aminotransferases, extravasam das células lesadas e passam para a corrente sanguínea. A determinação da concentração dessas enzimas no soro pode fornecer informações importantes a respeito da severidade e do estágio de

uma lesão hepática, por exemplo (LEHNINGER, 2006). No entanto, não encontramos alterações da ALT e da AST em nosso modelo experimental.

O tecido adiposo é conhecido por várias funções, entre elas: armazenamento de energia, regulação hormonal dos sistemas homeostáticos, termogênese e proteção de impacto contra as vísceras. Além disso, o tecido adiposo apresenta importante função endócrina, pois secreta uma variedade de proteínas sintetizadas e liberadas pelos adipócitos, denominadas adipocinas (MAFRA; FARAGE, 2006).

A obesidade está diretamente relacionada com alterações nas funções endócrinas e metabólicas no tecido adiposo e intimamente relacionada com a resposta inflamatória e, consequentemente, com a geração de diversos mediadores com ação pró-inflamatória.

Em indivíduos obesos, o tecido adiposo aumenta a capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatória, denominadas adipocitocinas ou adipocinas, como a proteína C reativa, o fator de transformação do crescimento-beta (TGF-β), a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), o inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), o TNF-α, a interleucina-6 (IL-6) e a leptina (BULLO *et al*., 2007; SHAH; MEHTA; REILLY, 2008). Tais moléculas, por si só, poderiam ter efeitos sobre o sistema hematopoético, influindo na neutrofilia encontrada.

A reação inflamatória é acompanhada por uma resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda. Esta resposta é caracterizada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Citocinas, como IL-6, TNF-α, são produzidas no local de

inflamação e desempenham papel crucial na resposta de fase aguda, induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (BILATE, 2007).

Entre os mediadores inflamatórios, o TNF-α é um possível candidato a induzir resistência insulínica. Ele é produzido por adipócitos e está aumentado no tecido adiposo de roedores obesos, bem como em humanos (MONTANI *et al*., 2002). Dados recentes sugerem que, enquanto o TNF-α age de forma parácrina no adipócito, a IL-6 circula no plasma em concentrações relativamente altas, sendo, portanto, muito mais importante sistemicamente. De fato, ela é chamada de “citocina endócrina”. Apesar das células adiposas contribuírem com 1/3 da concentração circulante de IL-6, existem outras fontes importantes de produção, como os monócitos (FERNÁNDEZ-REAL; RICART, 2003).

Como parte do nosso trabalho, quantificamos algumas citocinas pró-inflamatórias circulantes, como TNF-α, PAI-1 e IL-6, bem como a concentração circulante de proteína C reativa (PCR). Nossos resultados mostram uma tendência de elevação das citocinas circulantes PAI-1, IL-6, TNF-α; no entanto, somente observamos aumento significativo de proteína C-reativa (PCR), sendo que o pico de produção das proteínas de fase aguda geralmente ocorre entre 12 e 24 horas após o início da resposta inflamatória aguda. A PCR é a mais importante citocina da resposta inflamatória, uma vez que seu nível sérico é aumentado aproximadamente 1.000 vezes durante a inflamação aguda (BILATE, 2007).

Paralelamente, avaliamos os níveis sistêmicos de leptina, adiponectina, insulina e corticosterona. A leptina é uma proteína de 167 aminoácidos, secretada pelo tecido adiposo. É codificada pelo gene *ob*, o qual é

predominantemente expresso pelos adipócitos, e seus níveis plasmáticos se correlacionam com a massa de gordura corporal (PEELMAN *et al*., 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que a leptina é uma molécula pleiotrópica, com ampla variedade de ações biológicas, como função reprodutora, regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA), metabolismo da insulina e glicose, lipólise, atividade do sistema nervoso simpático, resposta imune, angiogênese e hematopoese (VECCHIONE *et al*., 2003).

A leptina pode ter efeito direto na proliferação de células hematopoéticas mais jovens, também possuindo capacidade de estimular a diferenciação de células da linhagem eritroide e mieloide (CLAYTON *et al.*, 1997; GAINSFORD *et al.*, 1996; HIROSE *et al.*, 1998; KONOPLEVA *et al.*, 1999; MIKHAIL *et al.*, 1997;). No entanto, estes efeitos sobre a célula-tronco $CD34^+$ não estão bem claros.

A adiponectina é uma proteína plasmática de aproximadamente 30 KDa, que é secretada especificamente pelo tecido adiposo (BERG; COMBS; SCHERER, 2002). Os níveis plasmáticos de adiponectina se correlacionam negativamente com a porcentagem de gordura corpórea e a distribuição de gordura central (MATSUZAWA *et al*., 2004). Em nosso modelo, observamos hipertrofia da massa adiposa verificada pelo aumento dos coxins adiposos, bem como hiperleptinemia.

A obesidade, particularmente a visceral, está intimamente relacionada à resistência periférica à insulina e também ao diabetes melito tipo 2 (DM2). Essa correlação resulta no fato de que aproximadamente 30% das crianças obesas com idade inferior a 12 anos apresentem resistência periférica à insulina e que cerca de 80% dos indivíduos com DM2 tenham sobrepeso ou obesidade

(KENNEDY *et al*., 2009). No tocante à concentração de insulina e glicemia, não observamos alterações em nosso modelo experimental.

A corticosterona foi dosada a fim de se tentar explicar o aumento da G-CSF e da eosinopenia encontradas no sangue periférico. A corticosterona exerce múltiplos efeitos na hematopoese, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (GORDON; CHARIPPER, 1947; PASQUALE *et al*., 1989).

Os glicocorticoides reduzem a ativação, a proliferação e a sobrevivência de eosinófilos e linfócitos T, além de bloquear a liberação de várias citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF), que são importantes no recrutamento e na sobrevivência de células envolvidas no processo inflamatório. Este processo leva à morte celular programada ou à apoptose. O mecanismo molecular de indução de apoptose pelos glicocorticoides é incerto. Embora seja conhecido que os glicocorticoides diminuem a apoptose e aumentam a sobrevivência de neutrófilos. Ao mesmo tempo, os glicocorticoides inibem o acúmulo de neutrófilos nos sítios da inflamação. Em relação às células envolvidas na resposta inflamatória em si, os glicocorticoides inibem a liberação de citocinas de macrófagos. A indução da apoptose de eosinófilos é mediada pela eosinopenia (BARNES, 1998).

Os corticoides tendem a aumentar os níveis de hemoglobina e o número de hemácias circulantes. Na série leucocitária, observa-se a neutrofilia, através da liberação da medula óssea para a corrente sanguínea, da diminuição da renovação da circulação e do aumento da liberação da parede do endotélio (*pool* marginal) para a circulação (*pool* circulante). Além disso, os corticoides induzem eosinopenia (SCHIMMER; PARKER, 1996).

São poucos trabalhos realizados tentando compreender a interrelação entre adiposidade e hematologia; e os mecanismos envolvidos ainda estão por ser esclarecidos.

Nossos resultados mostraram que a adiposidade não alterou alguns parâmetros hematológicos, como série vermelha e série plaquetária. Entretanto, houve alteração leucocitária com significativa neutrofilia periférica. Em nosso modelo experimental, observamos que a adiposidade é capaz de induzir neutrofilia periférica, tanto relativa quanto absoluta. Nossos dados mostram que tais alterações são, também, medulares; além do que, observamos hiperplasia da medula óssea, principalmente com aumento do compartimento mieloide e predomínio de polimorfonucleares granulocíticos, porém sem alteração arquitetural medular. Esses dados vêm ao encontro dos dados da literatura, que demonstra que, em estudos epidemiológicos, indivíduos obesos normalmente apresentaram leucocitose (FORD, 1999; HANSEN *et al*., 1990; SCHWARTZ; WEISS, 1991;).

O sistema hematopoético caracteriza-se por contínuo *turnover* de células e, consequentemente, por constante efeito reparativo, necessário para manter a população de leucócitos, plaquetas e eritrócitos (ZANICHELLI *et al*., 1995). Em resposta a um determinado estímulo, como, por exemplo, hipóxia, sangramento ou infecção, a produção individual de cada tipo de célula poderá ser substancialmente aumentada. A expansibilidade e a resposta focal do sistema hematopoético são atribuídas à população de células progenitoras ou células-tronco, com habilidade de autorreplicação ou de produção de linhagens celulares diferenciadas responsivas ao sistema, através de moduladores solúveis específicos.

As células-tronco hematopoéticas podem ser divididas em três tipos: células-tronco hematopoéticas com capacidade de autorrenovação de longa duração (LT-CTH); células-tronco hematopoéticas com capacidade de curta duração (CT-CTH); e progenitores multilinhagem. Enquanto as LT-CTH são consideradas capazes de se renovar indefinidamente, sendo responsáveis por repopular todo o sistema hematopoético, as CT-CTH e os progenitores multilinhagem têm curta duração, sendo capazes de manter a hematopoese de um camundongo irradiado por, no máximo, quatro meses (REYA *et al*., 2001; MULLER-SIEBURG *et al*., 2002).

A identificação e a separação destas diferentes populações de células primitivas recaem sobre combinações de marcadores de superfície, uma vez que nenhuma delas possui um marcador exclusivo. Assim, numa fração enriquecida em LT-CTH, as células mononucleadas são selecionadas pelos imunofenótipos $CD34^+$, $CD38^-$, $CD133^+$, $CD90^+$, Rholow, c-kit^+, lin^- (WOGNUM; EAVES; THOMAS, 2003).

Devido à dificuldade de encontrar anticorpos para ratos, não foi possível utilizar um painel completo para caracterizar a população de células-tronco hematopoéticas e os progenitores multipotentes. A marcação de células medulares com $CD34^+$ e $CD133^+$ realizada em animais, *ex vivo,* demonstrou que a dieta hiperlipídica foi capaz de induzir aumento significativo do número de células $CD34^+$ nos animais do grupo experimental, porém a porcentagem de células da medula óssea $CD133^+$ não diferiu significativamente.

Os resultados obtidos no ensaio de MTT com células mononucleadas da medula óssea de ratos *Wistar* estimulados com IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF apresentaram aumento da celularidade no 5° dia de cultura em ratos

submetidos à dieta hiperlipídica. Os animais hiperlipídicos apresentaram maior produção celular sob ação e estímulos de IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF.

A proliferação, a diferenciação e a capacidade de sobrevivência das células progenitoras hematopoéticas são induzidas por diferentes combinações de citocinas, produzidas por diferentes tipos de tecidos e possuem capacidade de modular o sistema hematopoético (OGAWA, 1993; SMITH, 2003), como, por exemplo, a IL-3 e SCF.

Em nosso modelo, *in vitro*, em culturas de 24 horas de células totais da medula óssea, observamos que os animais experimentais apresentaram aumento da síntese de IL-3. Esse resultado vem ao encontro dos resultados observados *ex-vivo*, nos quais encontramos aumento da celularidade medular, evidenciado pelo mielograma e pela análise histológica, o que comprova a hiperplasia medular.

A interleucina 3 (IL-3), também denominada multi-CSF (LORENZI, 2006), é sintetizada principalmente por linfócitos T (IHLE, 1992) e atua estimulando a proliferação e a diferenciação de células precursoras hematopoéticas, bem como aumentando a função de células mieloides maduras. A IL-3 atua sobre unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM), unidades formadoras de colônias de eritrócitos (CFU-E), unidades formadoras de colônias de megacariócitos (CFU-Meg) e unidades formadoras de granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (CFU-GEMM), caracterizando sua atividade em progenitores mais primitivos comprometidos com a linhagem mieloide (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004).

O fator de célula-tronco (SCF) é uma citocina expressa por diversos tipos celulares, que se liga a seu receptor c-kit, uma tirosina quinase expressa

em todas as CTH. Apesar da SCF não ser essencial para geração de CTH, estudos têm demonstrado que a sinalização SCF/c-kit previne a apoptose destas células, aumentando a chance de expansão (HASSAN; ZANDER, 1996). No tocante à capacidade das células totais da medula óssea em produzir SCF, verificou-se que não houve diferença entre os grupos.

Na tentativa de avaliar a capacidade proliferativa das células mononucleares da medula óssea, utilizamos uma mistura de citocinas e de fatores de crescimento constituída por IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF, para suplementar as culturas.

Os resultados obtidos no ensaio de cultura líquida apresentaram aumento da capacidade proliferativa das células mononucleares da medula óssea no 5º dia de cultura, quando estimuladas com um MIX de citocinas (IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF). Na ausência de citocinas, a proliferação celular em ambos os grupos respondem semelhantemente.

Em relação ao perfil proliferativo das células totais da medula óssea, observou-se aumento da proliferação celular. A dieta hiperlipídica acarretou aumento da proliferação de células totais da medula óssea, uma vez que a porcentagem de células em S/G2/M foi maior.

Observamos também aumento da proliferação de progenitores hematopoéticos $CD34^+$, sendo importante para o quadro de hiperplasia medular, uma vez que as células mais comprometidas apresentam cinética de proliferação maior, sendo mais susceptíveis aos efeitos da dieta hiperlipídica.

A leptina atua em células progenitoras $CD34^+$ via receptor de isoforma longa (LRlo) e *in vitro* demonstra ter capacidade de induzir o aumento de colônias de macrófagos e de granulócitos e de atuar sinergicamente com a

eritropoietina, promovendo desenvolvimento eritroide (KONOPLEVA *et al*., 1999; LAHARRAGUE *et al*., 2000; MIKHAIL *et al*., 1997). Entretanto, nossos resultados, *in vitro*, demonstram que as células hematopoéticas jovens, quando estimuladas com um *mix* de citocinas, que não inclui a leptina, apresentam maior capacidade de proliferação, bem como de formação de colônias grânulo-monocíticas, o que comprova que o aumento da capacidade de proliferação e de diferenciação granulocítica não se deve somente ao aumento da leptina.

Além do componente celular, a hematopoese necessita de microambiente favorável à formação das células. Esse microambiente é constituído por uma rede microfibrilar reticulínica complexa, células endoteliais, fibroblastos, células gordurosas, macrófagos, células intersticiais e linfócitos, que têm por funções a sustentação das células hematopoéticas e a produção de fatores estimulantes, ligantes e de outras substâncias, algumas das quais com funções depressoras sobre a produção hematopoética. A hematopoese está sob controle de substâncias estimuladoras e bloqueadoras, provendo o organismo com estável quantidade de células para a manutenção da homeostase (SILVEIRA, 2000).

Diante disso, uma das possíveis hipóteses levantadas para o aumento da diferenciação do setor granulocítico seria o aumento da produção de citocinas e de fatores de crescimento. Observamos, em nosso modelo, *in vitro*, que as células totais da medula óssea apresentam aumento da capacidade de síntese de G-CSF, que é um estimulante da linhagem granulocítica. Em relação ao GM-CSF, que é um estimulante da linhagem macrofágica, não encontramos diferenças entre os grupos.

Sobre os inibidores da hematopoese, sabemos menos do que sobre os estimulantes, destacando-se o fator β transformador de crescimento (TGF-β), a

proteína α inibidora de macrófagos (MIPIα) e, o mais conhecido atualmente, o fator de necrose tumoral α (TNF-α). Esse fator apresenta ação depressora sobre a eritropoese, embora tenha ação estimulante sobre a linhagem granulopoética (SILVEIRA, 2000).

A indução da angiogênese é regulada por várias moléculas que podem ser liberadas por células tumorais, ou células normais, incluindo células endoteliais, células epiteliais, células mesoteliais e leucócitos. Dentre estas moléculas, está um grupo de proteínas chamadas de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), sendo considerado um dos mais importantes fatores de crescimento endotelial e indutor da angiogênese (FERRARA; GERBER; LE-COUTER, 2003). Em nosso modelo experimental, não observamos aumento de IL-1α, IL-5, IL-6, TNF-α, INF-y e IL-10 produzidos por células da medula óssea total sem estimulantes.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, evidenciamos que os ratos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram resposta hematológica modificada pelo estado nutricional. A adiposidade corporal induziu a hiperplasia medular, com aumento do tecido mieloide.

A dieta hiperlipídica modifica a produção e a maturação das diversas linhagens hematopoéticas com neutrofilia, eosinofilia e linfocitose medular, enquanto que no sangue periférico encontramos neutrofilia e eosinopenia.

A hiperplasia medular decorreu, em parte, do aumento da população de células primitivas, do aumento da síntese de IL-3 e das alterações no processo de diferenciação do setor mieloide.

Os animais experimentais apresentaram maior potencial proliferativo devido ao aumento da velocidade do ciclo celular. Os resultados *in vitro* mostraram aumento na fase S do ciclo celular das células totais da medula óssea, bem como aumento da fase S das células $CD34^+$.

As células da medula óssea apresentam aumento da capacidade de diferenciação celular observada pelo aumento de G-CSF.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4.ed. Philadelphia: Sauders, 2000. p.239-260.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Leptin. **Annual Review of Physiology**, v.62, p.413-437, 2000.

ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MIYATAKE, S.; ARAI, N.; YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflamatory respones. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p.783-836, 1990.

ASSENMACHER, M.; SCHEFFOLD, A.; SCHMITZ, J.; SEGURA CHECA, J.A.; MILTENYI, S.; RADBRUCH, A. Specific expression of surface interferon-gamma on interferon gamma producting T-cells from mouse and man. **European Journal of Immunology**, v.26, p.263-267, 1996.

ATHENS, J.W.; RAAB, S.O.; MAUER, A.M.; ASHENBRUCKER, H.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Leukokinetic studies. lll. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. **Journal of Clinical Investigation**, v.40, p.159-164, 1961.

AUGUSTO, J.C. Obesidade e exercício físico. **Âmbito Medicina Desportiva**, n.1, p.31-36, 1994.

BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v.94, p.557-572, 1998.

BARREDA, D.R.; HANINGTON, P.C.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v.28, p.509-554, 2004.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, supl.1, p.S181-S191, 2003.

BENNETT, B.D.; SOLAR, G.P.; YUAN, J.Q.; MATHIAS, J. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. **Current Biology**, v.6, n.9, p.1171-1179, 1996.

BERG, A.H.; COMBS, T.P.; SCHERER, P.E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.13, p.84-89, 2002.

BILATE, A.M.B. Curso básico atualizado de imunologia para o reumatologista: inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.8, n.2, p.47-51, 2007.

BLAIR, S.N.; HORTON, E.; LEON, A.S.; LEE, I.M.; DRINKWATER, B.L.; DISHMAN, R.K.; MACKEY, M.; KIENHOLZ, M.L. Physical activity, nutrition, and chronic disease. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.28, n.3, p.335-349, 1996.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflamatory reactions mice. **Nutrition Research**, v.15, p.1477-1485, 1995.

BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition a decreased in the macrophages respiratory burst capacity. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.51-60, 2001.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the *in vitro* adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.42, p.367-373, 1998.

BORGES, M.C. **Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (Ilex paraguariensis) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos Wistar**. São Paulo, 2011. 153p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.

BRACH, M.A.; HERRMANN, F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. **Acta Haematologica**, v.86, p.128-137, 1991.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocytose stain. **American Journal of Pathology**, v.19, p.895, 1949.

BULLO, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; MIGO-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADO, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutrition**, v.10, n.10A, p.1164-1172, 2007.

BURGESS, A.W.; METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v.56, n.6, p.947-958, 1980.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E.; eds. **Tietz fundamentos de química clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 958p.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 446p.

CLAYTON, P.E.; GILL, M.S.; HALL, C.M.; TILLMANN, V.; WHATMORE, A.J.; PRICE, D.A. Serum leptin through childhood and adolescence. **Clinical Endocrinology**, v.46, p.727-733, 1997.

CUPPARI, L., coord. **Nutrição**: nas doenças crônica não-transmissíveis. Barueri: Manole 2009. 515p.

CUTLER, R.L.; METCLF, D.; NICOLA, N.A.; JOHNSON, G.R. Purification of a multipotential colony-stimulating factor from pokeweed mitogen-stimulated mouse splenn cell conditioned medim. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, n.11, p.6579-6587, 1985.

CZARNETZKY, B.M.; COWAN, D.H.; BELCHER, R.W. The effects of polyanions on NBT reduction hexose monophosphat shunt activity and ultrastructure of polymorphonuclear leucocytes. **American Journal of Clinical Pathology**, v.64, p.34-40, 1975.

DEXTER, T.M.; GARLAND, J.M.; TESTA, N.G., eds. **Colony-stimulating factors**: molecular and cellular biology. New York: Marcel Dekker, 1990. p.475-478. (Immunology series, v.49).

DINIZ, Y.S.; FERNANDES, A.A.H.; CAMPOS, K.E.; MANI, F.; RIBAS, B.O.; NOVELLI, E.L. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.2, p.319-325, 2004.

DOURMASHKIN, J.T.; CHANG, G.Q.; GAYLES, E.C.; HILL, J.O.; FRIED, S.K.; JULIEN, C.; LEIBOWITZ, S.F. Different forms of obesity as a function of diet composition. **International Journal of Obesity**, v.29, n.11, p.1368-1378, 2005.

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J.; SOAVE, C.F.; SENE-FIORESE, M.; DÂMASO, A.R, CHEIK, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.3, p.341-348, 2006.

DUVILLARD, S.P.V. Lipids and lipoproteins in diet and exercise: introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.29, n.11, p.1414-1415, 1997.

DZIERZAK, E.; MEDVINSKY, A.; BRUIJN, M. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. **Immunology Today**, v.19, p.228-241, 1998.

EAVES, C.J.; CASHMAN, J.D.; SUTHERLAND, H.J.; OTSUKA, T.; HUNPHIRIES, R.K.; HOGGE, D.E.; LANDSDROP, P.L.; EAVES, A.C. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.628, p.298-306, 1991.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DÂMASO, A.R.; RIBEIRO, E.B.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, n.2, p.218-224, 2004.

FALLON, H.J.; FREI, E.; DAVISON, J.D.; TRIER, J.S.; BURK, D. Leucocyte preparations from human blood: evaluation of their morphologic and metabolic state. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.59, p.779-791, 1962.

FERNÁNDES-REAL, J.M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocrine Reviews**, v.24, p.278-301, 2003.

FERRARA, N.; GERBER, H.; LE-COUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v.9, n.6, p.669-676, 2003.

FLATT, J.P. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.45, p.296-306, 1987.

FLATT, J.P. Use and storage of carbohydrate and fat. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.952-959, 1995.

FORD, E.S. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. **Diabetes Care**, v.22, p.1971-1977, 1999.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v.116, p.769-778, 2004.

GAINSFORD, T.; WILLSON, T.A.; METCALF, D.; HANDMAN, E.; MCFARLANE, C.; NG, A.; NICOLA, N.A.; ALEXANDER, W.S.; HILTON, D.J. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation on hematopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.25, p.14564-14568, 1996.

GAÍVA, M.H.G.; COUTO, R.C.; OYAMA, L.M.; COUTO, G.E.; SILVEIRA, V.L.; RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, C.M. Polynsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **British Journal of Nutrition**, v.86, n.2, p.371-377, 2001.

GAUTHIER, M.S.; COUTURIER, K.; LATOUR, J.G.; LAVOIE, J.M. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. **Journal of Applied Physiology**, v.94, n.6, p.2127-2134, 2003

GORDON, A.S.; CHARIPPER, H.A. Endocrine systems and hemopoiesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.48, p.615, 1947.

HANSEN, L.K.; GRIMM, R.H.J.R.; NEATON, J.D. The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors. **International Journal of Epidemiology**, v.19, p.881-888, 1990.

HARIRI, N.; THIBAULT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v.23, n.2, p.270-299, 2010.

HASSAN, H.T.; ZANDER, A. Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. **Acta Haematologica**, v.95, n.3/4, p.257-262, 1996.

HAYLOCK, D.N.; MAKINO, S.; DOWSE, T.L.; TRIMBOLI, S.; NIUTTA, S.; TO, L.B.; JUTTNER, C.A.; SIMMONS, P.J. *Ex vivo* hematopoietic porgenitor cell expansion. **Immunology Methods**, v.5, n.3, p.217-225, 1994.

HIROSE, H.; SAITO, I.; KAWAI, T.; NAKAMURA, K.; MARUYAMA, H.; SARUTA, T. Serum leptin level: possible association with haematopoiesis in adolescents, adolescents, independent of body mass index and serum insulin. **Clinical Science**, v.94, p.633-636, 1998.

IHLE, J.N. Interleukin-3 and hematopoiesis. **Chemical Immunology**, v.51, p.65-106, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Coordenação de Índices de Preços. **Pesquisa de orçamentos familiares 2002/2003**: aquisição alimentar domiciliar *per capita*, Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 251p.

IOSSA, S.; LIONETTI, L.; MOLLICA, M.P.; CRESCENZO, R.; BOTTA, M.; BARLETTA, A.; LIVERINI, G. Effect of high-fat-feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adults. **British Journal of Nutrition**, v.90, n.5, p.953-960, 2003.

JAMES, W.P.T.; FERRO-LUZZI, A.; ISAKSSON, B.; SZOSTAK, W.B.; GUALDA-VARGAS, P. **Healthy nutrition**: preventing nutrition-related diseases in Europe. Copenhagen: World Health Organization; 1988. [WHO-Regional Publications, European Series; 24].

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C.C.; LAPOINT, K.; MCLNTOSH, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **Journal of Nutrition**, v.139, n.1, p.1-4, 2009.

KEYS, A. Coronary heart disease in seven countries. **Circulation**, v.41, n.4, suppl.1, p.I1-I211, 1970.

KEYS, A.; MENOTTI, A.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; DJORDEIRC, B.S.; BUZINA, R.; DONTAS, A.S.; FIDANZA, F.; KARVONEN, M.J.; KIMURA, N.; MOHACEK, I.; NEDELJKOVIC, S.; PUDDU, V.; PUNSAR, S.; TAYLOR, H.L.; CONTI, S.; KROMHOUT, D.; TOSHIMA, H. The seven countries study: 2289 deaths in 15 years. **Preventive Medicine**, v.13, n.2, p.141-154, 1984.

KIM, S.; MOON, S.; POPKIN, B.M. The nutrition transition in South Korea. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.44–53, 2000.

KING, W.; PAULSON, S.R.; PUCKETT, N.L.; KREBS, A.T. Cell death: the effect of injury on the entrance of vital dye in Erlich tumor cells. **American Journal of Pathology**, v.35, p.1067-1075, 1959.

KONOPLEVA, M.; MIKHAIL, A.; ESTROV, Z.; ZHAO, S.; HARRIS, D.; SANCHEZ-WILLIAMS, G.; KORNBLAU, S.M.; DONG, J.; KLICHE, K.; JIANG, S.; SNODGRASS, H.R; ESTEY, E.H.; ANDREEFF, M. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. **Blood**, v.93, n.5, p.1668-1676, 1999.

KUMANYAKA, S.K. Mini-symposium on obesity: overview and some strategic considerations. **Annual Review of Public Health**, v.22, p.293-308, 2001.

LAHARRAGUE, P.; OPPERT, J.M.; BROUSSET, P.; CHARLET, J.P.; CAMPFIELD, A.; FONTANILLES, A.M.; GUY-BRAND, B.; CORBERAND, J.X.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. High concentration of leptin stimulates my-eloid differentiation from human bone marrow $CD34^{+}$ progenitors: potencial involvement in leukocytosis of obese subjects. **International Journal of Obesity**, v.24, p.1212-1216, 2000.

LEMISCHKA, I. Stem cell dogmas in the genomics era. **Reviews in Clinical and Experimental Hematology**, v.5, p.15-25, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

LOFFREDA, S.; YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; KARP, C.L.; BRENGAMAN, M.L.; WANG, D.J.; KLEIN, A.S.; BULKLEY, G.B.; BAO, C.; NOBLE, P.W.; LANE, M.D.; DIEHL, A.M. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB Journal**, v.12, p.57–65, 1998.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia**: propedêutica e clínica. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.21.

MAFRA, D.; FARAGE, N.E. O papel do tecido adiposo na doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.28, n.2, p.108-113, 2006.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S., eds. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998. 1179.

MATSUZAWA, Y.; FUNAHASHI, T.; KIHARA, S.; SHIMOMURA, I. Adiponectin and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, p.29-33, 2004.

MAYANI, H.; GUILBERT, L.J.; JANOWSA-WIECZOREK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. **European Journal of Haematology**, v.49, p.225-233, 1992.

METCALF, D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. **Stem Cells**, v.25, n.10, p.2390-2395, 2007.

METCALF, D. The hemopoietic regulators: an embarrassment of riches. **BioEssays**, v.14, p.799-805, 1992.

METCALF, D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? **Blood**, v.82, p.3515-3523, 1993.

METCALF, D. **Hemopoietic colonies**: *in vitro* cloning of normal and leukemic cells. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 227p.

METCALF, D.; NICOLA, N.A. **The hemopoietic colony stimulating factors**: from biology to clinical applications. Cambridge, New Yorl: Cambridge University Press, 1995. 329p.

MIKHAIL, A.A.; BECK, E.X.; SHAFER, A.; BARUT, B.; GBUR, J.S.; ZUPANCIC, T.J.; SCHWEITZER, A.C.; CIOFFI, J.A.; LACAUD, G.; OUYANG, B.; KELLER, G.; SNODGRASS, H.R. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. **Blood**, v.89, n.5, p.1507-1512, 1997.

MILLER, W.C. Diet composition, energy intake, and nutritional status in relation to obesity in men and women. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.23, n.3, p.280-284, 1991.

MOHANDAS, N.; PRENANT, M. Three-dimensional model of bone marrow. **Blood**, v.50, p.633-643, 1978.

MONDINI, L; MONTEIRO, C.A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). **Revista de Saúde Pública**, v.28, p.433-439, 1994.

MONTANI, J.P.; ANTIC, V.; YANG, Z.; DULLOO, A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triagle. **International Journal of Obesity**, v.26, p.S28-S38, 2002.

MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; MEDEIROS DE SOUZA, A.L.; POPKIN, B.M. The nutrition transition in Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.105-113, 1995.

MORRINSON S.J.; WRIGHT, D.E.; CHESSHIER, S.H.; WEISSMAN, I.L. Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. **Current Opinion in Immunology**, v.9, p.216-221, 1997.

MULLER-SIEBURG, C.E.; CHO, R.H.; THOMAN, M.; ADKINS, B.; SIEBURG, H.B. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. **Blood**, v.100, n.4, p.1302-1309, 2002.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v.84, p.2844-2853, 1993.

OZCAN, U.; YILMAZ, E.; OZCAN, L. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**, v.313, p.1137-1140, 2006.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.476, p.178-185, 2008.

PASQUALE, D.; CHIKKAPPA, G.; WANG, G.; SANTELLA, D. Hydrocortisone promotes survival and proliferation of granulocyte-macrophage progenitors via monocytes/macrophages. **Experimental Hematology**, v.17, p.1110, 1989.

PEELMAN, F.; WAELPUT, W.; ISERENTANT, H.; LAVENS, D.; EYCKERMAN, S.; ZABEAU, L.; TAVERNIER, J. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. **Progress in Lipid Research**, v.43, p.283-301, 2004.

PETERS, W.P.; HOLLAND, J.F.; SENN, H.; RHOMBERG, W.; BENERJEE, T. Corticosteroid administration and localized leukocyte, mobilization in man. **New England Journal of Medicine**, v.282, p.342-345, 1972.

POPKIN, B.M. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. **Nutrition Reviews**, v.52, p.285–298, 1994.

POPKIN, B.M. The nutrition transition and its health implications in lower income countries. **Public Health Nutrition**, v.1, p.5–21, 1998.

POPKIN, B.M. The nutrition transition and obesity in the developing world. **Journal of Nutrition**, v.22, p.355-375, 2001.

QUESENBERRY, P.J. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: BEUTLER, E.; LICHTMSN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams hematology**. 5.ed. New York: McGraw Hill, 1995. v.22, p.211-228.

RANE, S.G.; REDDY, E.P.; JAKs STATs and Src kinases in hematopoiesis. **Oncogene**, v.21, p.3295-3358, 2002.

RELLING, D.P.; ESBERG, L.B.; FANG, C.X.; JOHNSON, W.T.; MURPHY, E.J.; CARLSON, E.C.; SAARI, J.T.; REN, J. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. **Journal of Hypertension**, v.24, p.549-561, 2006.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.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. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v.414, n.6859, p.105-111, 2001.

ROMIEU, I.; WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; SAMPSON, L.; ROSNER, B.; HENNEKENS, C.H.; SPEIZER, F.E. Energy intake and other determinants of relative weight. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.47, p.406-412, 1988.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.315-328, 1947.

SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; SANCHEZ-MARGALET, V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. **Cellular Immunology**, v.194, p.6–11, 1999.

SAWADA, K.; KRANTZ, S.B.; DAI, C.H.; KOURY, S.T.; HORN, S.T.; GLICK, A.D.; CIVIN, C.I. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. **Journal of Cellular Physiology**, v.142, p.219-230, 1990.

SAWDEY, M.S.; LOSKUTOFF, D.J. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression *in vivo*: tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. **Journal of Clinical Investigation**, v.88, p.1346-1353, 1991.

SCHAFFLER, A.; SCHOLMERICH, J.; SALZBERGER, B. Adipose tissue as an immunological organ: toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. **Trends in Immunology**, v.28, p.393-399, 2007.

SCHRAUWEN, P.; WESTERTERP, K.R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **British Journal of Nutrition**, v.84, n.4, p.417-427, 2000.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inibitors of the siythesis and actions of adrenocortical hormones. In: HARDMAN, J.G.; LEMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDEN, R.W.; GOODMAN, A.G., eds. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996. p.459-485.

SCHRAUWEN, P.; WESTERTERP, K.R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **British Journal of Nutrition**, v.84, n.4, p.417-427, 2000.

SCHWARTZ, J.; WEISS, S.T. Host and environmental factors influencing the peripheral blood leukocyte count. **American Journal of Epidemiology**, v.134, p.1402-1409, 1991.

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M.P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.32, n.6, p.638-644, 2008.

SILVEIRA, P.A.A. Hematopoese: alguns aspéctos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.22, supl.5, p.5-6, 2000.

SMITH, C.M.D. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. **Cancer Control**, v.10, n.1, p.9-16, 2003.

SOEDE-BOBOK, A.A.; TOUW, I.P. Molecular understanding of hematopoietin/cytokine receptor signaling defects in hematopoietic disorders. **Journal of Molecular Medicine**, v.75, n.7, p.470-477, 1997.

SPIVAK, J.L.; FERRIS, D.K.; FISCHER, J.; NOGA, S.J.; ISAACS, M.; CONNOR, E.; HANKINS, W.D. Cell cycle-specific behavior of erythropoietin. **Experimental Hematology**, v.24, p.141-150, 1996.

SPIVAK, J.L.; FISCHER, J.; ISAACS, M.A.; HANKINS, D. Protein kinases and phosphates are involved in erythropoietin mediated signal transduction. **Experimental Hematology**, v.20, p.500-504, 1992.

SPIVAK, J.L.; HOGANS, B.B. The *in vivo* metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. **Blood**, v.73, p.90-99, 1989.

STAMLER, J.; SHEKELLE, R. Dietary cholesterol and human coronary heart disease: the epidemiological evidence. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.112, p.1032-1040, 1988.

STORLIEN, L.H.; BAUR, L.A.; KRIKETOS, A.D.; PAN, D.A.; COONEY, G.J.; JENKINS, A.B.; CALVERT, G.D.; CAMPBELL, L.V. Dietary fats and insulin action. **Diabetologia**, v.39, p.621-631, 1996.

TRENTIN, J.J. Hemopoietic microenvironments. **Transplantation Proceedings**, v.10, p.77-82, 1978.

VECCHIONE, C.; ARETINI, A.; MAFFEI, A.; MARINO, G.; SELVETELLA, G.; POULET, R.; TRIMARCO, V.; FRATI, G.; LEMBO, G. Cooperation between insulin and leptin in the modulation of vascular tone. **Hypertension**, v.42, p.166-170, 2003.

ZANICHELLI, M.A.; FURRER, A.A.; PEREIRA FILHO, T.S.; VAZ, F.A.C. Hematopoese, fatores de crescimento e aplicação clínica da eritropoetina na anemia da prematuridade. **Pediatria**, v.17, n.2, p.123-142, 1995. [Review].

WALKER, F.; NICOLA, N.A.; METCALF, D.; BURGESS, A.W. Hierarchical dow-modulation of hematopoietic growth factor receptors. **Cell**, v.43, p.269-276, 1995.

WEISS, M.; YOKOYAMA, C.; SHIKAMA, Y.; NAUGLE, C.; DRUKER, B.; SIEFF, C.A. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signal transduction requires the proximal cytoplasmic domains of the alpha and beta subunits. **Blood**, v.82, n.11, p.3298-3306, 1993.

WEISSMAN, I.L. Stem cells: units of development, units of regulation, and units in evolution. **Cell**, v.100, p.157-168, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Study group of diet, nutrition and prevention of chronic diseases (1989: Geneva)**: technical report. Geneva: World Health Organization; 1990. (Technical Report Series - WHO, 797).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report**: 2002 reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization, 2002. 248p.

WOGNUM, A.W.; EAVES, A.C.; THOMAS, T.E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. **Archives of Medical Research**, v.34, n.6, p.461-475, 2003.

WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; RUSHING, P.A.; D'ALESSIO, D.; TSO, P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1081-1087, 2003.

WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, nutrition and the prevention of cancer**: a global perspective. Washington: American Institute for Cancer Research, 1997. 670p.

ANEXO

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo..... 114

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/35/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Avaliação da capacidade proliferativa hematopoética em ratos wistar submetidos à dieta hiperlipídica"** (Protocolo no. 273), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Luciana Simão do Carmo** sob a orientação do(a) Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e foi APROVADO em reunião de 10 de maio de 2010.

São Paulo, 11 de maio de 2010.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3677 - Fax (11) 3813 5083 – e-mail: rtrigo@usp.br