

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Efeito do naftaleno sobre a atividade do receptor gama ativado por proliferadores
peroxissomais e a adipogênese em cultura

Aluno: Kenzo Watanabe

Matrícula: 11/0014839

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Brasília, 2016

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Efeito do naftaleno sobre a atividade do receptor gama ativado por proliferadores
peroxissomais e a adipogênese em cultura

Trabalho de conclusão apresentado ao curso de graduação em Farmácia da
Universidade de Brasília

Aluno: Kenzo Watanabe

Matrícula: 11/0014839

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Brasília, 2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DO NAFTALENO SOBRE A ATIVIDADE RECEPTORES GAMA ATIVADO POR
PROLIFERADORES PEROXISSOMAI E A ADIPOGÊNESE EM CULTURA

Kenzo Watanabe Fernandes

Trabalho de conclusão apresentado ao curso de graduação em Farmácia da
Universidade de Brasília

Aprovado em 28 de junho de 2016.

Banca de avaliação

Angélica a Amato

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Djane Braz Duarte – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Guilherme Gelfuso Martins – Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu parceiro e meu amor da vida, Mathews, por estar na minha vida, pelo apoio constante e por acreditar em mim.

Agradeço a minha mãe, Keiko, pelas palavras de sabedoria e pelos incentivos que me deu ao longo do curso. Aos meus avós, Eitaro e Mine, aos meus tios, Kensuke e Mari, e minha prima, Emi, que mesmo distantes, oraram e sempre torceram por mim.

Agradeço a minha professora orientadora, Angélica Amorim Amato, pela oportunidade, pela paciência e pelos ensinamentos.

Agradeço a minhas colegas de trabalho, Alana, Carol e Nady pela ajuda e pela companhia durante o projeto.

Agradeço aos meus amigos, Artur, Rayane, Larissa, Louise, Giselly, Maíra e Marília, pela amizade, pela ajuda, pelo apoio e pelos momentos de diversão.

A todos que nunca duvidaram de mim e contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigado e sou eternamente grato!

RESUMO

Os desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias presentes no ambiente, alimentos ou produtos de consumo humano que podem mimetizar ou interferir no sistema endócrino no organismo humano e, conseqüentemente, afetar as funções dos tecidos e/ou órgãos, sendo que um dos seus principais alvos são os chamados receptores nucleares. Estudos mostram que os DEs possuem relação com o aumento da incidência ou progressão de algumas doenças tais como obesidade, diabetes, depressão e alguns tipos de câncer. Dentre essas doenças, destaca-se a obesidade, cuja prevalência aumentou significativamente nos últimos 30 anos, afetando cerca de 8% da população mundial. As fontes de exposição aos DEs incluem dieta; medicamentos e correlatos farmacêuticos; produtos de limpeza e pesticidas (inseticidas, fungicidas e acaricidas). Dessa forma, procura-se identificar os possíveis desreguladores que possuem efeitos obesogênicos, sendo que o elemento de interesse do presente estudo é o naftaleno, um hidrocarboneto aromático policíclico comumente presente na composição repelentes de insetos e cigarros e pouco explorado na literatura. Seu efeito adipogênico em cultura foi investigado em duas linhagens celulares: 3T3-L1 (pré-adipócitos murinos) e C3H10T1/2 (células mesenquimais murinas) e no receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ).

Palavras-chave: desregulador endócrino, receptor nuclear, naftaleno e efeito obesogênico.

ABSTRACT

Endocrine disruptors (EDs) are substances that can be found in the environment, food or products of human consumption, which mimic or interfere with the body's endocrine system and, consequently, affect the functions of tissues and organs, with one of its major targets called nuclear receptors. Studies show that there is a correlation between EDs and the increasing incidence or progression of certain diseases such as obesity, diabetes, depression and certain types of cancer. Obesity rates, in particular, have increased significantly over the past 30 years, affecting about 8% of the world population. The sources of exposure of EDs include diet; medicinal and pharmaceutical products; cleaning products and pesticides (insecticides, fungicides and acaricides). Thus, the goal is to identify potential disruptors that have obesogenic effects and the element of interest of the present study is naphthalene, an aromatic hydrocarbon polycyclic, which is little addressed in the literature and commonly present in the composition of insect repellents and cigarettes. The adipogenic effect of naphthalene was investigated in two cell lines: 3T3-L1 (murine preadipocytes) and C3H10T1/2 (murine mesenchymal cells) and also in the activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ).

Keywords: endocrine disrupter, nuclear receptor, naphthalene and obesogenic effect.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 1.1 Obesidade..... | 8 |
| 1.2 Desreguladores Endócrinos e Receptores Nucleares..... | 10 |
| 1.3 Naftaleno..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 Objetivos Gerais..... | 17 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 17 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 Ensaio do Gene Repórter..... | 18 |
| 3.2 Adipogênese em Cultura..... | 19 |
| 4. RESULTADOS..... | 21 |
| 4.1 Efeito do naftaleno sobre o PPAR γ | 21 |
| 4.2 Efeito do naftaleno sobre a adipogênese em cultura..... | 22 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 25 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 27 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 28 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Inicialmente, acreditava-se se que os adipócitos, componentes do tecido adiposo, apenas acumulavam lipídios no seu citoplasma, ou seja, eram fontes de armazenamento de gordura. Porém, o que se sabe agora é que os adipócitos são componentes críticos do controle metabólico e endócrino, podendo ter efeitos positivos e negativos na regulação da homeostase (Greenberg e Obin, 2006). A obesidade é uma condição caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, sendo frequentemente associada com desordens metabólicas (diabetes, dislipidemia, hipertensão), doenças psicológicas (depressão) e desenvolvimento de tumores (câncer de próstata, ovário e mama). Representa hoje um grave problema de saúde mundial. Uma das medidas de referência mais usada para caracterizar a presença de obesidade é o IMC (Índice de Massa Corporal), definido pela peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado (kg/m^2) (Nguyen e El-Serag, 2011). Valores iguais ou superiores a 25 kg/m^2 são considerados indicativos de sobrepeso e iguais ou acima de 30 kg/m^2 , obesidade (OMS, 2015).

A obesidade pode afetar indivíduos de qualquer idade e pertencentes a qualquer grupo socioeconômico. De acordo com os dados da Organização de Saúde (OMS), a prevalência da obesidade entre 1980 e 2014 mais que dobrou. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos, com idade igual ou superior a 18 anos, tinham sobrepeso. Desses, mais de 600 milhões eram obesos. No geral, cerca de 13% da população mundial adulta (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos. No caso da obesidade infantil, em 2013, 42 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade estavam acima do peso ou obesos. Uma vez considerado como um problema de países desenvolvidos, o excesso de peso e obesidade estão em ascensão em países em desenvolvimento, especialmente em ambientes urbanos. Nos países em desenvolvimento, o aumento da taxa de

sobrepeso e obesidade na infância foi mais de 30% superior ao de países desenvolvidos. (OMS, 2015).

No Brasil, 52,5% dos brasileiros estão acima do peso e 17,9% da população está obesa. Entre os homens e as mulheres brasileiros, o índice de excesso de peso na população masculina é de 56,5% e de 49,1% entre a população feminina. No caso da obesidade, 17,6% dos homens são obesos, enquanto em mulheres, 18,2% são obesas. Por faixa etária, jovens entre 18 e 24 anos registram menor prevalência, de 31,5% para excesso de peso e 8,5% para obesidade, enquanto a população de 35 a 64 anos apresenta índices mais elevados, chegando a ultrapassar 60% para sobrepeso e 23% para obesidade (Vigitel, 2014).

Obesidade e sobrepeso estão ligados a mais mortes no mundo do que desnutrição. A maioria da população do mundo vive em países onde o excesso de peso e obesidade matam mais pessoas do que abaixo peso, isso valendo tanto para países desenvolvidos quanto para países em desenvolvimento (OMS, 2015).

A etiologia da obesidade envolve uma combinação de fatores genéticos, estilo de vida e fatores ambientais. Acredita-se que os fatores comportamentais estejam associados ao rápido aumento significativo das taxas de obesidade nas últimas décadas. Embora os fatores genéticos representem uma explicação para a predisposição à doença, não explicam por si só a progressão da obesidade epidêmica mundial. Estilos de vida modernos que incluem excessivo consumo de energia, falta de atividade física e privação de sono parecem ser os principais fatores que contribuem para a obesidade. No entanto, o aumento da incidência de doenças metabólicas também se correlaciona com alterações substanciais no ambiente químico resultante dos novos procedimentos industrial e agrícola ao longo dos últimos 40 anos (Casals-Casas e Desvergne, 2011).

Essa mudança de ambiente prevê a existência de elementos obesogênicos que inapropriadamente regulam o metabolismo de lipídios para promover obesidade. Resultados de alguns estudos epidemiológicos favorecem essa hipótese. Por exemplo,

Rundle et al. (2012) conduziram um estudo na cidade de Nova York envolvendo 702 mulheres grávidas, não fumantes e com idade entre 18 e 25 anos. Foram medidos os níveis de poluição atmosférica dos ambientes onde estavam e o desenvolvimento de seus filhos foi acompanhado até os sete anos de idade. Os autores observaram que as crianças cujas mães tiveram maior contato com os poluentes apresentaram 1,7 mais chances de serem obesas aos cinco anos de idade e 2,2 mais chances aos sete anos, quando comparados com os filhos de mulheres menos expostas ao ar poluído. Nessa idade, essas crianças tinham, em média, 1,5 kg a mais de gordura do que as menos expostas.

1.2 Desreguladores Endócrinos e Receptores Nucleares

Com a industrialização, iniciada no século XIX, a produção de produtos químicos e a sua introdução no ambiente aumentou de forma massiva. Cerca de onze milhões de substâncias químicas são conhecidas em todo o mundo, sendo três mil produzidas em larga escala (Fontenele et al. 2010) e a exposição a essas substâncias industriais só vem aumentando nas últimas décadas. Dentre esses elementos químicos, há os compostos do tipo desreguladores endócrinos (DEs). O termo ‘desregulador endócrino’ (*endocrine disruptor*) foi primeiramente usado por Colborn e colaboradores em 1993, porém, vale ressaltar que na literatura atual inglesa, o termo mais usado é ‘*endocrine disrupting chemicals*’ cuja tradução não é simples. Existem cinco possíveis traduções: perturbadores endócrinos, interferentes endócrinos, desreguladores endócrinos, disruptores endócrinos e interferentes hormonais. Além disso, há os termos ‘*endocrine modulator*’, ‘*environmental disruptors*’ e ‘*environmental estrogen*’ podendo gerar confusão no entendimento do conceito dessa classe de substâncias (Bila e Dezotti, 2007). Esse trabalho irá usar o termo ‘desregulador endócrino’ e a definição da Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* - EPA), segundo a qual um

desregulador endócrino é um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ação de hormônios endógenos que regulam a homeostase, reprodução e processo de desenvolvimento. Ou seja, são substâncias químicas que podem mimetizar ou interferir nas ações de hormônios no organismo humano e, conseqüentemente, afetar as funções dos tecidos e/ou órgãos.

Os humanos são expostos aos DEs por várias vias (Figura 1), abrangendo a ingestão, inalação, contato dérmico, transporte transplacentário e por amamentação. A exposição, além disso, pode ser direta ou indireta. A exposição direta ocorre por contato com a matéria bruta do DE, tais como produtos de fitoestrógenos em plantas, e a exposição indireta se dá por contato com alimentos tratados com DE, como pesticidas e fungicidas (Yang et al. 2015). Assim, as fontes de exposição aos DE incluem dieta, medicamentos, correlatos farmacêuticos, detergentes, repelentes, desinfetantes, fragrâncias, solventes, retardantes de chama e entre outros produtos que estão presentes nos efluentes industriais, residenciais e de estações de tratamento de água e esgoto e que possuem comprovada atividade hormonal (Fontenele et al. 2010).

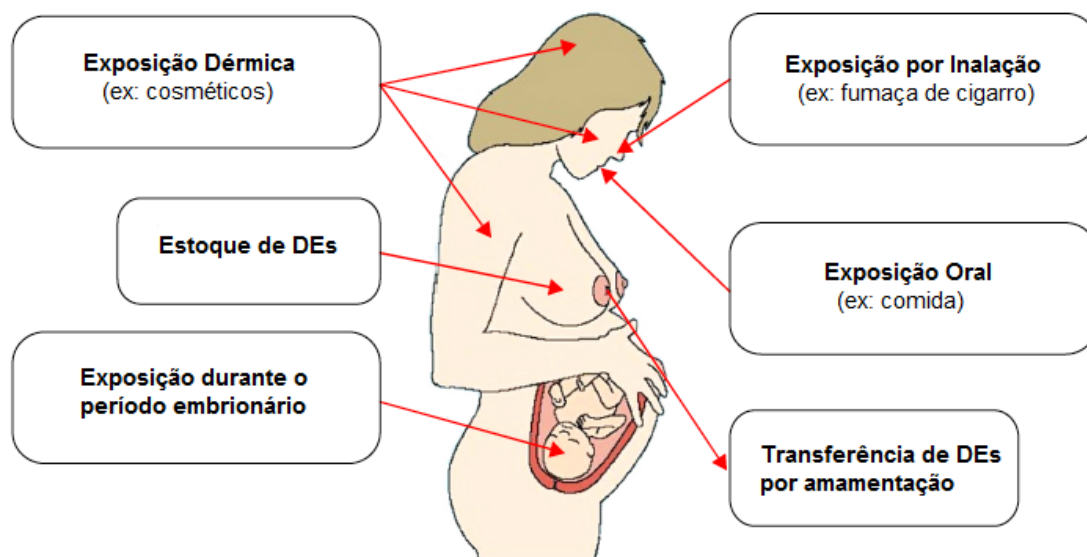


Figura 1: Fontes de exposição aos DEs. Adaptada de Yang et al. 2015, pag.13.

Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar a ação dos hormônios, tais como, substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas, bisfenol A, substâncias farmacêuticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios). Os primeiros distúrbios identificados em associação com a exposição aos DEs foram os reprodutivos, como o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol (DES) durante a gravidez, entre os anos de 1940 a 1970; anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida DDT e seu metabólito DDE e um estudo na Dinamarca que relata o declínio da qualidade do sêmen de homens durante aproximadamente 50 anos, entre os anos de 1938 e 1990 (Bila e Dezotti, 2007). A partir desses eventos é que começaram a se elucidar os possíveis mecanismos de ação dos DEs.

Mais recentemente, a exposição a DEs tem sido associada ao desenvolvimento de obesidade e diversos mecanismos são propostos para explicar essa associação, com base, sobretudo, em dados de estudos experimentais. Segundo Heindel et al. (2015), os potenciais mecanismos de ação obesogênica envolvem a alteração de vias metabólicas que regulam o peso corporal e incluem: ativação de receptores nucleares, regulação epigenética, metilação de DNA e modificação de histonas, que podem afetar a regulação de hormônios, vias de sinalização metabólicas e diferenciação celular. Se esses eventos de programação ocorrem no início do desenvolvimento embrionário, eles podem levar a alterações persistentes na sinalização hormonal. Entre esses potenciais mecanismos de ação, destaca-se a ativação de receptores nucleares, pois os DEs são compostos lipofílicos e por causa dessa característica, uma rota pode ser privilegiada pela interação direta com um dado receptor nuclear, que presumivelmente perturba ou modula a expressão de um gene. Por exemplo, a maioria dos DEs associados a defeitos reprodutivos e de desenvolvimento interfere com a função do receptor de estrogênio (ER)

e/ou do receptor de androgênio (AR) e, assim, pode perturbar a atividade de ligantes estrogênicos e androgênicos (Casals-Casas e Desvergne, 2011).

Em humanos, os receptores nucleares compreendem uma família de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes de um modo dependente do ligante. Nos mamíferos, 48 receptores nucleares foram identificados e estão envolvidos em praticamente todas as funções vitais, por exemplo, o desenvolvimento fetal, a homeostase, reprodução, metabolismo e resposta a substâncias xenobióticas (Swedenborg et al. 2009). Tais receptores podem ativar ou reprimir genes alvo através da ligação direta a elementos de resposta de DNA como homo- ou hetero-dímeros ou por ligação a outras classes de fatores de transcrição ligados ao DNA (Hart, 2002).

Dentre os receptores nucleares, há os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) e três subtipos diferentes e homólogos de PPARs: PPAR α , PPAR δ ou PPAR β , e PPAR γ , sendo cada um codificado por um gene diferente, com perfil de expressão tecidual característico e seletividade a um ligante próprio. O PPAR α é expresso nos hepatócitos, cardiomiócitos, enterócitos e nas células do túbulo proximal do rim; o PPAR δ ou PPAR β é ubiquamente expresso e o PPAR γ é fortemente expresso no tecido adiposo e no sistema imune. Desses três subtipos de receptores, o PPAR γ é o mais estudado. Sua estrutura, assim como os outros receptores nucleares, consiste de cinco domínios (Figura 2): na região N-terminal, estão localizados os domínios A/B, que contém o sítio de ativação transcricional independente de ligante (AF1 - *activation function-1*); o domínio C, o qual representa a região de domínio de ligação ao DNA (DBD - *DNA binding domain*); o domínio D, sendo a região de dobradiça (*hinge*) e o domínio E, possuindo o local de domínio de ligação ao ligante (LBD - *ligand binding domain*) e o sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF2 - *activation function-2*) (Kroger e Bruning, 2015).



Figura 2: Estrutura primária com a representação dos domínios funcionais do PPAR γ . Adaptada de Kroker e Bruning, 2015, pag. 3.

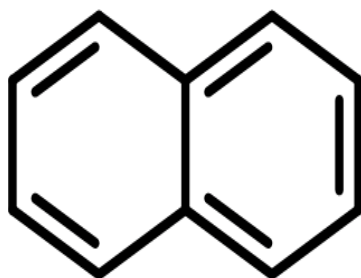
O PPAR γ está envolvido na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos e no processo de diferenciação de adipócitos. A ativação do receptor por ligantes sintéticos resulta em um perfil de expressão gênica que está associado ao aumento da sensibilidade à insulina (Lizcano e Vargas, 2013). Dessa forma, afetando a atividade do receptor potencialmente poderá desencadear disfunções endócrinas e poderá provocar o acúmulo de gordura no organismo.

1.3 Naftaleno

O hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) são poluentes ambientais de ação antrópica resultantes da combustão incompleta de combustível fóssil, gás, carvão e também são produzidos naturalmente de erupções vulcânicas e incêndios florestais. PAH são utilizados em muitos processos comerciais diferentes. Por exemplo, fluoreno e fenantreno são usados na produção de corantes, enquanto naftaleno é usado na produção de sulfonatos, inseticidas e produtos farmacêuticos. Além da exposição ocupacional, a fonte mais comum de exposição é pela inalação de partículas no ar em locais associados com uma elevada densidade populacional e uma taxa consistente de industrialização. Em alternativa, há a exposição a um PAH pela ingestão de carne carbonizada ou pela ingestão de alimentos cultivados a partir de solo contaminado. A maior parte dos PAH é excretada do corpo logo após a sua exposição, mas acredita-se que pequenas quantidades possam ser armazenadas na gordura e no fígado (Ranjbar et al. 2015).

Os PAH são identificados como tóxicos, visto que grande parte deles possui propriedades mutagênicas, carcinogênicas e atividade desreguladora endócrina (Peiffer et al. 2013). Dados de estudos epidemiológicos indicam que há correlação positiva entre altos níveis atmosféricos de PAH e obesidade infantil (Rundle et al. 2012). Além disso, um estudo feito por Ranjbar et al. (2015), em que 4675 adultos foram examinados quanto à presença de oito metabólitos hidroxilados de PAH e de obesidade, mostrou que PAH estão relacionados com grande risco de desenvolvimento de condições cardiometabólicas, independentemente do IMC. A exposição aos PAH é associada também ao aumento do risco de síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemia e diabetes melitus tipo 2, dependendo do metabólito (Ranjbar et al. 2015).

Dos poluentes orgânicos conhecidos, o naftaleno é considerado o membro mais volátil dessa classe. Possui dois anéis aromáticos condensados em sua estrutura (Figura 3), é um constituinte do diesel e combustível de jato e é liberado para o ambiente pela combustão incompleta em processos industriais, domésticos e de fontes naturais (tráfego de veículos, tráfego aéreo, residencial, aquecimento com combustíveis fósseis, queima da gasolina, incêndios florestais, repelentes ou inseticidas e cigarro) (Preuss et al. 2003). Também é um micropoluinte presente na água potável, comumente usado com agente antitraça para preservar roupas e possui atividade cancerígena e cataratogênica comprovada. O naftaleno possui a capacidade de se ligar covalentemente a biomoléculas nas células do fígado, pâncreas e pulmão e de inibir a respiração mitocondrial (Samanta et al. 2002).



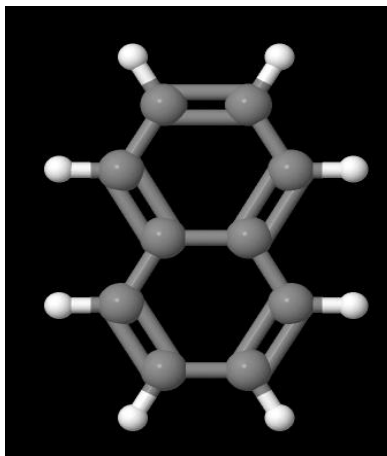


Figura 3: Fórmulas estrutural e tridimensional do naftaleno. Fonte: ChemSpider.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Verificar se o naftaleno possui efeito obesogênico após sua exposição em repelentes de insetos.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a atividade do naftaleno sobre o receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) por meio do ensaio do gene repórter.

Analisar o efeito do naftaleno sobre a adipogênese em duas linhagens de células: 3T3-L1 (pré-adipócitos murinos) e C3H10T1/2 (células mesenquimais) através do acúmulo intracelular de lipídeos com a utilização do corante óleo vermelho O.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ENSAIO DO GENE REPÓRTER

3.1.1 Cultura de Células

Células HeLA foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 2 nM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, em placas de 150 mm e mantidas por 24 horas a 37°C e com 5% de CO₂.

3.1.2 Plasmídeos

Para o ensaio de gene repórter, foram utilizados o plasmídeo de expressão do PPAR γ (LBD - PPAR γ /DBD-GAL4) e a construção contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo elemento responsivo do GAL4.

3.1.3 Procedimentos

Para investigar a atividade transcricional do PPAR γ , o DNA plasmidial contendo a construção LBD-PPAR γ /DBD-GAL4, que codifica a proteína quimérica contendo o domínio de ligação ao ligante do PPAR γ e o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição de leveduras GAL4, e o plasmídeo com o gene repórter da luciferase dirigido por 5 cópias do elemento responsivo do GAL4 foram co-transfectados em células HeLa, utilizando lipofectamina. A lipofectamina é uma formulação de moléculas lipídicas capazes de formar lipossomos em ambiente aquoso. E os lipossomos são vetores de transporte de genes, podendo permitir a sua expressão no meio intracelular.

Para investigação da atividade agonista nesse receptor nuclear, as células receberam tratamento com veículo DMSO (dimetil sulfóxido, controle negativo) e rosiglitazona a 10⁻⁵ M (ligantes conhecidos do PPAR γ , controle positivo) e naftaleno em

concentrações crescentes de 10^{-11} a 10^{-4} M, de forma a elaborar uma curva concentração-resposta. A detecção da atividade da luciferase foi realizada no luminômetro e o ensaio foi feito em triplicata.

Os resultados dos ensaios de gene repórter foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) da taxa de ativação da transcrição dos grupos tratados com ligantes (rosiglitazona ou naftaleno) em relação ao grupo tratado com veículo (controle negativo). Os resultados dos diferentes tratamentos foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls, com os programas *GraphPad Prism* versão 4.0 para Windows, *Systat* versão 12 e *Sigmaplot* versão 11. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

3.2 ADIPOGÊNESE EM CULTURA

3.2.1 Cultura de Células

Células 3T3-L1 (pré-adipócitos murinos) e C3H10T1/2 (células mesenquimais murinas) foram cultivadas em meio DMEM contendo 2 nM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e soro bovino neonatal a 10%, em placas de 150 mm e mantidas por 24 horas a 37°C e com 5% de CO₂. Ambas as linhagens celulares foram escolhidas devido ao seu potencial de diferenciação em adipócitos.

3.2.2 Ensaio de diferenciação de adipócitos

Os pré-adipócitos murinos 3T3-L1 e as células mesenquimais murinas C3H10T1/2 foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em meio DMEM contendo soro neonatal bovino a 10% até atingir a confluência. Dois dias depois, as células foram induzidas a se diferenciar em adipócitos em meio DMEM com soro fetal bovino a 10% contendo 1 μ M de dexametasona, 0,5 μ M de IBMX (isometilbutilxantina) e 1 μ g/mL de insulina por mais dois dias. A combinação dexametasona, IBMX e insulina

tem como objetivo induzir a adipogênese nas duas linhas celulares. A dexametasona é um agonista do GR (receptor glicocorticoide), um receptor envolvido na modulação dos fatores de transcrição; a IBMX é um inibidor da fosfodiesterase que aumenta a concentração de AMPc, envolvidos na regulação da expressão gênica e a insulina, por sua vez, pode contribuir para a diferenciação adipocitária. Em seguida, foram mantidas em meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10% (v/v) por 6 dias, com trocas periódicas do meio a cada 2 dias.

Por estarem em processo de diferenciação adipocitária, um segundo grupo de células 3T3-L1 foi induzido a se diferenciar em meio de cultura contendo soro fetal bovino a 10% e insulina em concentração mais elevada (10 µg/mL), durante 2 dias e mantidas a partir de então em meio contendo insulina 5 µg/mL. Também foram mantidas em meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10% por 6 dias, com trocas periódicas do meio a cada 2 dias.

Durante todo o período de cultivo, as células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (10^{-6} M e 1 µM) e naftaleno em concentrações diferentes (10^{-11} a 10^{-3} M, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM) e o experimento foi realizado em triplicata. Depois de 10 dias, as placas com as células foram lavadas com tampão PBS e fixadas com formaldeído 4% por 40 minutos. Após a fixação, as placas foram lavadas duas vezes com água destilada e mais duas vezes com tampão PBS. A seguir, as placas foram coradas com uma solução de óleo vermelho O, durante 60 minutos. Passado o período de 1 hora, as células foram lavadas com água corrente e fotografadas com magnificação de 20 e 10 vezes.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO NAFTALENO SOBRE O PPAR γ

Apesar de os DEs serem potencialmente capazes de interferir em qualquer via de sinalização do sistema endócrino, grande parte da informação disponível aborda sobre sua influência de receptores nucleares. Nesse contexto e buscando investigar o efeito obesogênico do naftaleno, foi investigado sua ação sobre a atividade transcricional do PPAR γ por meio do ensaio do gene repórter. A rosiglitazona, como esperado diante de sua atividade agonista no PPAR γ , induziu, de forma concentração-dependente, a atividade transcricional no receptor. O naftaleno, entretanto, não modificou de forma significativa a atividade transcricional do PPAR γ (Figura 4). Foi observada discreta redução da atividade do PPAR γ em resposta às concentrações crescentes do naftaleno, embora não significativa.

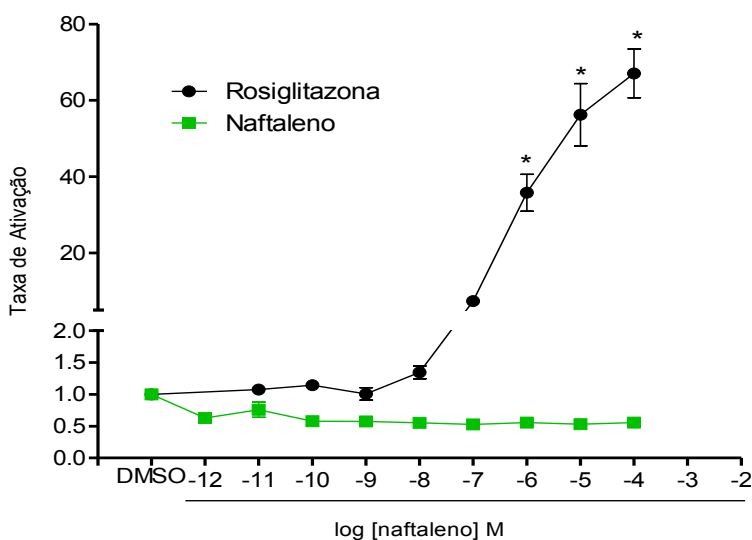


Figura 4: O naftaleno não apresenta atividade agonista em PPAR γ . Células HeLa foram co-transfectadas com a construção LBD-PPAR γ /DBD-GAL4 e o plasmídeo do gene repórter da luciferase dirigido pelo elemento responsivo do GAL4 e tratadas com concentrações crescentes de DMSO, rosiglitazona e naftaleno por 24 horas. Após o período, foram analisadas para detecção da atividade da luciferase. Dados expressos como média \pm EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo (DMSO), de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. *Significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo (DMSO), por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

4.2 EFEITO DO NAFTALENO SOBRE ADIPOGÊNESE EM CULTURA

Buscou-se também verificar se o naftaleno induzia diferenciação adipocitária em duas linhagens celulares: células mesenquimais murinas C3H10T1/2 e pré-adipócitos murinos 3T3L1 com meio completo contendo dexametasona, IBMX e insulina ou em pré-adipócitos 3T3-L1 com meio contendo apenas insulina. Assim como no ensaio do gene repórter, o DMSO e a rosiglitazona foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Não foi observado aumento do acúmulo lipídico intracelular, avaliado pela coloração com óleo vermelho O, nas células mesenquimais ou nos pré-adipócitos induzidos a se diferenciar com meio completo e tratados com naftaleno (Figuras 5 e 6). Observou-se um discreto aumento do acúmulo intracelular de lipídeos em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar com concentração elevada de insulina e tratados com naftaleno na concentração de 0,1 μM (Figura 7).

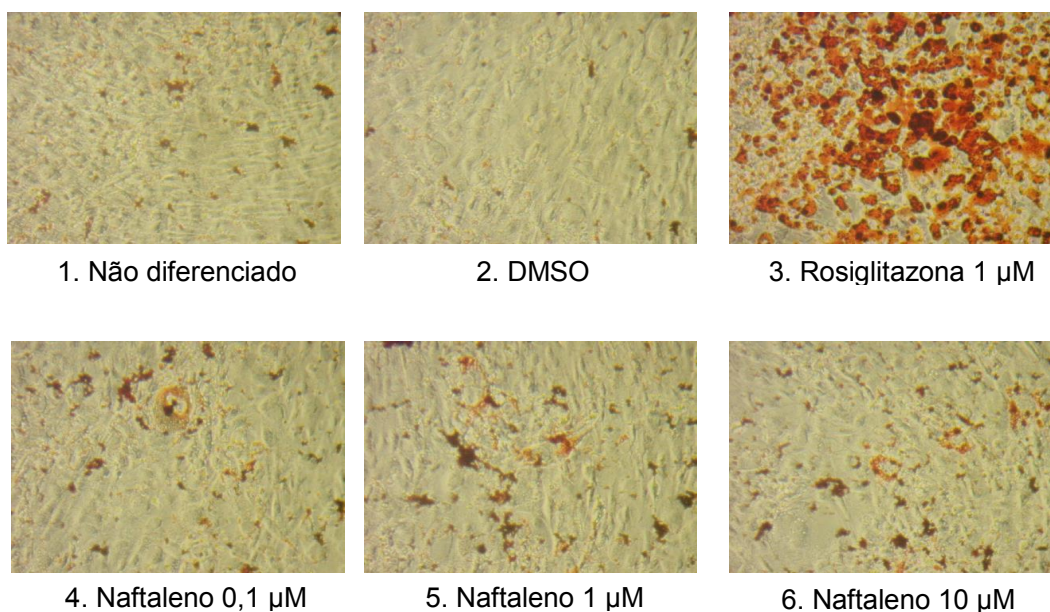
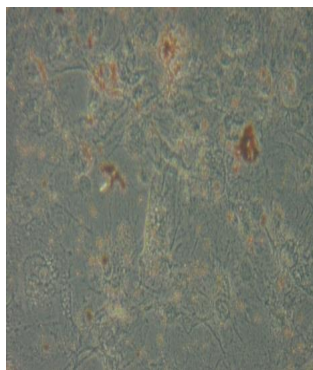
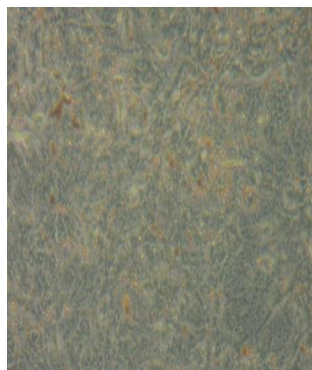


Figura 5: Ensaio de diferenciação de células mesenquimais C3H10T1/2 em meio contendo dexametasona, IBMX e insulina. As células foram induzidas a se diferenciar em meio contendo dexametasona, IBMX e insulina por dois dias e em seguida, foram mantidas em meio com DMEM por seis dias. Durante todo o período de cultivo, as células foram tratadas com DMSO, rosiglitazona e concentrações crescentes de naftaleno e o experimento foi feito em triplicata. Após 10 dias, foram coradas com óleo vermelho O e fotografadas por microscopia eletrônica. Não foi observado aumento do acúmulo lipídico intracelular em nenhuma das três concentrações de naftaleno.



1. Não diferenciado



2. DMSO

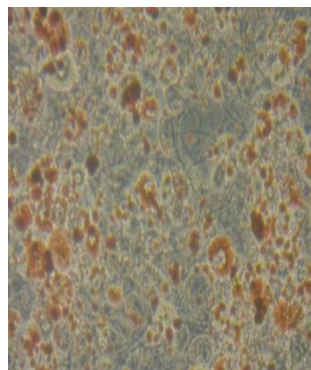
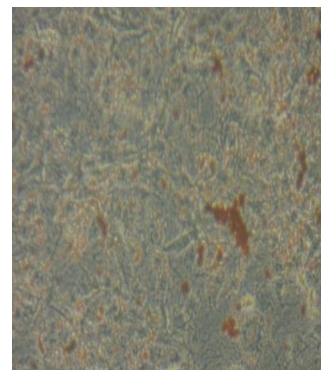
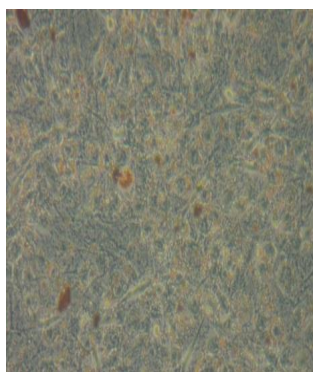
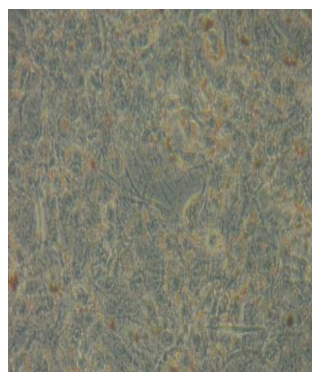
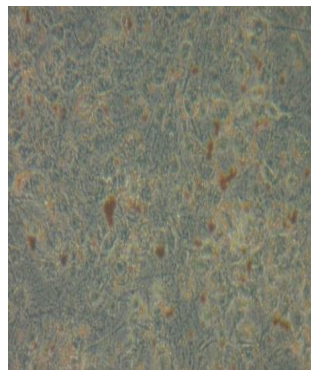
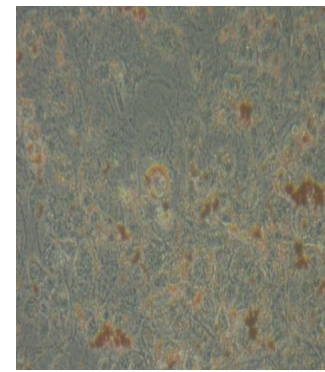
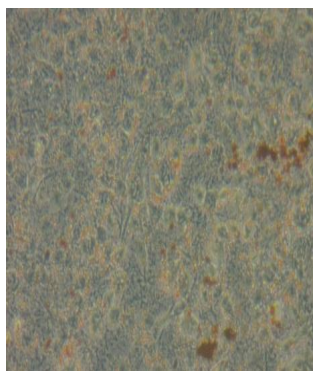
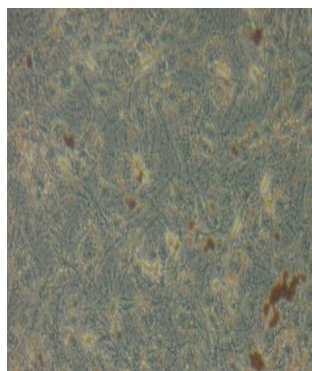
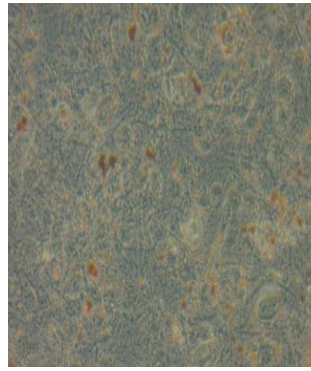
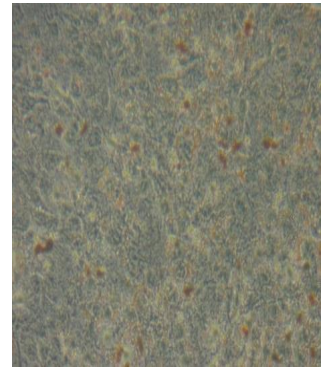
3. Rosiglitazona 10^{-6} M4. Naftaleno 10^{-11} M5. Naftaleno 10^{-10} M6. Naftaleno 10^{-9} M7. Naftaleno 10^{-8} M8. Naftaleno 10^{-7} M9. Naftaleno 10^{-6} M10. Naftaleno 10^{-5} M11. Naftaleno 10^{-4} M12. Naftaleno 10^{-3} M

Figura 6: Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 em meio contendo dexametasona, IBMX e insulina. As células foram induzidas a se diferenciar em meio contendo dexametasona, IBMX e insulina por dois dias e em seguida, foram mantidas em meio com DMEM por seis dias. Durante todo o período de cultivo, as células foram tratadas com DMSO, rosiglitazona e concentrações crescentes de naftaleno e o experimento foi feito em triplicata. Após 10 dias, foram coradas com óleo vermelho O e fotografadas por microscopia eletrônica. Não foi observado aumento do acúmulo lipídico intracelular em nenhuma das concentrações de naftaleno.

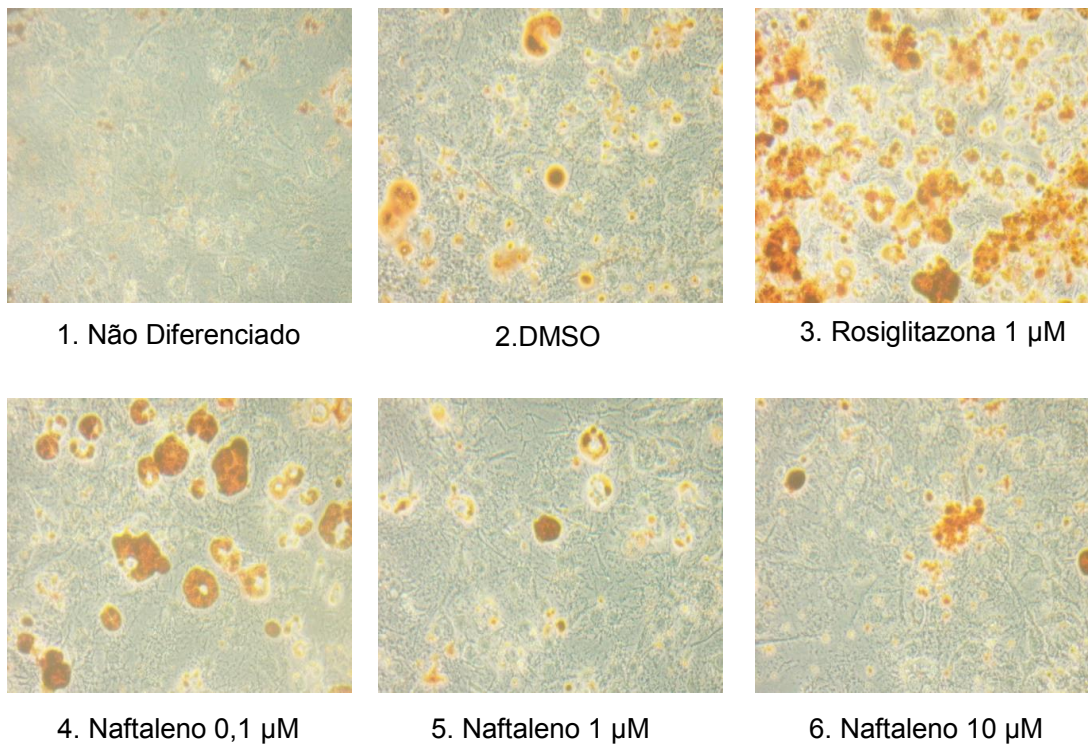


Figura 7: Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 em meio contendo apenas insulina. As células foram induzidas a se diferenciar em meio contendo insulina em concentração mais elevada (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 2 dias e mantidas a partir de então em meio contendo insulina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida, foram mantidas em meio com DMEM por seis dias. Durante todo o período de cultivo, as células foram tratadas com DMSO, rosiglitazona e concentrações crescentes de naftaleno e o experimento foi feito em triplicata. Após 10 dias, foram coradas com óleo vermelho O e fotografadas por microscopia eletrônica. Houve um acúmulo intracelular de lipídeos na concentração de 0,1 μM de naftaleno.

5 DISCUSSÃO

Os compostos do tipo DE podem ser definidos como agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, o metabolismo, a ação de ligação, ou eliminação de hormônios endógenos que regulam a homeostase, reprodução e processo de desenvolvimento (Kandarakis et al. 2009). Suas fontes de contato vão desde a inalação de partículas no ar até o transporte transplacentário e a exposição a essa classe de substâncias só vem aumentando nas últimas décadas. Concomitantemente a esse crescimento, casos de obesidades vem disparando ao redor do mundo, afetando cerca de 8% da população mundial adulta e 6% da população mundial infantil (OMS, 2015), sendo considerado como um grave problema de saúde pública. Assim, no presente estudo procurou-se verificar se há uma relação entre o naftaleno, um desregulador do tipo policíclico aromático comumente presente em repelentes de insetos e cigarro, e desenvolvimento de obesidade por meio de dois ensaios: ensaio do gene repórter e adipogênese em cultura de células.

No ensaio do gene repórter, o naftaleno foi investigado quanto à sua capacidade de ativar o PPAR γ , fator de transcrição envolvido no processo de adipogênese. Para isso, células HeLa foram co-transfectadas com o vetor quimérico contendo o LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e um plasmídeo contendo a sequência do repórter luciferase. O fator de transcrição GAL é exclusivo de leveduras e, assim, não é ativado por receptores endógenos de células de mamíferos. Dessa forma, permitiu avaliar o efeito de compostos teste sobre o LBD do PPAR γ isoladamente. Para investigação da capacidade agonista do DE, as células foram tratadas com DMSO, roziglitazona e concentrações crescentes de naftaleno. O naftaleno foi testado até a concentração máxima em que não comprometia a viabilidade celular e, como resultado, não apresentou atividade agonista no PPAR γ . Para explorar mais o efeito do naftaleno, futuros estudos serão necessários com outros receptores nucleares envolvidos na adipogênese, como, por exemplo, proteínas ligantes ao amplificador CCAAT

(CCAAT/enhancer binding proteins - C/EBPs), cujas proteínas C/EBP β e C/EBP δ são ativadas durante as primeiras fases de diferenciação de adipócitos. Além disso, o PPAR γ regula não somente a adipogênese, como também o metabolismo lipídico, inflamação e aterogênese e possui a identidade de seus ligantes biológicos desconhecida, requerendo uma investigação intensa para melhor entendimento do receptor (Queiroz et al. 2009).

A atividade do naftaleno também foi avaliada em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 e células mesenquimais C3H10T1/2 induzidos a se diferenciar em meio completo contendo dexametasona, IBMX e insulina. O objetivo foi verificar o acúmulo de gordura nessas duas linhagens celulares sob estímulo de um coquetel adipogênico. Esse coquetel completo representa um potente estímulo para a indução da adipogênese em cultura. Assim, compostos com potencial adipogênico fraco podem não ter seu efeito facilmente observado. Como o naftaleno não ativou a diferenciação adipocitária nem em pré-adipócitos murinos e em células mesenquimais, os pré-adipócitos foram induzidos a diferenciar-se de forma menos potente, com a utilização apenas de um meio com insulina a 10 $\mu\text{g/mL}$ e mantidos em meio contendo insulina a 5 $\mu\text{g/mL}$. Então, apenas na concentração de 0,1 μM de naftaleno é que se verificou um acúmulo de lipídeos. Para caracterizar melhor o efeito adipogênico, futuros estudos com células não imortalizadas devem ser feitos, como, por exemplo, em células do estroma vascular do tecido adiposo, que representariam um contexto mais fisiológico de adipogênese. Além disso, mecanismos obesogênicos distintos do naftaleno, não envolvendo a adipogênese, também devem ser investigados, como por exemplo, o RXR (receptor retinoide X) e os receptores de hormônios esteroidais sexuais (receptores andrógenos e estrogênios), os quais estão envolvidos no desenvolvimento do tecido adiposo e os receptores de neurotransmissores que são ativados por determinadas classes de medicamentos (antipsicóticos e antidepressivos), pois indivíduos com esquizofrenia, transtorno bipolar ou depressão apresentam o risco de desenvolver síndromes metabólicas incluindo diabetes, hipertensão arterial, dislipidemias e obesidade (Grün e Blumberg, 2009).

6 CONCLUSÃO

Não foi observado efeito do hidrocarboneto policíclico naftaleno sobre a atividade transcricional do PPAR γ , por ensaio do gene repórter. Sobre o ensaio de diferenciação de adipócitos, o naftaleno não induziu o acúmulo de lipídeos nas células mesenquimais C3H10T1/2 ou nos pré-adipócitos murinos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em meio completo contendo dexametasona, IBMX e insulina, porém apresentou efeito adipogênico discreto em células 3T3-L1 induzidas a se diferenciar com meio incompleto, contendo apenas insulina.

Futuros estudos a respeito do naftaleno serão necessários para melhor compreensão dos seus efeitos como desregulador endócrino.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GREENBERG, A. S; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, n. 2, p. 461S-465S, Fev. 2006.
2. NGUYEN, D. M; EL-SERAG, H. B. The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 39, n. 1, p. 1-7, Mar. 2009.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 06 de Fev.2016.
4. VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. Ministério da Saúde, Brasil, Abr. 2014.
5. CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annual Review of Physiology*, v. 73, p. 135-162, 2011.
6. RUNDLE, A.; HOEPNER, L.; HASSOUN, A. et al. Association of Childhood Obesity With Maternal Exposure to Ambient Air Polycyclic Aromatic Hydrocarbons During Pregnancy. *American Journal of Epidemiology*, v. 175, n. 11, p. 1163-1172, Abr. 2012.
7. KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.; GIUDICE, L. C. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, Maryland, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

8. FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, Fortaleza, v. 54, n. 1, p. 6-11, 2010.
9. YANG, O; KIM, H. L.; WEON, J. et al. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *Journal of Cancer Prevention*, v. 20, n. 1, p. 12-24, Mar. 2015.
10. BILA, D. M; DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 651-666, Fev. 2007.
11. HEINDEL, J. J; NEWBOLD, R.; SCHUG, T. T. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 11, n. 11, p. 653-661, Set. 2015.
12. SWEDENBORG, E.; RÜEGG, J.; MÄKELÄ, S. et al. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 43, p. 1-10, 2009.
13. HART, S. M. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biological Research*, Santiago, v. 35, n. 2, p. 295-303, 2002.
14. KROKER, A. J; BRUNING, J. B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. *PPAR Research*, Adelaide, v. 2015, Ago. 2015.
15. LIZCANO, F.; VARGAS, D. Diverse coactivator recruitment through differential PPAR γ nuclear receptor agonism. *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, n.1, p. 134-139, 2013.

16. RANJBAR, M.; ROTONDI, M. A.; ARDERN, C. I. et al. Urinary Biomarkers of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Are Associated with Cardiometabolic Health Risk. *PLoS One*, Ontario, v. 10, n. 9, p. 1-10, Set. 2015.
17. PEIFFER, J.; COSNIER, F.; GROVA, N. et al. Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure (14 days) to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats. *PLoS One*, v. 8, p. e71413, Ago. 2013.
18. PREUSS, R.; ANGERER, J.; DREXLER, H. Naphthalene: an environmental and occupational toxicant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 76, n. 8, p. 556-76, 2003.
19. SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, India, v. 20, n. 6, p. 243-248, Abr. 2002.
20. QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, São Paulo, v.53, n.5, p.582-594, Jun. 2009.
21. GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupters as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.305, p. 19-29, Mai. 2009.