

Leontina Cumbelembe Tomás Manuel

**Influência do zinco nos processos da adipogênese e nos mecanismos fisiopatológicos da reversão da obesidade**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Branco Filippin Monteiro.

Florianópolis  
2016



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
Através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.

Manuel, Leontina Cumbelembe Tomás  
Influência do zinco nos processos da adipogênese e nos  
mecanismos fisiopatológicos da reversão da obesidade / Leontina  
Cumbelembe Tomás Manuel ; orientadora, Fabíola Branco Filippin  
Monteiro - Florianópolis, SC, 2016.  
109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação  
em Farmácia. Inclui referências

1. Farmácia. 2. Obesidade. 3. Adipogênese e zinco. 4. Indução  
de obesidade. 5. Sobrecarga de carboidratos e zinco. I. Monteiro,  
Fabíola Branco Filippin. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.



Leontina Cumbelembe Tomás Manuel

**Influência do zinco nos processos da adipogênese e nos mecanismos fisiopatológicos da reversão da obesidade**

Esta dissertação foi justificada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Florianópolis, 04 de Março de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz CreczynskiPasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Fabíola Branco Filippin Monteiro  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Beatriz Garcia Mendes Borba  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Emilia Machado Moreira  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Dedico este trabalho a minha família, principalmente a minha mãe Adelaide Tomás Manuel e o meu irmão Manuel Chibungo Tiago, que mesmo estando longe, lutaram junto comigo para que este trabalho se realizasse.

A minha orientadora Fabíola Branco Filippin Monteiro pela paciência e dedicação.





## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a DEUS por estar presente em cada etapa das nossas vidas nos dando saúde, sabedoria e por me dar a oportunidade de conhecer pessoas que me fizeram crescer a cada dia.

A minha mãe Adelaide Tomás Manuel, por ser o exemplo da minha vida pessoal e acadêmica. Aos meus irmãos Aldina Adelaide Nahunjo Canhina, Manuel Chimbungo Tiago e Memória Tiago Manuel, por me incentivarem e me apoiarem, pois este apoio me renova a cada dia para continuar a buscar os meus sonhos acadêmicos.

A minha orientadora Fabíola Branco Filippin Monteiro por ter me aceitado como orientanda, pelo carinho, atenção e paciência. Obrigada por compartilhar comigo o seu conhecimento, que eu considero uma das coisas mais valiosas que um ser humano adquire ao decorrer da vida.

A professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, coordenadora do programa de pós-graduação em Farmácia, por ter me recebido e me acolhido no seu laboratório. Obrigada pelo voto de confiança.

A Iara Fabrícia Kretzer que também compartilho comigo o seu conhecimento e que me ajudou nos experimentos. Obrigada por estar a disposição quando eu precisei, pelo carinho, pelo incentivo e pelos conselhos que não foram poucos.

A Laura, Bianca e Anne, a turma do *in vivo*. Obrigada pelo carinho e pela ajuda nos experimentos, principalmente a Bianca que trabalhou comigo diretamente nestes experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, pelo carinho, o acolhimento, a paciência, pelos momentos de descontração. Pessoas que nunca esquecerei: Alex, Dai, Júlia, Evelyn, Nádia, Adny, Heló, Jelver, Michele, Leônidas, Jefferson, Tatiane, Gabriela, Debora, Letícia, Barbara, Fernanda, Maria Fernanda, Milene, Najla, Vera, Marjore e Dona Ivonete, muito obrigada.

A todos do laboratório de imunobiologia do Tecido Adiposo (LAITA), Laboratório de Pesquisas em imunologia (LAPI) e Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA) que nos cederam espaço para realizarmos os nossos experimentos.

Ao meu primo/irmão Pedro Pacheco Manuel, os meus primos Vilma Filipe, Ernesto Muhongo Adriano, Ana Celeste Adriano e Tchali Saculanda.

Aos meus amigos e companheiros Antônio Chissoca, Domingos Samanjata, Leopoldo Marino, Adriana Cardoso, Hélia Buble, Creúcio Kizua, Júlia Gonzaga, Patrícia Tavares e Kiti Carvalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Instituto Superior Politécnico do Huambo, por permitirem me tornar mestre.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas de o primeiro passo”.

Martin Luther King Jr.



## RESUMO

Indivíduos obesos apresentam concentrações alteradas de diversos minerais essenciais para o metabolismo, tal como o zinco, que atua em várias atividades catalíticas de diversas enzimas, além de atuar no processo adipogênico. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a influência do zinco nos processos de proliferação e diferenciação celulares, e *in vivo* o metabolismo de carboidratos. Nos ensaios *in vitro*, utilizou-se pré-adipócitos para análise da proliferação e diferenciação celular, na ausência e na presença do zinco. *In vivo*, utilizou-se camundongos que receberam dieta normolipídica (grupo controle), ou dieta hiperlipídica (grupo obeso) por 3 meses. Após este período, o grupo controle e o grupo obeso foram subdivididos para receberem sobrecarga de carboidratos na presença e ausência de zinco (grupo controle com zinco, grupo controle sem zinco, grupo obeso com zinco e grupo obeso sem zinco). Como resultados observou-se uma progressão do ciclo celular caracterizada pela fase S, bem como maior diferenciação, apresentando um aumento no conteúdo de triacilgliceróis intracelulares na presença de 2 µg/mL e 4 µg/mL de zinco. *In vivo*, observou-se que na fase de sobrecarga de carboidrato, ocorreu uma variação da massa corpórea no 10º dia, entre o grupo os grupos com e sem zinco do grupo controle e no 24º dia nos grupos com e sem zinco do grupo obeso. A adiponectina foi inferior no grupo controle sem zinco e a leptina foi superior, quando comparado com o grupo controle com zinco. Diante do exposto, conclui-se que o zinco promoveu o aumento da proliferação e da diferenciação celular, bem como melhorou os fatores relacionados ao metabolismo de carboidratos.

**Palavras-chave:** Obesidade. Adipogênese e zinco. Indução de obesidade. Sobrecarga de carboidratos e zinco.

## ABSTRACT

Obese individuals have altered concentrations of several essential minerals for metabolism, such as zinc, which operates in various catalytic activities of several enzymes, besides acting in the adipogenic process. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in vitro* the influence of zinc on proliferation and cell differentiation, and *in vivo* metabolism of carbohydrates. *In vitro* testing was used for the analysis pre-adipocyte proliferation and cell differentiation in the absence and presence of zinc. *In vivo*, we used mice that received normolipid diet (control group) or high-fat diet (obese group) for 3 months. After this period, the control group and the obese group were subdivided to receive carbohydrate overload in the presence and absence of zinc (control group with zinc, control group without zinc, obese group with zinc and obese group without zinc). As a result there was been a progression of the cell cycle characterized by the S phase, and greater differentiation, an increase the content of intracellular triglyceride in the presence of zinc 2 µg/mL and 4 µg/mL zinc. *In vivo*, it was found that the carbohydrate loading phase, there was a body mass variation on the 10th day, between control group with and without zinc and on the 24th day in the obese group with and without zinc. Adiponectin was lower in the control group without zinc and leptin was higher when compared to the control group with zinc. Given the above, it is concluded that zinc promoted the increased proliferation and cell differentiation and improved the factors related to carbohydrate metabolism.

**Keywords:** Obesity. Adipogenesis and zinc. Induction of obesity. Carbohydrate overload and zinc.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalência da obesidade no Mundo de ambos os sexos.....	27
<b>Figura 2.</b> Tecido adiposo com seus constituintes.....	32
<b>Figura 3.</b> Receptor de insulina e translocação da vesícula de transportadores de glicose (GLUT4).....	39
<b>Figura 4.</b> Imagens das rações. (A) Ração normolipídica; (B) Ração Hiperlipídica; (C) Ração hiperglicídica e deficiente de zinco.....	55
<b>Figura 5.</b> Fluxograma do experimento <i>in vivo</i> .....	58
<b>Figura 6.</b> Redução do zinco nos soros CS e SFB. Incubação sob agitação a 4°C, por 24h (n=1, lote único). SC: soro controle; CS: <i>calf serum</i> ; CS+CH: <i>calf serum</i> em resina; SFB: soro fetal bovino; SFB+CH: soro fetal bovino em resina. Concentração do SC segundo o fabricante: 198µg/dL.....	61
<b>Figura 7.</b> Viabilidade celular de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1. (A) Viabilidade celular com azul de trypan, após 24h de tratamento (n=2); (B) Fotomicrografias de fluorescência da análise morfológica de dupla coloração com laranja de acridina e brometo de etídio, após tratamento de 24h (n=1) (200x). A coloração verde é de células viáveis. Comparações entre as células controle e as células tratadas. <i>One-way</i> ANOVA.....	63
<b>Figura 8.</b> Análise do ciclo celular de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1, após tratamento de 24h (n=3). (A) Porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular; (B) Histogramas representativos da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. Comparações entre as células controle e as células tratadas em cada fase. <i>Two-way</i> ANOVA. *** p<0,001.....	65
<b>Figura 9.</b> Diferenciação celular de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 em adipócitos maduros e coloração dos triacilgliceróis intracelulares em vermelho com <i>Oil Red O</i> (n = 2). (A) Representação da absorbância dos eluatos celulares provenientes do triacilglicerol corado. (B) Fotomicrografias das células maduras ricas em triacilglicerol intracelular corados em vermelho (200x). Comparações entre as células controle e as células tratadas. <i>One-way</i> ANOVA. *p < 0,05, ** p < 0,01.....	67



**Figura 10.** Avaliação da massa corpórea, do índice de Lee e consumo de ração dos camundongos do grupo controle (GC, n = 20) e do grupo obeso (GO, n = 19). (A) Variação da massa corpórea dos grupos GC e GO que consumiram uma dieta normolipídica e hiperlipídica, respectivamente. *Two-way* ANOVA; (B) Fotografia representativa de camundongos representando os grupos GC (cauda em vermelho) e GO (cauda em verde); (C) Índice de Lee por semana. *Two-way* ANOVA; (D) Índice de Lee do último dia. *One-way* ANOVA; (E) consumo de ração. Test *t*; (F) Consumo individual de ração. Test *t*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ .....69

**Figura 11.** Parâmetros hematológicos dos camundongos do grupo controle (n = 17) e do grupo obeso (n = 12). (A) leucócitos; (B) plaquetas; (C) hemácias; (D) hemoglobina; (E) hematócrito. Test *t*.....71

**Figura 12.** Parâmetros bioquímicos dos camundongos do grupo controle (n = 11) e do grupo obeso (n = 14). (A) colesterol; (B) triglicérides; (C) glicose; (D) HDL – colesterol; (E) LDL – colesterol; (F) Ureia; (G) AST; (H) ALT. Test *t*. \*  $p < 0,05$ .....72

**Figura 13.** Concentração de adiponectina, leptina e insulina dos camundongos do grupo controle (n = 7) e grupo obeso (n = 7). (A) Concentração de adiponectina; (B) concentração de leptina; (C) concentração de insulina. Test *t*. \*\*\*  $p < 0,001$ .....74

**Figura 14.** Massa do tecido adiposo visceral dos camundongos do grupo controle (n= 4) e do grupo obeso (n= 5). Test *t*. \*\*  $p < 0,01$ .....75

**Figura 15.** Avaliação do volume de massa corpórea dos camundongos do grupo controle com zinco (n = 9) e do grupo controle sem zinco (n = 9), e do grupo obeso com zinco (n = 9) e do grupo obeso sem zinco (n = 9). (A) Variação de massa corpórea do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco. *Two-way* ANOVA; (B) Fotografia representativa dos camundongos do grupo controle com zinco (cauda em verde) e do grupo controle sem zinco (cauda em vermelho); (C) Variação de massa corpórea do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. *Two-way* ANOVA; (D) Fotografia representativa dos camundongos do grupo obeso com zinco (cauda em verde) e do

grupo obeso sem zinco (cauda em vermelho). \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ .....76

**Figura 16.** Avaliação do índice de Lee dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 9$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 9$ ). (A) Índice de Lee por semana do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco. *Two-way* ANOVA; (B) Índice de Lee do último dia de experimento do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco. Test *t*; (C) Índice de Lee por semana do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. *Two-way* ANOVA; (D) Índice de Lee do último dia de experimento do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. Test *t*.....78

**Figura 17.** Avaliação do consumo de ração dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 9$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 9$ ). (A) Consumo de ração do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (B) Consumo individual de ração do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (C) consumo de ração do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco; (D) Consumo individual de ração do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem. Test *t*.....79

**Figura 18.** Parâmetros hematológicos dos camundongos do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco, e do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. (A) leucócitos; (B) plaquetas; (C) hemácias; (D) hemoglobina; (E) hematócrito. *One-way* ANOVA.....80

**Figura 19.** Parâmetros bioquímicos dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 2$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 2$ ). (A) colesterol; (B) triglicerídeos; (C) glicose; (D) Ureia; (E) AST; (F) ALT. *One-way* ANOVA.....83

**Figura 20.** Concentração da adiponectina, leptina e insulina dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 2$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 2$ ). (A) Concentração de adiponectina; (B) Concentração de leptina; (C) Concentração de

insulina. Test  $t$ . \*  $p < 0,05$ .....86

**Figura 21.** Volume da massa do tecido adiposo e do fígado dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 2$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 2$ ). (A) Volume da massa do tecido adiposo do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (B) Volume da massa do fígado do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (C) Volume da massa do tecido adiposo do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco; (D) Volume da massa do fígado do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. Test  $t$ .....88



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Necessidades nutricionais para roedores. Instituto Americano de Nutrição (AIN-93).....	50
<b>Tabela 2.</b> Formulação da dieta AIN-93G para crescimento e da dieta AIN-93M para mantimento de roedores adultos....	51
<b>Tabela 3.</b> Composição das dietas normolipídica com zinco, hiperlipídica com zinco e hiperglicídica sem zinco.....	54
<b>Tabela 4.</b> Composição do Mix de vitaminas AIN – 76A da RHOSTER. Concentração de garantia por Kg do produto..	56
<b>Tabela 5.</b> Composição do Mix de Minerais AIN – 93G da RHOSTER. Concentração de garantia por Kg do produto..	57



## LISTA DE ABREVIATURA

AIN – American Institute of Nutrition  
ALT – Alanina aminotransferase  
AST – Aspartato aminotransferase  
C/EBP – CCAAT - enhancer-binding protein  
CS – *calf serum*  
DEX – Dexametasona  
DMEM – Dulbecco's modified Eagle's  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
ELISA – Enzyme Linked immunosorbnt assay  
GC – Grupo controle  
GCCZ – Grupo controle com zinco  
GCSZ – Grupo controle sem zinco  
GO – Grupo obeso  
GOCZ – Grupo obeso com zinco  
GOSZ – Grupo obeso sem zino  
GLUT- 4 – Receptro de glicose tipo 4  
HDL – Lipoproteína de alta dencidade  
IBMX – Isobutilmetilxantina  
IGF-1 – Insulin-like growth forctor 1  
IL- 6 – Interleucina 6  
IMC – Índice de massa corporal  
IRS – Substrato do receptor de insulina  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
M1 – Macrófagos classicamente ativados  
M2 – Macrófagos residentes  
MCP-1 – Monocyte chemoattractant protein-1  
MDI – Meio de diferenciação  
PPAR $\gamma$  – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
SAA – Amilóide sérica A  
SFB – Soro fetal bovino  
TA – Tecido adiposo  
TAB – Tecido adiposo branco  
TAM – Tecido adiposo marrom  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
2.1 Tecido adiposo.....	31
2.2 Obesidade.....	35
2.3 Zinco.....	36
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Reagentes.....	43
4.2 Cultura celular.....	43
4.3 Tratamento celular.....	44
4.3.1 Remoção do zinco no soro de cultura celular.....	44
4.3.2 Determinação colorimétrica de zinco do soro de cultura celular.....	45
4.4 Viabilidade celular – ensaio com azul de tripan.....	45
4.5 Análise do ciclo celular.....	45
4.6 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídi...46	
4.7 Diferenciação celular da linhagem 3T3-L1.....	47
4.8 Coloração com <i>Oil Red O</i> .....	47
4.9 Ensaio <i>in vivo</i> .....	48
4.9.1 Validação do modelo de indução da obesidade.....	52
4.9.2 Sobrecarga de carboidratos em animais obesos e não obesos na presença e ausência de zinco.....	52
4.9.3 Avaliação do perfil hematológico e bioquímico.....	59
4.9.4 Avaliação da concentração de insulina, leptina e adiponectina.....	59
4.9.5 Necrópsia e coleta de órgãos.....	59
4.10 Análise estatística.....	60
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
5.1 Resultados <i>in vitro</i> .....	61
5.1.1 Remoção do zinco no soro.....	61
5.1.2 Viabilidade celular com azul de tripan e coloração com laranja de acridina e brometo de etídi.....	61
5.1.3 Análise do ciclo celular.....	63
5.1.4 Diferenciação celular e coloração com <i>Oil Red O</i> .....	66

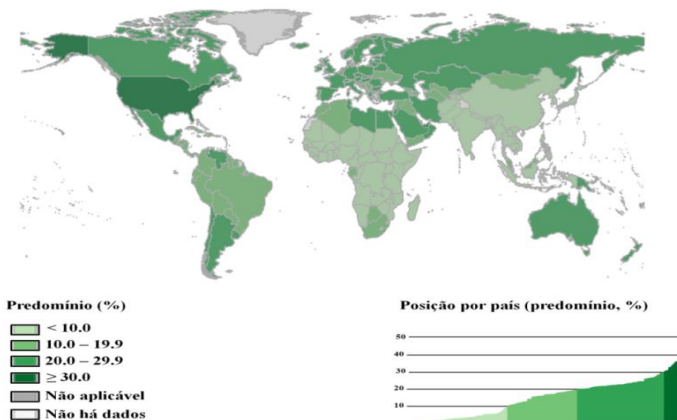
5.2 Resultados <i>in vivo</i> .....	68
5.2.1 Fase de indução de obesidade.....	68
5.2.2 Fase de sobrecarga de carboidrato nos grupo controle e grupo obeso.....	75
<b>6. DISCUÇÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>106</b>
Anexo A. Carta de aprovação do Comitê de Ética da UFSC.....	106
Anexo B. Curvas de calibração da adiponectina, leptina e insulina.....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é provavelmente o distúrbio metabólico mais antigo, pois existem relatos em múmias egípcias e esculturas gregas, como a escultura Vênus de Willendorf, do período Paleolítico (20.000 até 30.000 a.C.) (BLUMENKRANTZ, 1997 apud ERDMAN, 2006; CAMARGOS, 2009).

A séculos atrás, a população sofreu com a escassez de alimentos, doenças e um ambiente precário. Então, as pessoas que tinham excesso de peso e depósitos exagerados de gordura, eram consideradas saudáveis e prósperas. Por isso, a obesidade era considerada “perfil de beleza”. Com a revolução industrial, o padrão de vida se tornou cada vez mais sedentário. Isso levou a um superávit calórico, favorecendo assim, a obesidade, principalmente em indivíduos predispostos geneticamente (Figura 1) (REPETTO, RIZZOLLI & BONATTO, 2003).

**Figura 1.** Prevalência da obesidade no Mundo em ambos os sexos.



Fonte: adaptação de [http://gamapserver.who.int/gho/interactive\\_charts/ncd/risk\\_factors/obesity/atlas.html](http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/obesity/atlas.html)

Atualmente, o sobrepeso e a obesidade é conhecido como uma das principais ameaças à saúde da população mundial, tornando-se assim, um problema de saúde pública. (CABALLERO, 2007; KANTER & CABALLERO, 2012). De 1980 a 2008, a prevalência mundial de obesidade praticamente duplicou. Em 2008 mais de 1 bilhão de adultos acima de 20 anos apresentaram sobrepeso, e destes 10% dos homens e 14% das mulheres eram obesos. Segundo um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2014, em todo o mundo, 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano em consequência de doenças associadas ao sobrepeso ou obesidade. Essa doença não afeta somente os países desenvolvidos, mas também países em desenvolvimento, onde se estima que mais de 115 milhões de pessoas sofram de problemas relacionados com a obesidade (WHO, 2014).

Em 2013 cerca de 42 milhões de crianças pré-escolares estavam acima do peso. Tal problema se tornou um dos desafios mais graves de saúde pública do século 21, pois crianças acima do peso tendem a se tornar adultos obesos, e são mais propensas a desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares em uma idade mais jovem, que por sua vez estão associados a uma maior chance de morte prematura e incapacidade (WHO, 2014).

No Brasil em 2014 52,5% de adultos apresentaram sobrepeso, onde 56,5% são homens e 49,1% são mulheres. E neste mesmo ano, 17,9% de adultos eram obesos, onde 17,6% são homens e 18,2% são mulheres (VIGITEL, 2014).

O sobrepeso e a obesidade são definidos de acordo ao índice de massa corporal (IMC), que é a divisão do peso, medido em quilogramas, pela altura ao quadrado, medido em metros. O sobrepeso é diagnosticado quando o IMC for  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>, e a obesidade quando o IMC for  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> (WHO, 2015).

O sobrepeso e a obesidade são caracterizados pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo

que prejudica a saúde. São fundamentalmente causados pelo desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas (WHO, 2015).

O aumento do IMC é um fator de risco para outras doenças como, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus do tipo II e alguns tipos de câncer (WHO, 2015). E também, os pacientes com obesidade demonstram alteração na concentração plasmática de vários micronutrientes como o zinco (FEITOSA, LIMA, MARREIRO, 2012; LEÃO, SANTOS, 2012).

O zinco é um dos minerais de maior importância para o metabolismo do organismo humano. É co-fator de mais de 300 metaloenzimas, está envolvido na regulação endócrina, produção de citocinas, desenvolvimento do tecido conjuntivo, ossos e dentes, no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, na adipogênese, entre outras funções. O mecanismo de ação do zinco na adipogênese é semelhante a ação da insulina, que estimula a atividade do receptor de insulina tirosina cinase e estimula a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana celular para captar glicose (MAFRA, COZZOLINO, 2004; CRUZ E SOARES, 2011; SOLOMONS, 2013). A deficiência deste mineral pode acarretar na desregulação dos processos em que está envolvido.

Para conhecer melhor a obesidade e os processos alterados provocados por esta doença, o processo de adipogênese tem sido muito estudado por pesquisadores por meio de ensaios *in vitro* onde utilizam pré-adipócitos provenientes de embriões murinos modelo fiel para caracterizar este processo, e experimentos *in vivo* com modelos animais de obesidade, onde a dieta tem uma papel fundamental para indução de obesidade em modelos (SOUZA, 1999; FONSECA-ALANIZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2009; CAMPOS, 2009; WHITE et al., 2013; SANTOS, 2013)

Essas diferentes complicações clínicas apresentadas pelos pacientes obesos, entre estas a deficiência de zinco, visto que este mineral tem uma importância crítica no

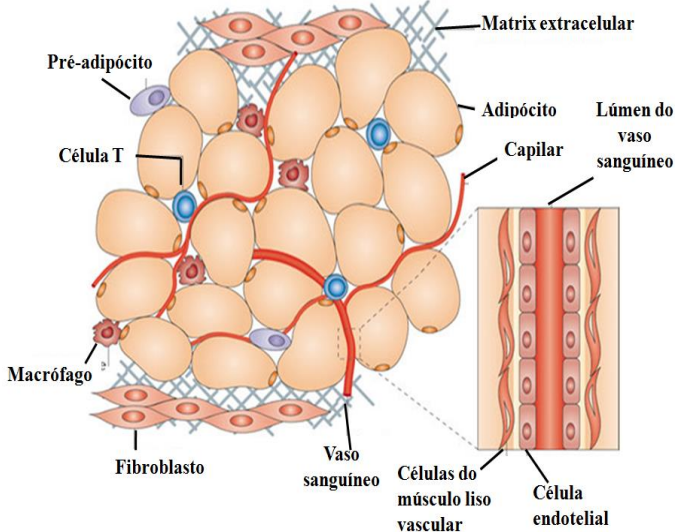
metabolismo, nos leva a pesquisar o papel do zinco na adipogênese e o que ocorre neste processo na deficiência de zinco.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo (TA) é um órgão endócrino que desempenha multifunções fisiológicas importantes. É composto por adipócitos, pré-adipócitos, matriz extracelular, macrófagos, células T, fibroblastos, vasos sanguíneos e capilares (Figura 2) (SANTOS & TORRENT, 2010; OUCHIN, 2011).

**Figura 2.** Tecido adiposo com seus constituintes.



**Fonte:** Adaptada de Ouchin, N. et al., 2011

Nos mamíferos existem dois tipos distintos de TA, o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB). O TAM tem a função de produzir calor e regular a temperatura corporal. Encontra-se principalmente em recém-nascidos, em torno do ombro com elevada atividade

metabólica. Nos adultos é encontrado em pequenas quantidades, próximo ao pescoço e na parte superior do tórax, apresentando-se metabolicamente ativo (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; FARMER, 2009; MOSRTI, REGASSA & KIM, 2016). Por outro lado, o TAB abrange a região subcutânea e visceral. É responsável por armazenar lipídeos em situação de alta disponibilidade de nutrientes, preservar a temperatura corporal, pelas funções endócrinas caracterizadas pela produção e secreção de hormônios. Os seus adipócitos armazenam os triacilgliceróis em forma de gota grande e única, deslocando o núcleo para a região periférica (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

O TAB também pode ser denominado conforme a sua localização, como subcutâneo ou visceral. O subcutâneo é aquele que compreende os depósitos de gordura situados abaixo da pele, nas regiões abdominal, glútea e femural. O visceral compreende o depósito de gordura encontrado próximo ou junto ao interior dos órgãos da cavidade abdominal (SANTOS & TORRENT, 2010).

Adipogênese é o processo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros ricos em triacilgliceróis, altamente controlados (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Os pré-adipócitos são derivadas de células-tronco pluripotentes que dão origem a células precursoras mesenquimais com capacidade de se diferenciar em várias células como, mioblastos, condroblastos, osteoblastos e adipócitos. Mediante os eventos moleculares específicos, as células precursoras mesenquimais se diferenciam em pré-adipócitos que na presença de fatores de transcrição adipogênicos (PPAR $\gamma$ , a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteroide (SREBP-1c) e as C/EBP) se diferenciam em adipócitos (GREGOIRE, SMAS & SUL, 1998; FARMER, 2006).

Os adipócitos são células maduras do TA (principais constituintes), que se caracterizam por serem as únicas células adaptadas para armazenar lipídeos e metabolizá-los sem comprometer a sua integridade funcional, além de serem capazes de sintetizar Triacilglicerol e oxidar ácidos graxos



para obtenção de energia (WAJCHENBERG, 2000). Os adipócitos apresentam propriedades semelhantes às células do sistema imune, pois produzem mediadores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e ativam o sistema complemento. Além disso, assim como os macrófagos, os pré-adipócitos desempenham funções de fagocitose (SANTOS & TORRENT, 2010). Esses mediadores são chamados de adipocinas, que são capazes de atuar sobre diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, que podem ser reguladas por estímulos inflamatórios e mediante condições de hipertrofia e/ou hiperplasia destas células. Tais alterações são encontradas em quadros de obesidade e síndrome metabólica (SANTOS & TORRENT, 2010). Essas adipocinas desempenham funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas, interferindo assim, no metabolismo de lipídeos e glicose e contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e processos inflamatórios (BASTARD et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2007). E as principais são:

- **Leptina**

É a primeira adipocina a ser identificada. É o produto do gene *ob*, possui 167 aminoácidos, e com peso molecular de 16-kDa. Está envolvido na regulação da ingestão alimentar, do gasto energético, de funções neuroendócrinas e de processos imunes. É produzida exclusivamente pelo tecido adiposo, especificamente pelos adipócitos maduros. Apresenta propriedades pró ou anti-inflamatórias (BASTARD et al., 2006; WAJCHENBERG et al., 2009; SANTOS & TORRENT, 2010).

- **Fator de Necrose Tumoral –  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

É uma citocina pró-inflamatória é produzido principalmente por macrófagos e linfócitos. É produzido também pelo TA, porém, esta produção é fraca em humanos. Está envolvida em processos de inflamação, apoptose, citotoxicidade, inibição da lipogênese, ativação da lipólise e produção de outras citocinas como as interleucinas-1 e 6 (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

- **Interleucina-6 (IL-6)**

É uma citocina pró-inflamatória produzida por células (monócitos, fibroblastos, endoteliais, macrófagos) e tecidos, como o TA. Exerce ações sobre várias células e tecidos. Induz a produção de proteína C reativa (PCR) pelos hepatócitos, reduz a atividade da lipase lipoproteica, ativa células do sistema imune e apresenta grande correlação com complicações cardiovasculares (WAJCHENBERG, 2000; BASTARD et al., 2006).

- **Resistina**

Também chamada de FIZZ 3, é uma proteína que pertence à família de proteínas RELM (Resistin-like Molecules). É secretada por adipócitos em roedores e por monócitos, macrófagos, baço e adipócitos em humanos. A sua secreção é estimulada por alguns fatores tais como processos inflamatórios, uso de glicocorticoides, endotoxinas e lipopolissacarídeos. Sua secreção estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão (SANTOS & TORRENT, 2010).

- **Adiponectina**

É produzida exclusivamente pelo tecido adiposo. É também conhecida como ACRP30 ou adipoQ em camundongos e GBP28 ou APM1 em humanos. Tem funções anti-inflamatórias e anti-aterogênicas (BASTARD et al., 2006; ROSA et al., 2013).

Os adipócitos também secretam quimiocinas como a proteína quimioatraente para Monócitos do tipo 1 (MCP-1), que favorece a migração de macrófagos para o TA. Na obesidade estas adipocinas se encontram alteradas dando origem a outras doenças. Por isso, que muitos autores citam a obesidade como fator de risco de várias outras doenças (COUSIN et al., 1999 apud BULLÓ et al., 2006; BASTARD et al., 2006).

## 2.2 OBESIDADE

O desenvolvimento da obesidade é caracterizado pelo aumento no número de células do tecido adiposo (hiperplasia) e acúmulo de lipídeos intracelulares (hipertrofia), resultado da proliferação e diferenciação celular. Estes processos são regulados por fatores endócrinos, genéticos, metabólicos, neurológicos, farmacológicos, ambientais e nutricionais (WHO, 2014).

A obesidade é classificada baseando-se no Índice de Massa Corporal (IMC) e no risco de mortalidade associada. Um paciente é considerado obeso quando apresenta um IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. É classificada em grau I, II e III, quando o IMC se encontra entre 30 e 34,9 kg/m<sup>2</sup>; entre 35 e 39,9 kg/m<sup>2</sup> e, ultrapassa 40 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente (WHO, 2014).

Por decorrência da hiperplasia e da hipertrofia do tecido adiposo, o paciente obeso apresenta um estado inflamatório neste tecido diferente da inflamação clássica. A inflamação clássica consiste em vermelhidão, inchaço, calor e dor no local da inflamação, além de ser uniforme associada ao aumento da taxa do metabolismo basal e a resposta rápida do sistema imune, a inflamação em obesos é uma inflamação crônica (GREGOR & HOTAMISGIL, 2011). Esta inflamação revela um aumento das adipocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina e resistina; e diminuição da adiponectina. Essa inflamação é um fator de risco para várias doenças, tais como, hipertensão arterial, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, que são chamadas de comorbidades associadas à obesidade. Neste contexto, o elo entre a obesidade e as comorbidades é a inflamação do tecido adiposo (BASTARD et al., 2006; GREGOR & HOTAMISGIL, 2011; WHO, 2014).

O tratamento da obesidade se baseia em abordagem nutricional, uso de medicamentos antiobesidade, práticas de atividade física, e cirurgia bariátrica (usada somente quando

o paciente não mostra uma melhora no quadro clínico-nutricional) (FANDIÑO et al., 2004; WHO, 2014).

### 2.3 ZINCO

O zinco é um mineral essencial para a nutrição dos seres vivos (plantas, animais e seres humanos). Encontra-se amplamente distribuído em todo o corpo humano (2 a 3 g) sendo que cerca de 90% desse mineral está concentrado nos músculos e ossos (WASTNEY et al., 1986 apud PLUM, RINK & HAASE, 2010).

Os produtos de origem animal geralmente são as melhores fontes alimentares de zinco, com relação ao conteúdo protéico e biodisponibilidade. No entanto, os de origem vegetal podem interagir com este mineral e interferir na absorção, pois pode ocorrer interação química com outras substâncias, tais como, fitatos, fibras e oxalatos. (DOMENE et al., 2008 apud CRUZ & SOARES, 2011). A biodisponibilidade também é afetada na circulação sanguínea, pois pode haver competição do zinco com os minerais cobre e ferro, dependendo da quantidade desses elementos (PEREIRA & HESSEL, 2009 apud CRUZ & SOARES, 2011).

O consumo de zinco recomendado para mulheres sadias é de 8 mg/dia, enquanto que para homens é de 11 mg/dia. Na gestação, infância, puberdade e senilidade aumenta-se a necessidades deste mineral (DRI, 2001; HAMBIDGE et al., 2008).

A maior parte do zinco é absorvida no jejuno, e após ser absorvido, o mineral é liberado pela célula intestinal, passa para os capilares mesentéricos e é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e distribuído para os outros tecidos (LEE et al., 1989 apud MAFRA & COZZOLINO, 2004).

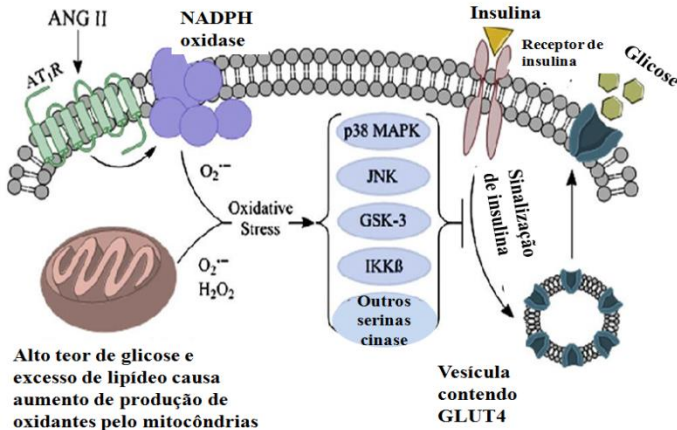
Dentro da célula o 50% do zinco se encontra no citosol, de 30 - 40% está no núcleo e o restante está associada a membrana. A sua homeostase celular é regulada por duas famílias de proteínas: a família importador de zinco (ZIP ou SLC39A) contém 14 proteínas, que transportam o

zinco de vesículas intracelulares e do meio extracelular para o meio citoplasmático; e a família transportador de zinco (ZnT ou SLC30A), cuja os membros são enumerados de ZnT-1 a ZnT-10, que transporta o zinco de uma organela para outra e do meio citoplasmático para o meio extracelular (LICHTEN & COUSINS, 2009 apud de PLUM, RINK & HOOSE, 2010; FEITOSA et al., 2012; SOLOMONS, 2013).

O zinco é componente essencial de mais de 300 tipos diferentes de enzimas de diversas espécies vivas. Essas enzimas necessitam da coordenação de um ou mais átomos de zinco, classificando-os como fator catalítico onde pressupõe que participa diretamente da catálise enzimática e a sua remoção conduz à inativação da enzima; co-catalítico onde pode aumentar ou diminuir a catálise, associando-se a outro átomo de zinco ou outro metal no local ativo da enzima e a sua remoção não leva a perda da atividade ou estabilidade; ou estrutural, onde são necessários apenas à manutenção da estabilidade da conformação das proteínas, uma vez que contribuem para a estabilização da estrutura quaternária de holoenzimas oligoméricas (HENRIQUES et al., 2003 apud DELGADINHO, 2014).

O zinco participa de vários processos celulares ou eventos de desenvolvimentos, como por exemplo, na ativação de monócitos, no controle da proliferação celular e neoplasia, no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, ácidos nucleicos, embriogênese e apoptose. Apesar das baixas concentrações de zinco na maioria dos órgãos, as metaloenzimas são comuns em todos os tecidos corporais e exercem papéis essenciais em vários processos fisiológicos. (SOLOMONS, 2013). Pode-se também destacar a função deste mineral na adipogênese, pois segundo Marreiro e colaboradores (2004), o zinco estimula os receptores de insulina tirosina cinase, aumentando a translocação dos transportadores de glicose do tipo GLUT4 para a membrana celular e consequentemente, a entrada de glicose nos adipócitos (Figura 3) (MARREIRO et al., 2004; LEÃO E SANTOS, 2012).

**Figura 3.** Receptor de insulina e translocação da vesícula de transportadores de glicose (GLUT 4)



**Fonte:** Adaptação de Henriksen; Diamond-Stanic; Marchionne, 2010

Muitos fatores podem levar a deficiência de zinco, porém, o seu excesso também é prejudicial, estando associada à supressão da resposta imune, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) e à redução das concentrações de cobre no plasma (Figura x) (PLUM, RINK & HAASE, 2010).

Em um estudo *in vivo* realizado por Ishikawa e colaboradores (2008), citado por Cruz e Soares (2011) o baixo consumo de zinco causou uma redução acentuada na taxa de crescimento corporal, juntamente com um declínio considerável na concentração plasmática de zinco (inferior a 60%), em comparação com a dieta controle. Em outro estudo, de Ebrahimi, Pormahmodi e Kamkar (2006), citado também por Cruz e soares (2010), avaliaram durante 7 meses o efeito da suplementação diária de zinco no crescimento de alunos de 8 a 11 anos de idade no sul do Iran, e verificaram um aumento no peso de 1,056 Kg e na altura de 1,606 cm

entre os que receberam zinco, confirmando a influência do zinco no crescimento (ISHIKAWA et al., 2008 apud CRUZ & SOARES, 2011; EBRAHIMI, PORMAHMODI & KAMKAR, 2006 apud CRUZ & SOARES, 2011).

Há relatos de que o zinco está envolvido no metabolismo da vitamina A, pois o zinco é requerido para a síntese hepática e secreção da proteína RBP (Retinol Binding Protein) que é responsável pelo transporte desta vitamina. Ela está envolvida em funções importantes como no processo visual, manutenção da pele, resistência às infecções, crescimento, desenvolvimento ósseo, reprodução e secreção noturna de GH (hormônio do crescimento). Portanto, no caso de deficiência de zinco, há uma redução na produção de RBP, resultando em carência secundária da Vitamina A, podendo levar a uma lesão de forma irreversível na córnea e conseqüentemente à cegueira (SILVA et al, 2007).

A influência do zinco na prevenção do diabetes mellitus, também foi investigada em estudo feito por Tobia e colaboradores (1998), onde constataram que a suplementação de 1000 ppm de zinco em ratos BB *Wister* propensos a desenvolver diabetes, foi efetiva na prevenção do início doença, resultando em uma menor incidência de diabetes, se comparados aos animais que não foram suplementados ou com os que receberam apenas 50 ppm de zinco. Este estudo *in vitro* demonstra que a insulina pode se ligar ao zinco, melhorando a solubilidade deste hormônio nas células *beta* do pâncreas e pode ainda aumentar a capacidade de ligação da insulina ao seu receptor (SENA & PEDROSA, 2005).

Outros estudos evidenciaram a participação do zinco estimulando a atividade do receptor de insulina tirosina cinase, que, posteriormente, por meio do estímulo pós-receptor, parece aumentar a translocação dos transportadores de glicose dos seus sítios intracelulares para a membrana plasmática (MARREIRO et al., 2004).

Trabalhos realizados por outros autores demonstraram que animais e pacientes obesos apresentavam concentrações

alteradas de vários micronutrientes, dentre eles, o zinco (FEITOSA, LIMA & MARREIRO, 2012; LEÃO & SANTOS, 2012). Tais como mostra o trabalho realizado por Kennedy e Failla (1987), onde verificaram que a concentração de zinco, em camundongos obesos, estava alterada, e quando suplementados houve uma melhora na resposta imunológica. No estudo de Liu et al. (2013), verificou que a deficiência de zinco em camundongos que consumiram dieta rica em gordura, aumentou a concentração circulante de leptina e infiltração de macrófagos no tecido adiposo visceral. Portanto, existe uma relação entre a obesidade e as concentrações de zinco (KENNEDY & FAILLA, 1987; LIU et al., 2013).

Baixas concentrações séricas de zinco levam ao aumento das concentrações lipídicas plasmática. Tal quadro clínico ocorre mais frequentemente em pacientes diabéticos metabolicamente descontrolados. Essas alterações lipídicas são fatores fundamentais para o surgimento de complicações microvasculares que levam à morte. No México, pacientes com Diabetes Mellitus tipos 2, que apresentavam concentrações de zinco inferior à média de referência, receberam um tratamento de 100 mg de sulfato de zinco, e apresentaram alterações no perfil lipídico após 12 semanas de tratamento, em comparação com o grupo placebo. O tratamento reduziu significativamente as concentrações de colesterol total e triacilglicerol e aumentaram as concentrações de zinco e HDL-colesterol no sangue. Assim, usando esse tratamento, pode levar a redução de risco cardiovascular em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (PARTINA-HERNANDEZ et al., 2006 apud CRUZ & SOARES, 2011).

Em virtude das complicações que os pacientes obesos apresentam, o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares relacionados à obesidade, bem como o conhecimento sobre o papel do zinco nesta doença tornam-se relevantes para prevenção de tais complicações associadas



com o excesso de peso corporal, melhorando assim, a qualidade de vida desses pacientes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do zinco na adipogênese e na possível reversão da obesidade por meio de aspectos relacionados à deficiência de zinco.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a proliferação e a diferenciação de pré-adipócitos na ausência e na presença de zinco;
- Validar, *in vivo*, um modelo experimental de obesidade por consumo de dieta hiperlipídica;
- Avaliar *in vivo*, a possível reversão da obesidade, das alterações metabólicas na presença de sobrecarga de carboidratos mediante os aspectos relacionados a deficiência de zinco.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), o soro fetal bovino (SFB), o *calfserum* (CS), a penicilina e a estreptomicina foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO) e o álcool etílico foram adquiridos da Nuclear; o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o cloreto de potássio (KCl) e o bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); o etanol, o metanol, sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) e o álcool isopropílico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha); o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); a tripsina foi adquirida da Cultilab; o Trypan Blue, o triton-X 100, o iodeto de propídeo (PI), a albumina bovina (BSA), o ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), o *oilred O*, insulina (INS), dexametasona (DEX), a isobutilmetilxantina (IBMX), e a resina Chelex® 100 foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, USA); o kit de determinação de zinco foi adquirido da Randox (Keamevsville, WV, USA); a Caseína, Bicarbonato de colina, Mix de vitaminas e o Mix de minerais foram adquiridos da Rhoister (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil); a carboximetilcelulose (CMC) foi adquirida da Labsynth (Diadema, SP, Brasil); o óleo de milho e óleo de girassol são da marca Suavit; a sacarose é açúcar da marca União; o amido de milho da marca Maisena.

### 4.2 CULTURA CELULAR

Foram utilizados pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 de origem murina, que foram gentilmente cedidas pela Professora Ana Campa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – São Paulo. Para a cultura, as células foram mantidas em garrafas plásticas específicas contendo meio DMEM, suplementado com 10% de CS ou 10% de SFB (de acordo com cada experimento), 100U/ml de

penicilina, 100µg/ ml de estreptomicina, 10 mM de HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Para realizar os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão por Azul de Tripán, em que células não viáveis possuem comprometimento de membrana e coram-se de azul devido a incorporação do corante (FRESHNEY, 1987). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer. O número de células e tempo de incubação foram adaptados para cada tipo de ensaio.

### 4.3 TRATAMENTO CELULAR

O zinco foi dissolvido em água Mili-Q na concentração de 1mg/mL, armazenado em alíquotas a 4°C. O tratamento foi realizado após a adesão das células nas placas de 24 poços. Depois das células aderirem, foram tratadas da seguinte forma:

- Células controle, onde foram utilizadas células sem tratamento (somente com meio suplementado);
- Células com privação de zinco;
- Células tratadas com concentrações crescentes de zinco (1µg/mL, 2µg/mL e 4µg/mL).

#### 4.3.1 REMOÇÃO DO ZINCO NO SORO DE CULTURA CELULAR

O Chelex® 100 é uma resina que sequestra metais, no quais tem afinidade em meios líquidos. Ele tem afinidade com metais mono e divalentes. Cinco gramas de resina foram adicionados em 100 mL de soro CS ou SFB, de acordo com o experimento. A mistura foi mantida a -4°C, sob agitação, por 4 horas. Depois deste período, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1000g, e foi separado o soro da resina. Por fim, foi realizada a determinação de zinco.

#### 4.3.2 DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE ZINCO

Para confirmar a remoção do zinco no soro CS e SFB, foi feita a determinação colorimétrica de zinco, que se baseia.

Primeiro foi feita a desproteïnização, onde 500µL do reagente desproteïnizante foi adicionado em 500µL da amostra e foi centrifugada por 10 minutos em 12.000g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido. Então, foi misturado 200µL do sobrenadante com 1000µL do reagente de coloração, incubado por 5 minutos a 25° C. E posteriormente, foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 540nm. Os resultados foram comparados com os resultados do soro controle (SC).

#### 4.4 VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO COM AZUL DE TRIPAN

Este ensaio é um método de contagem celular para determinar a proliferação celular.

Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células por poço em placa de 24 poços em meio DMEM com 10% de CS. Após adesão das células, realizou-se o tratamento de acordo como item 4.3. Após 24 horas de tratamento, as células foram desprendidas da placa com tripsina e avaliadas pelo método de exclusão por azul de tripan com a contagem celular realizada em câmara de Neubauer. O número de células das amostras tratadas foi comparado ao número de células das amostras do controle.

#### 4.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A análise do ciclo celular permite avaliar o conteúdo do DNA de cada célula, podendo ser utilizado para estimar a distribuição e regulação celular em cada fase do ciclo (TAVARES; TAVARES, 2009). Para esta análise, foi utilizado iodeto de propídeo, que é um fluorocromo que se intercala com o DNA e que pode ser quantificado por citometria de fluxo seguindo o método descrito por Yang et al. (2007). As

células ( $5 \times 10^5/\text{mL}$ ) foram plaqueadas em placas de 24 poços, em meio DMEM com 10% CS e incubadas por 24 horas para adesão das células. Depois deste período, as células foram tratadas de acordo com o item 4.3 e incubadas novamente por 24 horas. Após o período de tratamento, o meio de cultura foi reservado. As células foram desprendidas da placa, e com o meio de cultura reservado, foram transferidas para tubos tipo *ependorfs* e centrifugadas a 300g por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Foi adicionado etanol 70% gelado e as amostras foram incubadas à -4°C por 30 minutos, para fixação das células. Adicionou-se PBS contendo BSA 2% para inibir ligações inespecíficas com o iodeto de propídeo, seguido de centrifugação a 300g por 10 minutos a 25°C. Descartado o sobrenadante, adicionou-se uma solução contendo RNase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 0,1% de Triton-x-100 em PBS com posterior homogeneização e transferência para tubos específicos de citometria de fluxo, que foram mantidos em gelo até o momento de leitura no equipamento. No momento da análise, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (1mg/mL). A análise do DNA foi realizada por meio de um citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) e a população de células que corresponde a cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o programa adequado (Flowing Software 2). A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPadPrism 5 (GPW6-242831-RBMZ-03274).

#### 4.6 COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO

Para a observação de possíveis alterações morfológicas, as células da linhagem 3T3-L1 foram incubadas com DMEM suplementado com 10% CS em placa de 24 poços. Após 24h, as células foram tratadas com DMEM suplementado com 10% de CS, conforme item 4.3. Depois deste período, as células incubadas foram expostas a

uma solução contendo os corantes laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina – 1,2 µg/mL) e brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5-ethyl-6-phenilfenantridínio – 4 µg/mL). Em seguida, as células foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). As células viáveis coram-se em verde e células necróticas coram-se em vermelho.

#### 4.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM 3T3-L1

O processo de diferenciação é desencadeado por meio de um coquetel estimulante constituído de insulina (ativa receptores de IGF-1), dexametasona (ativa receptores de glicocorticóides) e isobutilmetilxantina (inibidor de cAMP fosfodiesterase), que compreende estágios precisamente controlados como a parada do ciclo celular, a divisão e a diferenciação celular (FARMER, 2006; FILIPPIN-MONTEIRO, 2010; TANG & LANE, 2012). Para a diferenciação em adipócitos, as células 3T3-L1 ( $1 \times 10^6$ /poço) foram incubadas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de CS em placa de 24 poços. Após a confluência as células foram estimuladas para a diferenciação mediante a adição de um meio de diferenciação (MDI) composto por 500µM de IBMX, 1µM de DEX e 1,67µM de INS em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 72 h, o meio foi trocado para DMEM contendo somente 10% de SFB e 1,67µM de INS e trocado a cada dois dias, por 8 dias.

#### 4.8 COLORAÇÃO COM *OIL RED O*

Após o período de diferenciação, as células foram lavadas com tampão de PBS (pH 7,4 a 37° C) e fixadas com formalina (10% de formaldeído e 90% de PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas com água destilada por quatro vezes e coradas com *Oil Red O* (5mg/ml em isopropanol: água, 2:1), um corante específico para triacilgliceróis intracelulares, por 30 minutos. Após este período as células foram lavadas com

água e analisadas no microscópio de luz invertido. Após a análise microscópica, o conteúdo de corante intracelular foi dissolvido em metanol e submetido à leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

#### 4.9 ENSAIO *IN VIVO*

Para se realizar um experimento *in vivo*, deve-se analisar o melhor modelo animal para o que se deseja pesquisar, o ambiente do biotério onde os animais ficaram durante a pesquisa e o tipo de ração adequada para esta pesquisa (NEVES et al., 2013).

Os modelos de indução da obesidade mais usados na pesquisa, para melhor entendimento da fisiopatologia da obesidade, são os ratos e os camundongos. Sendo que, os camundongos que demonstram melhor a gênese da obesidade quando ingerem uma dieta hiperlipídica ou hipercalórica, da linhagem isogênica, são os C57BL/6 (obtido do cruzamento de animais consanguíneos criando assim, uma população estável e geneticamente homogênea); e os da linhagem heterogêneos, são os *Swiss* (obtidos do cruzamento ao acaso criando assim, uma população com uma variabilidade genética) (NEVES et al., 2013; FERREIRA, HACHMAN & BARBOSA, 2005).

O ambiente do biotério adequado para os camundongos deve ter uma temperatura de  $22 - 24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa (UR) do ar em  $50 \pm 10\%$  e ter um ciclo de iluminação de 12 h de claro por 12 h de escuro. Devem estar em gaiolas individuais ou coletivas de polisulfona, medindo 30 cm x 20 cm x 13 cm, com grade aramada em aço inoxidável com comedouro e encaixe para o bebedouro (NEVES et al., 2013).

A escolha da ração adequada é muito importante, pois dá condições de atingir o potencial genético, de crescimento, reprodução, longevidade e resposta a estímulos. Deve os seguintes componentes essenciais (REEVES et al., 1993).

*Proteínas*: É o principal componente da ração. A caseína é uma boa fonte de proteína porque a sua



composição em aminoácidos é razoavelmente adequada, que é prontalmente disponível, e o custo é baixo em relação a outras fontes (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

*Carboidratos:* É a melhor e mais econômica fonte de energia. As suas fontes mais usadas são o amido de milho e a sacarose. Pois, 90 a 94% da composição do amido de milho dextrinizado contêm tetrassacarídeos, e a sacarose serve como meio de dispersão para as vitaminas e minerais, e também fornece a doçura e melhora o paladar (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

*Fibras:* Proporciona volume na ração e permite uma distribuição homogênea dos nutrientes no aparelho digestivo. A principal fonte de fibra é a celulose (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

*Lipídeos:* São energéticos concentrados e servem de veículo para as vitaminas lipossolúveis. É indispensável na dieta o ácido linoléico (18: 2 (n-6)) e o ácido linolênico (18: 3 (n-3)). Principais fontes são o óleo de soja e o óleo de milho. Porém, o óleo de milho não é capaz de suprir as necessidades de ácido linolênico (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

*Minerais:* São nutrientes essenciais que têm as funções construtora e reguladora. Os principais são: cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloro, ferro, cobre, manganês, iodo, zinco e cobalto (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

*Vitaminas:* Necessárias para os processos fisiológicos. Os animais de laboratório apresentam uma elevada exigência diária de vitaminas. As principais são: Vitaminas A, D, E, K, complexo vitamínico B e vitamina C (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

O padrão de valor nutricional da dieta estabelecida pelo Instituto Americano de Nutrição – 93 (AIN-93), é a reformulação do AIN-76, e foi estabelecida a dieta para crescimento, gestação e lactação (AIN-93G) e a dieta para manutenção de animais adultos (AIN-93M) (Tabela 1 e 2) (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

**Tabela 1:** Necessidades nutricionais para roedores. Instituto Americano de Nutrição (AIN-93)

<b>Nutrientes</b>	<b>Crescimento (AIN - 93G)</b>	<b>Manutenção (AIN - 93M)</b>
Energia Total (kcal/kg)	3776	3601
Proteína bruta (%)	19,3	14
Fibra (%)	4,7	4,7
Cálcio (%)	0,5	0,5
Fósforo (%)	0,3	0,3
Lípideos (%)	17	10

**Fonte:** Adaptado de Reeves et al. (1993)

**Tabela 2:** Formulação da dieta AIN-93G para crescimento e da dieta AIN-93M para mantimento de roedores adultos.

<b>Ingredientes</b>	<b>AIN-93G</b>	<b>AIN-93M</b>
	<b>(g/kg da dieta)</b>	<b>(g/kg da dieta)</b>
Amido de milho	397,486	465,692
Amido dextrinizado	132,000	155,000
Caseína	200,000	140,000
Sacarose	100,000	100,000
Óleo de soja	70,000	40,000
Fibra	50,000	50,000
Mistura vitamínica	35,000	35,000
Mistura mineral	10,000	10,000
Bitartarato de colina	2,500	2,500
L-cistina	3,000	1,800
Ter-butilhidroquinona	0,014	0,008

**Fonte:** Adaptado de Reeves et al. (1993)

Neste trabalho, realizou-se um experimento piloto para avaliar o modelo de obesidade e o tipo de dieta para a indução da obesidade. Onde utilizou-se 9 camundongos *Swiss*, fêmeas, com 5 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com aramado em aço inox livre de zinco, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle (GC,  $n = 4$ ) que consumiu uma dieta normolipídica, e o grupo obeso (GO,  $n = 5$ ) que consumiu uma dieta hiperlipídica. O experimento decorreu durante 1 mês, e durante este tempo, avaliamos a variação da massa corpórea e o consumo de ração.

Depois de avaliar os resultados do experimento piloto, iniciou-se os experimentos do trabalho, onde utilizou-se 40 camundongos *Swiss*, fêmeas, com aproximadamente 4 - 5 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com aramado em aço inox livre de zinco, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada (24°C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFSC (PP00892) (Anexo A).

#### 4.9.1 VALIDAÇÃO DO MODELO DE INDUÇÃO DA OBESIDADE

Os camundongos foram divididos em dois grupos, sendo um controle (GC), que recebeu uma dieta normolipídica (n=20) (Tabela 3, Figura 4A), e um grupo obeso (GO), que recebeu uma dieta hiperlipídica e hipercalórica (n=20) (Tabela 3, Figura 4B). Os animais receberam as respectivas rações e água filtrada *ad libitum* por três meses. Durante este período, os camundongos foram pesados, medidos (comprimento nasoanal) e sendo avaliado o consumo de ração duas vezes por semana. No final desta fase, o consumo de ração e o índice de Lee (raiz cúbica do peso corporal/comprimento nasoanal do animal por milímetro) foram avaliados. Ainda, coletou-se sangue total e plasma dos animais para a determinação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e avaliação da concentração de citocinas.

#### 4.9.2 SOBRECARGA DE CARBOIDRATOS EM ANIMAIS OBESOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ZINCO

Na segunda fase do estudo, subdividiu-se os grupos da primeira fase em 4 subgrupos, sendo que, o grupo controle foi subdividido em dois: um subgrupo onde foi administrado zinco por gavagem (grupo controle com zinco) (n = 10) e

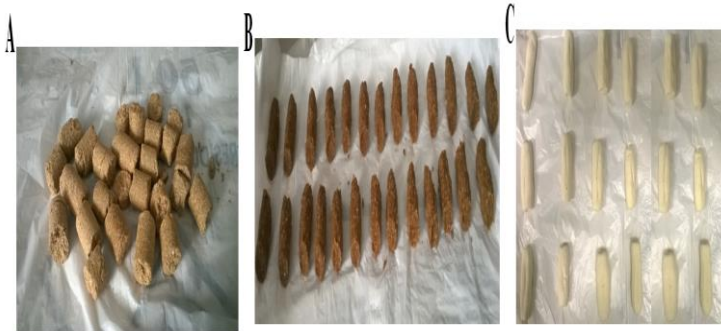
outro que recebeu água filtrada pela mesma via (grupo controle sem zinco) (n = 10). No caso do grupo obeso, foi realizado o mesmo procedimento tendo assim, o grupo obeso com zinco (n = 10) e o grupo obeso sem zinco (n = 10). A Figura 6 ilustra os procedimentos realizados. Os animais receberam ração hiperglicídica deficiente de zinco (Tabela 3, Figura 4C) e água *ad libitum* por três meses. Durante este período, os camundongos foram pesados e medidos duas vezes por semana. No final desta fase, o consumo de ração e índice de Lee foram avaliados. Ainda, coletou-se sangue dos animais para a determinação dos parâmetros bioquímicos (leucócitos, hemácias, plaquetas, hemoglobina e hematócrito) e hematológicos (Colesterol, triacilglicerol, glicose, Ureia, HDL – colesterol, LDL – colesterol, AST e ALT), e avaliação da concentração de citocinas (adiponectina e leptina) e de insulina.

**Tabela 3:** Composição das dietas normolipídica com zinco, hiperlipídica com zinco e hiperglicídica sem zinco.

Ingredientes	Normolipídica com	Hiperlipídica com	Hiperglicídica sem
	zinco (g/kg) <sup>a</sup>	zinco (g/kg) <sup>b</sup>	zinco (g/kg) <sup>c</sup>
Proteína Bruta (mín.)	220,000	X	200,00
Ração Padrão <sup>1</sup>	X	550,000	X
Material etéreo <sup>2</sup>	40,000	X	X
Matéria Fibrosa	80,000	X	50,000
Matéria mineral	100,000	X	X
Mix vitamínica <sup>3</sup>	2,899	2,899	10,000
Mix mineral <sup>4</sup>	0,204	0,204	35,000
Óleo de milho	X	130,000	50,000
Óleo de girrasol	X	20,000	X
Sacarose	X	100,000	X
Bitartarato de colina	X	X	2,000
Clara de ovo	X	200,000	200,000
Zinco <sup>5</sup>	0,030	0,030	<0,004
Energia (kcal/kg)	3.000	4.200	3.862

**a** Dieta padra (Biobase Bio-tec Ratos e Camundongos®) normolipídica, normoglicídica e normocalórica. **b** Dieta hiperlipídica, normoglicídica e hipercalórica. **c** Dieta normolipídica, hiperglicídica e hipercalórica deficiente em zinco. **1** Ração padrão da Biobase. **2** Material gordo. **3** Mistura de vitaminas para dietas de crescimento e manutenção AIN-93G (REEVES et al., 1993). **4** Mistura de minerais para dietas de manutenção AIN-93 (REEVES et al., 1993). **5** Concentração de zinco presente no mix de mineral.

**Figura 4:** Imagens das rações. (A) Ração normolipídica; (B) Ração hiperlipídica; (C) Ração hiperglicídica.



**Tabela 4.** Composição do Mix de vitaminas AIN – 76A da RHOSTER. Concentração de garantia por Kg do produto

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Ácido fólico	200 mg
Ácido nicotínico	3.000 mg
Biotina	20.000 mg
Pantotenato de cálcio	1.600 mg
Piridoxina. HCl	700 mg
Riboflavina	600 mg
Tiamina. HCl	600 mg
Vitamina A	400.000 UI
Vitamina B12	1000 mcg
Vitamina D3	100.000 UI
Vitamina E	5.000 UI
Vitamina K3	5.000 mg

**Composição básica do produto:** ácido fólico, vitamina A, vitamina B1, vitamina B12, vitamina B2, vitamina B6, vitamina E, vitamina H, vitamina K3, ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, sacarose.

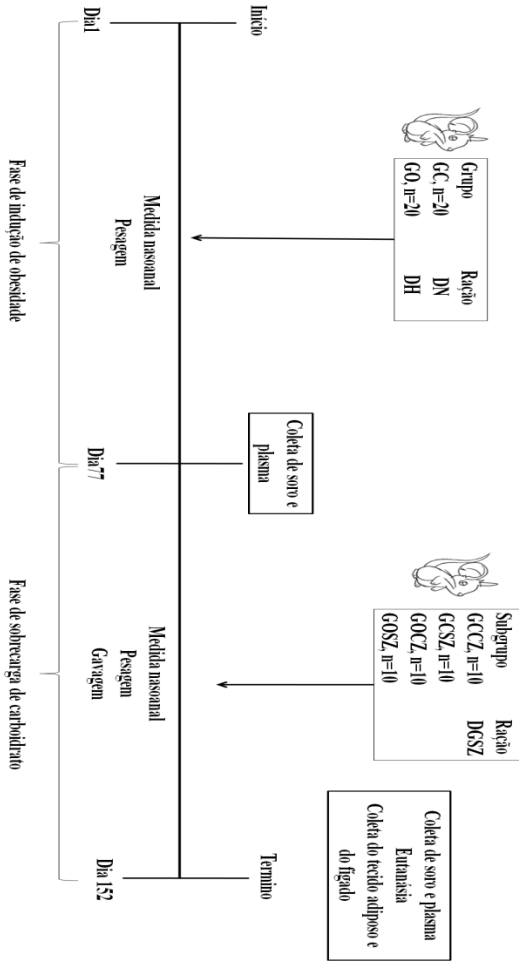


**Tabela 5.** Composição do Mix de Minerais AIN – 93G da RHOSTER. Concentração de garantia por Kg do produto

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Boro	14,26 mg
Cálcio	142,94 g
Cloro	44,90 g
Cobre	172,41 mg
Cromo	28,65 mg
Enxofre	8,60 g
Ferro	1000 mg
Flúor	28,72 mg
Fósforo	44,61 g
Iodo	5,93 mg
Lítio	2,85 mg
Magnésio	14,48 g
Manganês	300 mg
Molibdênio	4,32 mg
Níquel	14,31 mg
Potássio	102,81 g
Selênio	4,28 mg
Silício	143,26 mg
Sódio	29,38 g
Vanádio	2,87 mg
Zinco	0,28 mg

**Composição básica do produto:** ácido bórico, carbonato de cálcio, carbonato de cobre, carbonato de manganês, carbonato de níquel, citrato de potássio, citrato férrico, cloreto de lítio, cloreto de sódio, fluoreto de sódio, sacarose, iodato de potássio, fosfato monopotássico, metasilicato de sódio, óxido de magnésio, paramolibtato de amônia, selenato de sódio, sulfato de cromo e potássio, sulfato de potássio.

**Figura 6.** Fluxograma do experimento *in vivo*



#### 4.9.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICA

As amostras foram coletadas com os animais em jejum de 6 horas.

As amostras de sangue total foram coletadas da veia facial e armazenadas em tubo contendo EDTA (10 $\mu$ L/mL de sangue) para análise do perfil hematológico, que foi feito em no equipamento automatizado da BC-2800Vet (MINDRAY). Para avaliar o perfil bioquímico, as amostras de plasma foram obtidas a partir da centrifugação do sangue total, a 2500 rpm por 30 minutos. As amostras de soro foram obtidas da mesma forma, porém, a partir de amostras de sangue coletada pela veia facial, em tubos sem anticoagulante. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: creatinina, colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triacilglicerol, glicose, ureia, AST e ALT. Foram feitas com kit da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) no COBAS Mira *Plus* (ROCHE diagnostic systems, Indianapolis, IN).

#### 4.9.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INSULINA, LEPTINA E ADIPONECTINA

As amostras de plasma foram obtidas a partir de sangue coletado por punção cardíaca em tubos contendo EDTA (10 $\mu$ L/mL de sangue) em animais previamente anestesiados com solução de quetamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg). Foi analisado a concentração de insulina, leptina e adiponectina. Foram feitas com o kit de ELISA da Millipore (St. Charles, Missouri, USA), e foi seguido o protocolo dos respectivos kits.

#### 4.9.5 NECRÓPSIA E COLETA DE ÓRGÃOS

Os animais foram previamente anestesiados, conforme descrito no item 4.9.4, foram eutanasiados por deslocamento cervical para posterior realização de necropsia e coleta de órgãos como fígado e tecido adiposo total. Estes órgãos foram pesados e comparados entre os grupos.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. *In vitro*, as determinações foram feitas em triplicata e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes; as comparações estatísticas foram realizadas por meio de variância one-way ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls e two-way ANOVA seguida do teste Bonferroni. No estudo *in vivo*, as estatísticas foram realizadas por meio do Teste t, one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls e two-way ANOVA seguido do teste Bonferroni. A significância estatística foi considerada em  $p < 0,05$ .

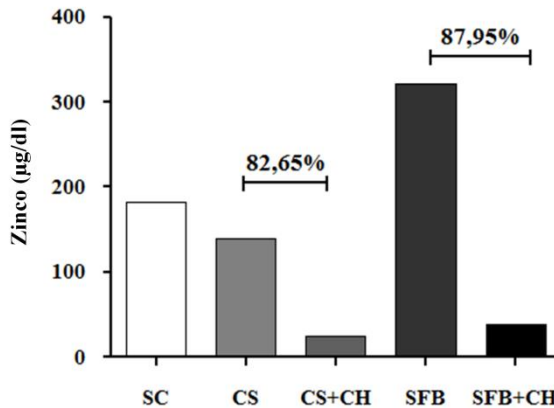
## 5 RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS *IN VITRO*

#### 5.1.1 REMOÇÃO DO ZINCO NO SORO

Este ensaio foi realizado a fim de remover o zinco nos soros CS e SFB utilizados nos ensaios de cultura celular. Os resultados obtidos mostraram que a resina Chelex® 100 reduziu 82,65% do zinco no soro CS e 87,95% do zinco no soro SFB (CS: 139,70 µg/dl *versus* CS+CH: 24,24 µg/dl; SFB: 320,96 µg/dl *versus* SFB+CH: 38,68 µg/dl) (Figura 6).

**Figura 6.** Redução do zinco nos soros CS e SFB. Incubação sob agitação a -4°C, por 24h (n=1, lote único). SC: soro controle; CS: *calf serum*; CS+CH: *calf serum* em resina; SFB: soro fetal bovino; SFB+CH: soro fetal bovino em resina. Concentração do SC segundo o fabricante: 198 µg/dL.

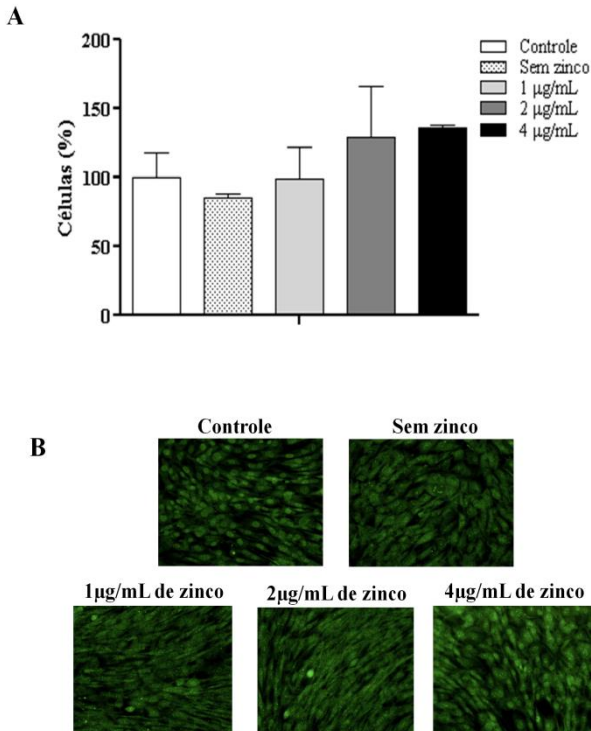


#### 5.1.2 VIABILIDADE CELULAR COM AZUL DE TRIPAN E COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO

No ensaio de viabilidade celular das células 3T3-L1 com azul de tripan avaliou-se o perfil proliferativo das células, e na coloração com laranja de acridina e brometo de etídio a morfologia dessas células. Nos resultados obtidos,

observou-se que não houve alterações estatisticamente significativas nos perfis proliferativos das células tratadas, quando comparadas com o controle, após o tratamento de 24h ( $p = 0,216$ ). Porém, observou-se uma tendência de aumento na porcentagem das células suplementadas com 2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$  de zinco ( $128,75\% \pm 37,123$  e  $138,25\% \pm 1,77$  respectivamente) e uma tendência de redução na porcentagem das células na ausência de zinco ( $85,00\% \pm 3,54$ ) (Figura 7A). Na análise morfológica não foram observadas alterações na morfologia das células (Figura 7B).

**Figura 7.** Viabilidade celular de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1. (A) Viabilidade celular com azul de trypan, após 24h de tratamento (n=2); (B) Fotomicrografias de fluorescência da análise morfológica de dupla coloração com laranja de acridina e brometo de etídio, após tratamento de 24h (n=1) (200x). A coloração verde é de células viáveis. Comparações entre as células controle e as células tratadas. *One-way ANOVA*



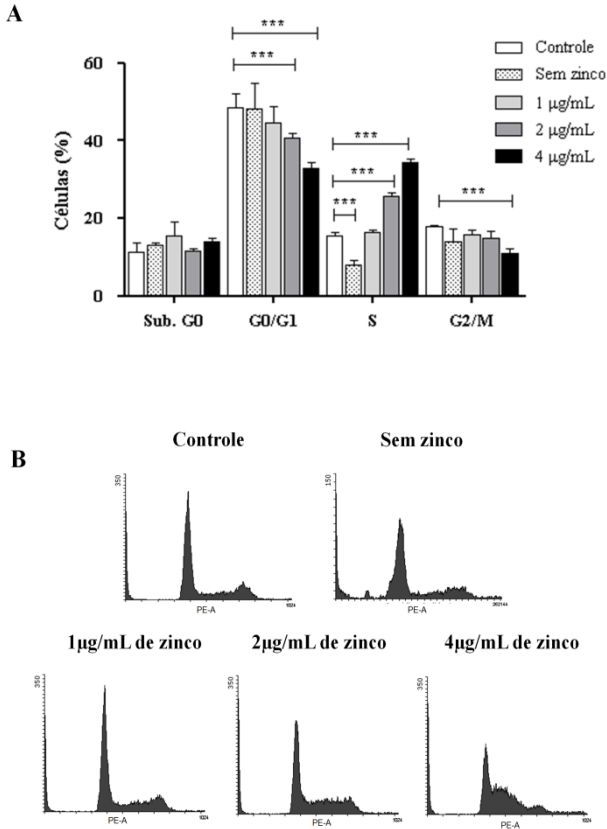
### 5.1.3 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Este ensaio avalia as células em cada fase do ciclo celular com marcação no DNA pelo iodeto de propídeo e analisado por citometria de fluxo, mostrando se há alteração nos perfis proliferativos. Verificamos progressão do ciclo celular evidenciado pela maior porcentagem de células na

fase S do ciclo celular nas células suplementadas com 2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$  de zinco e regressão do ciclo celular evidenciada pela menor porcentagem de células nessa mesma fase nas células na ausência de zinco, quando comparadas ao controle (controle:  $15,35\% \pm 1,08$  *versus* sem zinco:  $7,87\% \pm 1,39$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ :  $25,73\% \pm 0,72$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ :  $34,41 \pm 0,78$ ) (Figuras 8).



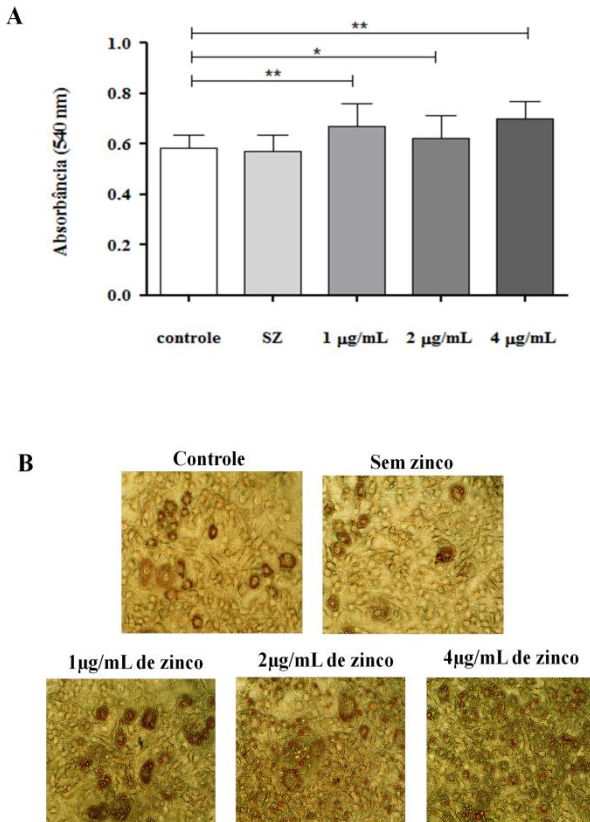
**Figura 8.** Análise do ciclo celular de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1, após tratamento de 24h (n=3). (A) Porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular; (B) Histogramas representativos da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. Comparações entre as células controle e as células tratadas em cada fase. *Two-way* ANOVA. \*\*\* p<0,001.



#### 5.1.4 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E COLORAÇÃO COM *OIL RED O*

Este ensaio visa avaliar a capacidade dos pré-adipócitos em se diferenciarem em adipócitos maduros. Com a coloração com *Oil Red O*, observou-se que nas células suplementadas com 1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL de zinco apresentaram aumento de acúmulo de triacilgliceróis intracelulares (coradas em vermelho), em comparação ao controle (controle:  $0,637 \pm 0,050$  versus 1 µg/mL:  $0,768 \pm 0,119$ ; 2 µg/mL:  $0,727 \pm 0,034$  e 4 µg/mL:  $0,772 \pm 0,035$ ) (Figuras 9).

**Figura 9.** Diferenciação celular de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 em adipócitos maduros e coloração dos triacilgliceróis intracelulares em vermelho com *Oil Red O* (n = 2). (A) Representação da absorbância dos eluatos celulares provenientes do triacilglicerol corado. (B) Fotomicrografias das células maduras ricas em triacilglicerol intracelular corados em vermelho (200x). Comparações entre as células controle e as células tratadas. *One-way* ANOVA. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01.

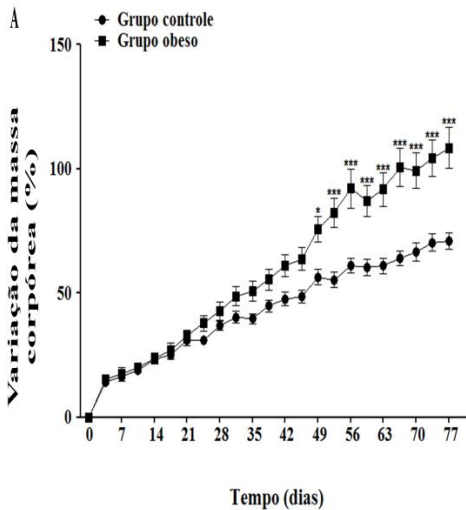


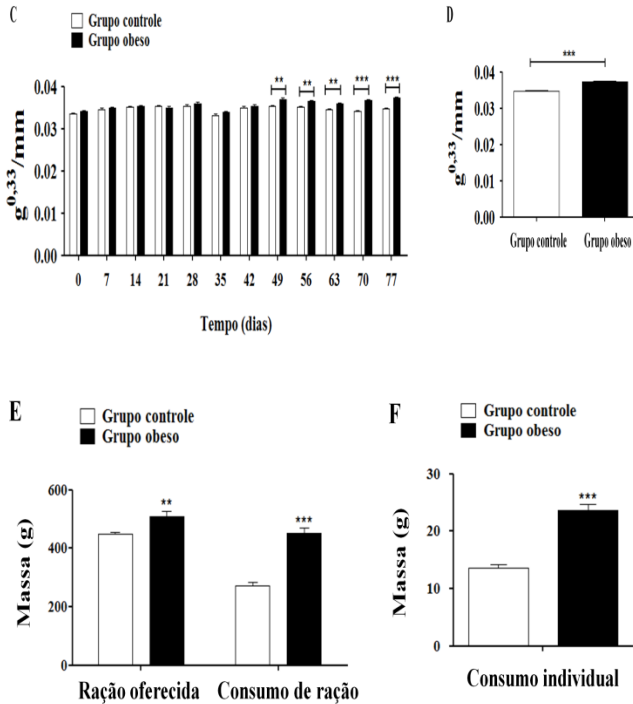
## **5.2 RESULTADOS *IN VIVO***

### **5.2.1 FASE DE INDUÇÃO DE OBESIDADE**

Por cerca de 3 meses, os animais do grupo controle (GC) recebeu uma dieta normolipídica e o grupo obeso (GO) recebeu uma dieta hiperlipídica. Após este período, a variação da massa corpórea entre os grupos GC e GO apresentou diferença significativa no 49º dia até o fim da primeira fase do experimento (GC: 56,31%  $\pm$  3,10 *versus* GO: 75,83%  $\pm$  5,13) (Figura 10A). Além disso, na avaliação do índice de Lee, observou-se novamente diferença significativa entre os dois grupos a partir do 49º dia (GC: 0,035307  $\pm$  0,000287 g<sup>0,33</sup>/mm *versus* GO: 0,036931  $\pm$  0,000457 g<sup>0,33</sup>/mm) (Figura 10C) até o último dia (77º dia) da primeira fase do experimento (GC: 0,034714  $\pm$  0,000298 g<sup>0,33</sup>/mm *versus* GO: 0,037236  $\pm$  0,000281 g<sup>0,33</sup>/mm) (Figura 10D). Ainda, a ração consumo foi superior no grupo GO quando comparado ao grupo GC (GC: 273,41 g  $\pm$  9,16 *versus* GO: 450,60 g  $\pm$  17,97) (Figura 10E) e o consumo individual também (GC: 13,67 g  $\pm$  0,4583 *versus* GO: 23,71 g  $\pm$  0,9459) (Figura 10F).

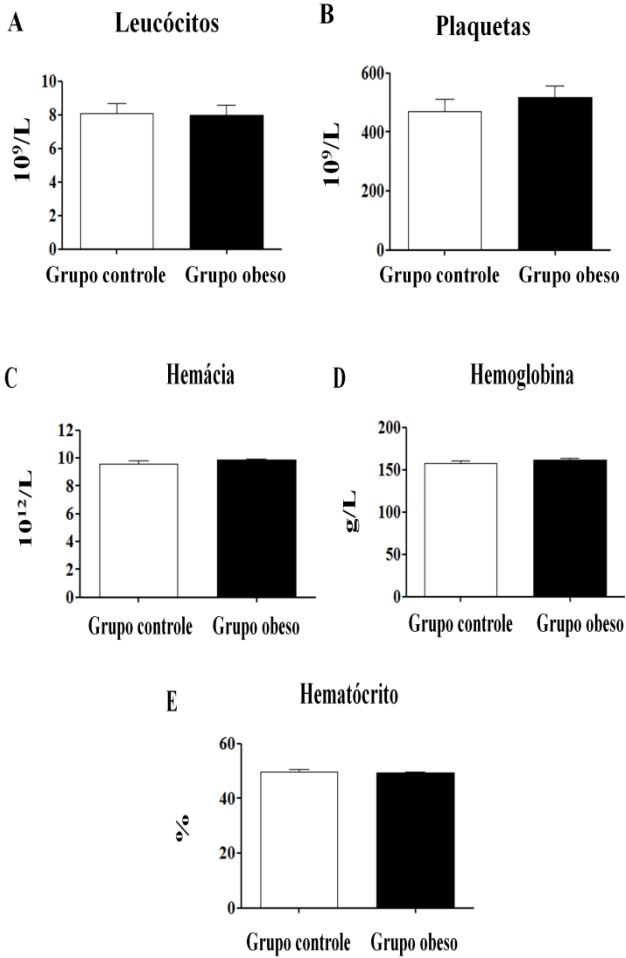
**Figura 10.** Avaliação da massa corpórea, do índice de Lee e consumo de ração dos camundongos do grupo controle (GC, n = 20) e do grupo obeso (GO, n = 19). (A) Variação da massa corpórea dos grupos GC e GO que consumiram uma dieta normolipídica e hiperlipídica, respectivamente. *Two-way* ANOVA; (B) Fotografia representativa de camundongos representando os grupos GC (cauda em vermelho) e GO (cauda em verde); (C) Índice de Lee por semana. *Two-way* ANOVA; (D) Índice de Lee do último dia. *One-way* ANOVA; (E) consumo de ração. Test *t*; (F) Consumo individual de ração. Test *t*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ .





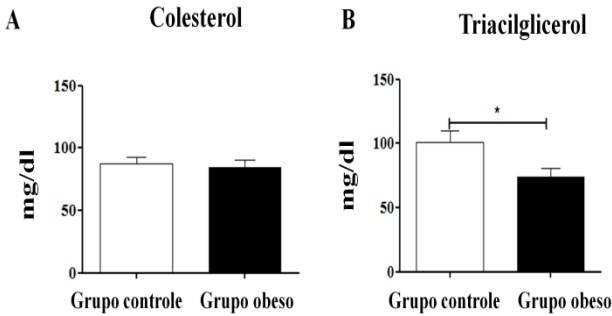
Após o término da fase de indução, determinou-se os parâmetros hematológicos visando avaliar uma possível influência da dieta hiperlipídica nos camundongos do grupo obeso (GO). Não foi observada alteração em todos os parâmetros avaliados que foram: leucócitos, plaquetas, hemácias, hemoglobina e hematócrito, conforme ilustrado na Figura 11.

**Figura 11.** Parâmetros hematológicos dos camundongos do grupo controle (n = 17) e do grupo obeso (n = 12). (A) leucócitos; (B) plaquetas; (C) hemácias; (D) hemoglobina; (E) hematócrito. Test *t*.

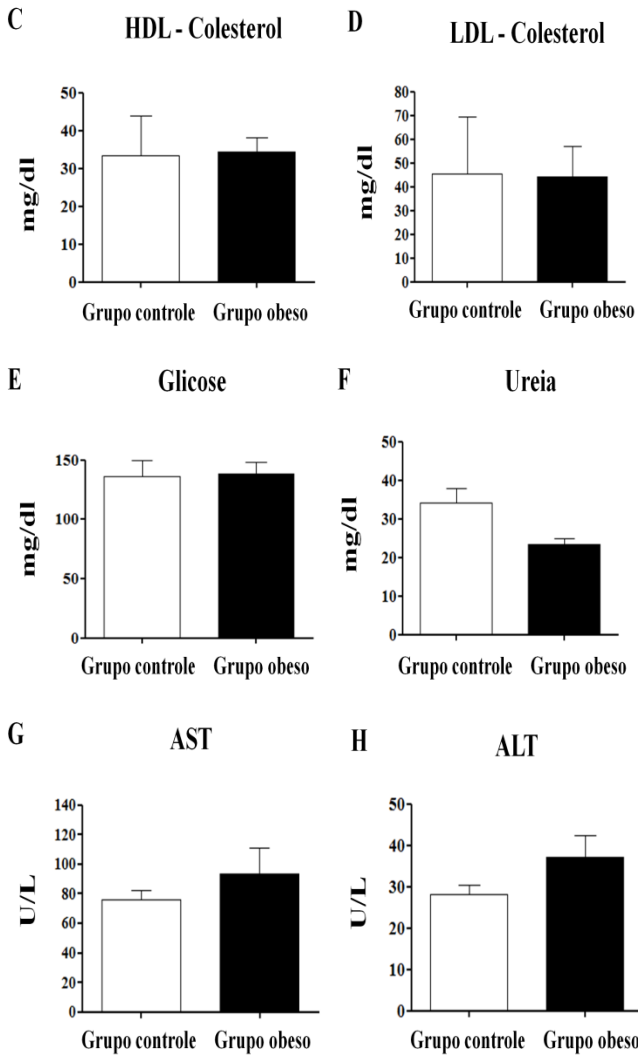


A avaliação dos parâmetros bioquímicos nesta fase do modelo experimental visou avaliar a influência da dieta hiperlipídica no metabolismo dos animais do grupo obeso. Os resultados mostram que houve diferença significativa na concentração de triacilglicerol no grupo obeso (GO) quando comparado com o grupo controle (GC) (GC:  $101,2 \pm 9,08$  mg/dl *versus* GO:  $73,89 \pm 6,54$  mg/dl) (Figura 12B). Os outros parâmetros analisados, tal como, Lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), Lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), colesterol, glicose, ureia, Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), do grupo GO, não apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo GC (Figura 12). Os valores de creatinina, avaliados nos dois grupos, foram menores que 0,2 mg/dl por isso não estão ilustrados.

**Figura 12.** Parâmetros bioquímicos dos camundongos do grupo controle (n = 11) e do grupo obeso (n = 14). (A) colesterol; (B) triglicérides; (C) glicose; (D) HDL – colesterol; (E) LDL – colesterol; (F) Ureia; (G) AST; (H) ALT. Test *t*. \*p < 0,05.



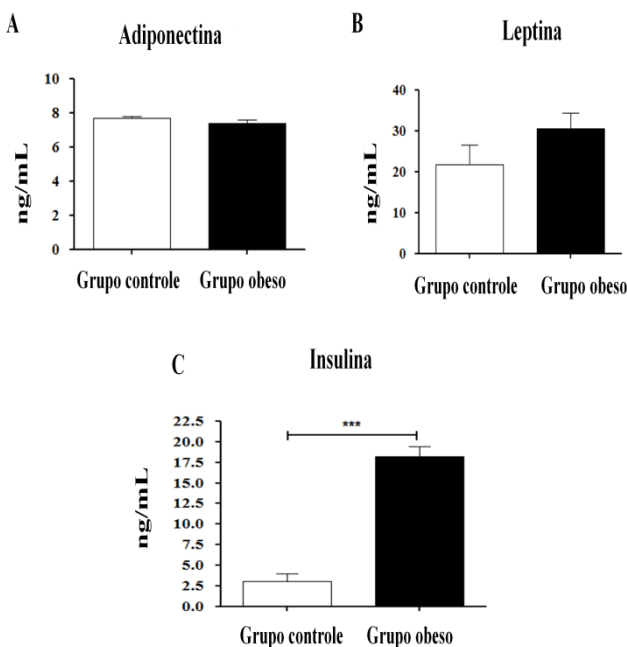




Ainda no soro dos animais, foram avaliadas as concentrações de Adiponectina, Leptina e Insulina. Os resultados das análises das concentrações de adiponectina e

leptina não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,292$  e  $0,231$ , respectivamente) entre o grupo controle (GC) e o grupo obeso (GO) (Figura 13A e 13B). Entretanto, a concentração de insulina apresentou-se elevada no grupo GO em relação ao grupo GC (GC:  $3,073 \pm 0,858$  ng/mL *versus* GO:  $18,19 \pm 1,298$  ng/mL) (Figura 13C).

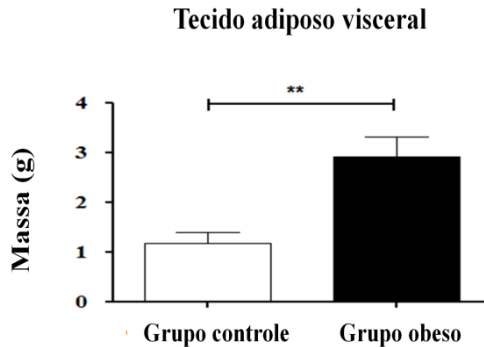
**Figura 13.** Concentração de adiponectina, leptina e insulina dos camundongos do grupo controle ( $n = 7$ ) e grupo obeso ( $n = 7$ ). (A) Concentração de adiponectina; (B) concentração de leptina; (C) concentração de insulina. Test *t*. \*\*\* $p < 0,001$ .



Foi avaliado o volume da massa do tecido adiposo visceral e do fígado que foram retirados dos camundongos do teste piloto. Como está demonstrado na figura 14, observou-se que houve uma diferença significativa entre o volume da massa do tecido adiposo visceral entre o grupo controle (GC) e o grupo obeso (GO). O volume da massa do

fígado de cada grupo (GC e GO) não apresentou diferença significativa (dados não mostrados).

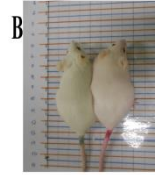
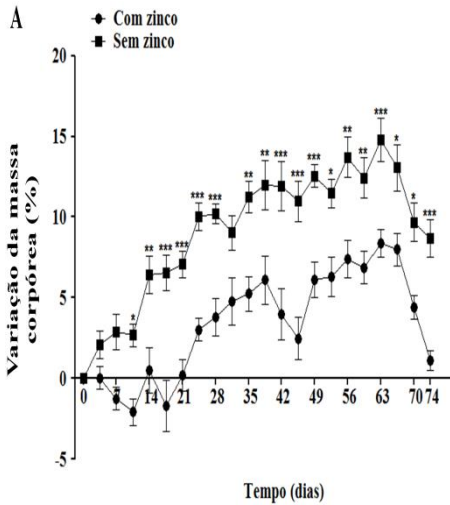
**Figura 14.** Massa do tecido adiposo visceral dos camundongos do grupo controle (n= 4) e do grupo obeso (n= 5). Test *t*. \*\*  $p < 0,01$ .

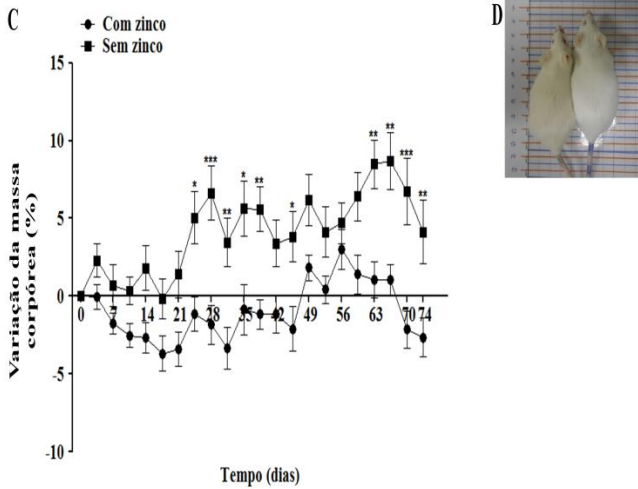


### 5.2.2 FASE DE SOBRECARGA DE CARBOIDRATO NOS GRUPOS GC E GO

Os resultados da variação de massa corpórea dos camundongos mostraram que, em comparação com o grupo controle com zinco, o grupo controle sem zinco apresentou aumento significativo de massa corpórea a partir do 11º dia da segunda fase do experimento até o último dia (controle com zinco:  $-2,07 \pm 0,81\%$  versus controle sem zinco:  $2,69 \pm 0,71\%$ ) (Figura 15A). Também, quando comparamos a variação da massa corpórea do grupo obeso com zinco com o grupo obeso sem zinco, observamos que o grupo obeso sem zinco apresentou aumento significativo a partir do 25º dia da segunda fase do experimento até o último dia (obeso com zinco:  $-1,13 \pm 1,13\%$  versus obeso sem zinco:  $5,04 \pm 1,66\%$ ) (Figura 15C).

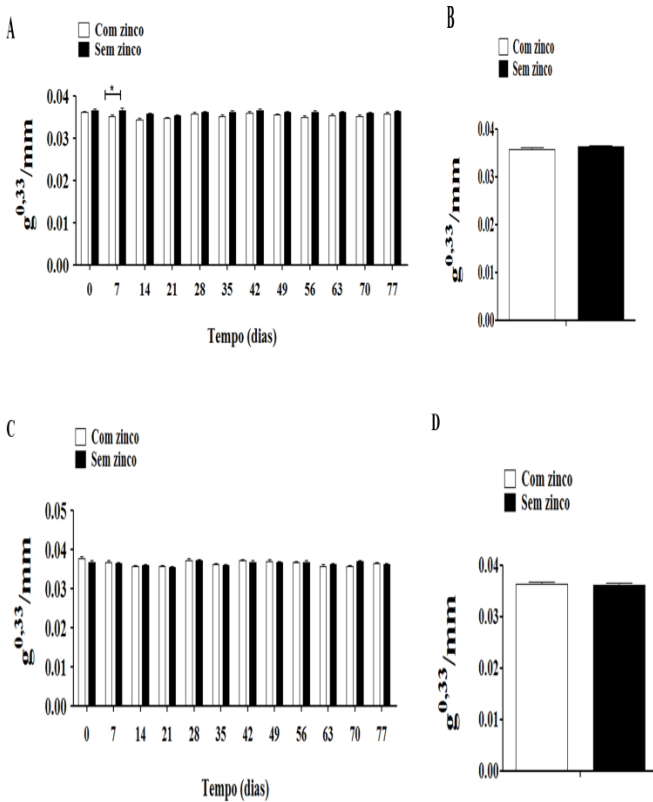
**Figura 15.** Avaliação do volume de massa corpórea dos camundongos do grupo controle com zinco (n = 9) e do grupo controle sem zinco (n = 9), e do grupo obeso com zinco (n = 9) e do grupo obeso sem zinco (n = 9). (A) Variação de massa corpórea do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco. *Two-way ANOVA*; (B) Fotografia representativa dos camundongos do grupo controle com zinco (cauda em verde) e do grupo controle sem zinco (cauda em vermelho); (C) Variação de massa corpórea do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. *Two-way ANOVA*; (D) Fotografia representativa dos camundongos do grupo obeso com zinco (cauda em verde) e do grupo obeso sem zinco (cauda em vermelho). \*p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001 e p< 0,0001.





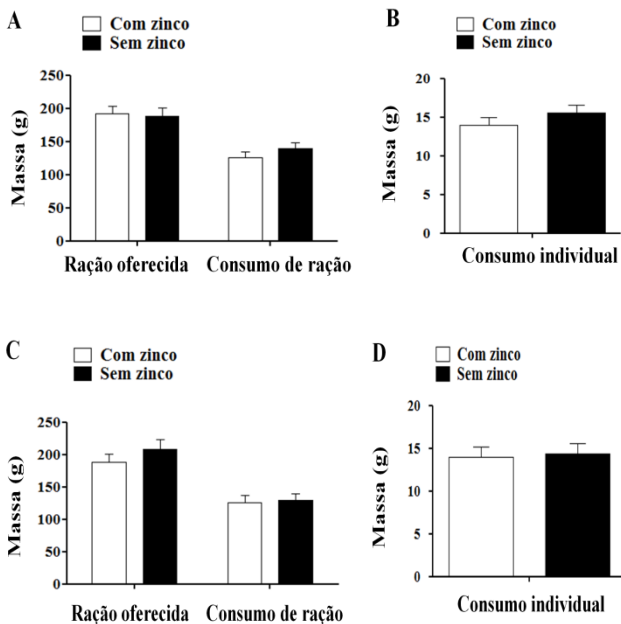
Os resultados da avaliação do índice de Lee mostraram que entre o grupo controle com zinco e o grupo controle sem zinco não houve diferença significativa (Figura 16A); o mesmo foi observado quando comparamos o índice de Lee entre o grupo obeso com zinco e o grupo obeso sem zinco (Figura 16C).

**Figura 16.** Avaliação do índice de Lee dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 9$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 9$ ). (A) Índice de Lee por semana do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco. *Two-way* ANOVA; (B) Índice de Lee do último dia de experimento do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco. Test *t*; (C) Índice de Lee por semana do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. *Two-way* ANOVA; (D) Índice de Lee do último dia de experimento do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. Test *t*.



Os resultados da avaliação do consumo de ração entre o grupo controle com zinco e o grupo controle sem zinco (Figura 17A e 17B), e entre o grupo obeso com zinco e o grupo obeso sem zinco, não mostraram diferença significativa (Figura 17C e 17D).

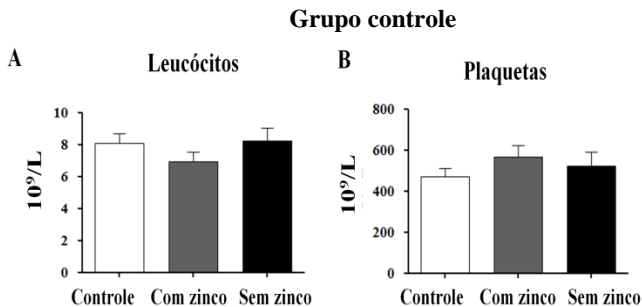
**Figura 17.** Avaliação do consumo de ração dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 9$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 9$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 9$ ). (A) Consumo de ração do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (B) Consumo individual de ração do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (C) consumo de ração do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco; (D) Consumo individual de ração do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem. Test  $t$ .



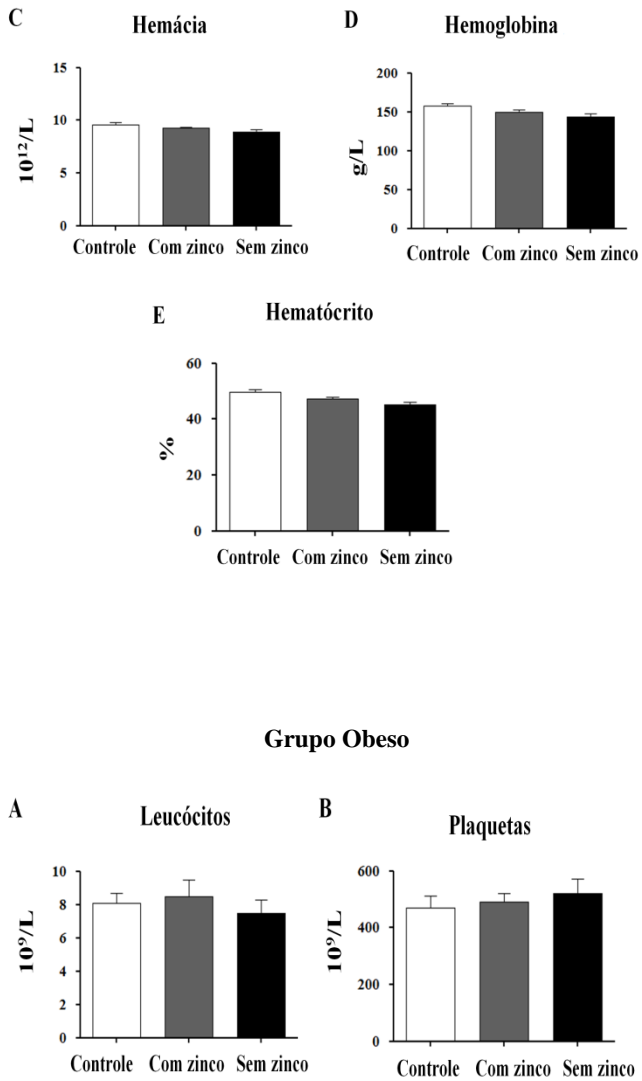
Os resultados dos parâmetros hematológicos, quando comparamos o grupo controle com zinco e o grupo controle

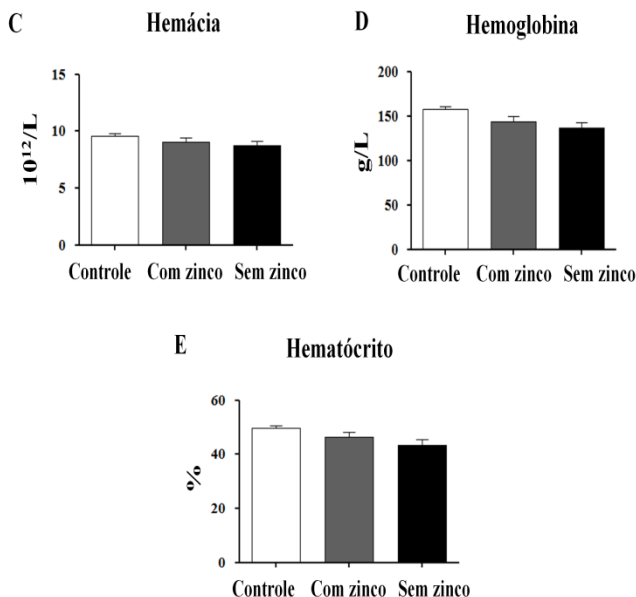
sem zinco, e quando comparamos o grupo obeso com zinco e o grupo obeso sem zinco, observamos que não houve alteração nos parâmetros analisados compreendendo a contagem de leucócitos, plaquetas e hemácias, bem como concentração de hemoglobina e hematócrito dos animais (Figura 18).

**Figura 18.** Parâmetros hematológicos dos camundongos do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco, e do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. (A) leucócitos; (B) plaquetas; (C) hemácias; (D) hemoglobina; (E) hematócrito. *One-way ANOVA*.



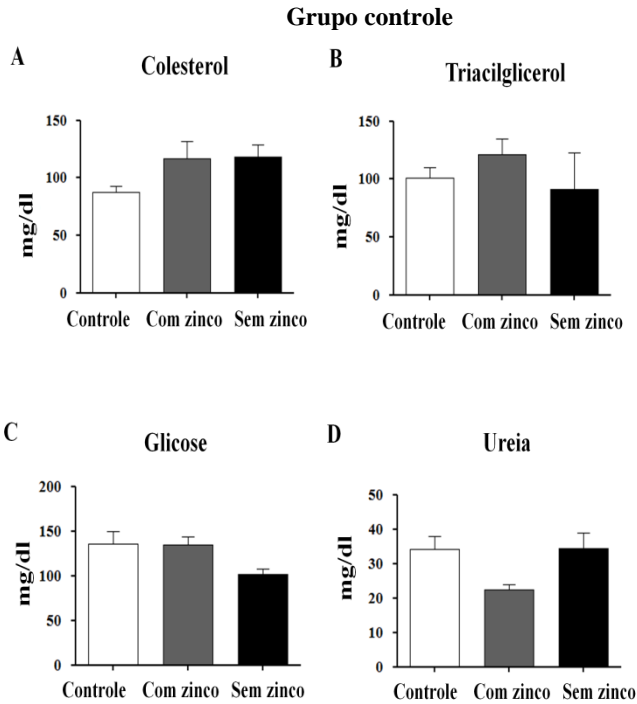


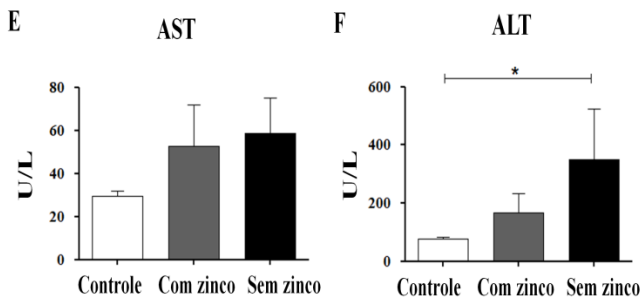
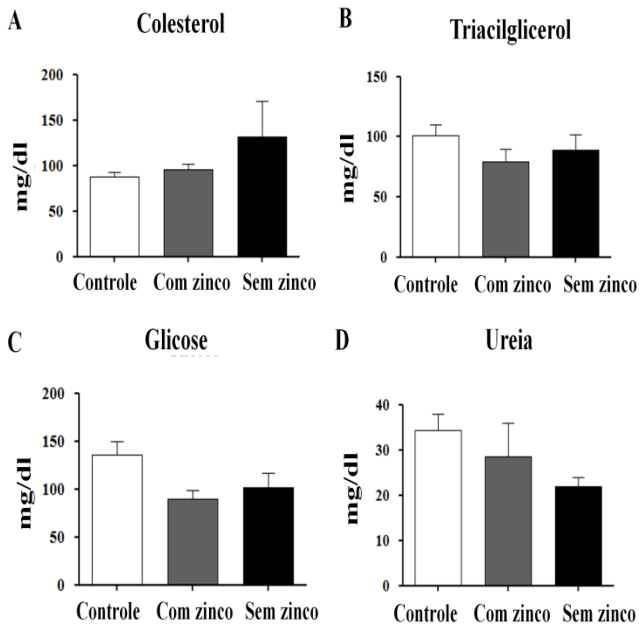


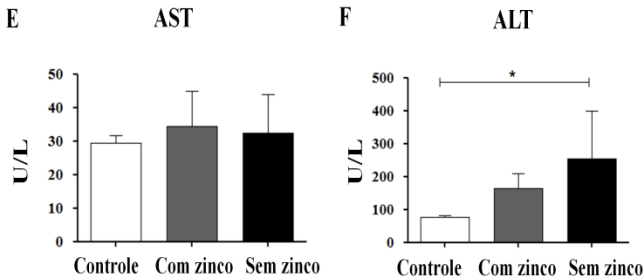


Os resultados dos parâmetros bioquímicos, nesta fase demonstraram uma diferença significativa da concentração do Aspartato aminotransferase (AST) quando comparamos do grupo controle com o grupo controle sem zinco (grupo controle:  $76,33 \pm 5,850$  mg/dl *versus* grupo controle sem zinco:  $349,5 \pm 175,5$  mg/dl) (Figura: grupo controle 19F), e quando comparamos o grupo controle com o grupo obeso sem zinco (grupo controle:  $76,33 \pm 5,850$  mg/dl *versus* grupo obeso sem zinco:  $254,0 \pm 146,0$  mg/dl) (Figura: grupo obeso 19F).

**Figura 19.** Parâmetros bioquímicos dos camundongos do grupo controle com zinco (n = 2) e do grupo controle sem zinco (n = 2), e do grupo obeso com zinco (n = 2) e do grupo obeso sem zinco (n = 2). (A) colesterol; (B) triglicérides; (C) glicose; (D) Ureia; (E) AST; (F) ALT. *One-way ANOVA.* \* p < 0,05.



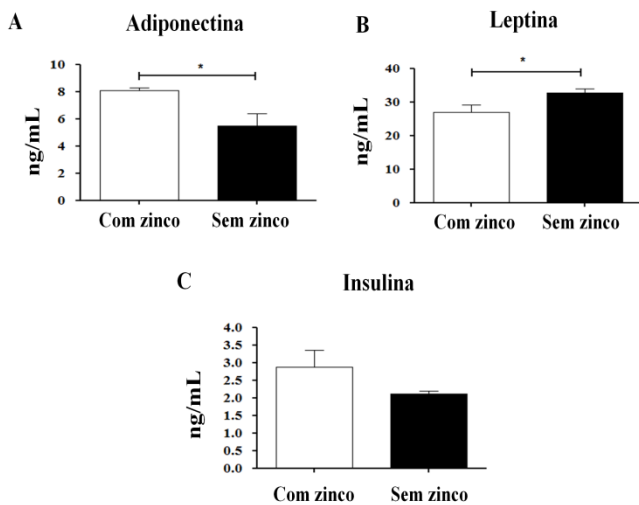
**Grupo obeso**

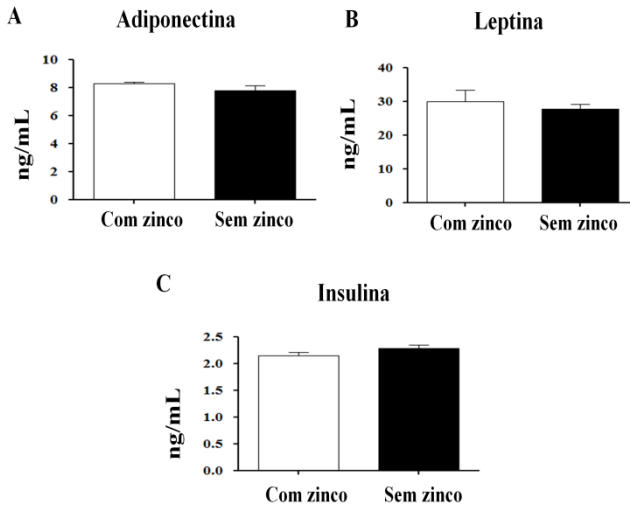


Com relação às adipocinas avaliadas (adiponectina e leptina), quando comparamos o grupo controle com zinco e o grupo controle sem zinco, os resultados mostraram apresentar alterações significativas da concentração da adiponectina, onde o grupo controle sem zinco está reduzido (controle com zinco:  $8,081 \pm 0,2193$  ng/mL *versus* controle sem zinco:  $5,488 \pm 0,9001$  ng/mL) (Figura: grupo controle 20A) e da concentração da leptina, onde o grupo controle sem zinco está aumentado (controle com zinco:  $26,98 \pm 2,253$  ng/mL *versus* controle sem zinco:  $32,81 \pm 1,021$  ng/mL) (Figura: grupo controle 20B). Já a concentração de insulina não apresentou diferença significativa entre o grupo controle com zinco e o grupo controle sem o zinco (Figura: grupo controle 20C). E quando avaliamos os resultados da concentração da adiponectina, da leptina e da insulina, observou-se que não houve diferença significativa quando comparamos o grupo obeso com zinco e o grupo obeso sem zinco (Figura: grupo obeso 20A, 20B e 20C, respectivamente).

**Figura 20.** Concentração da adiponectina, leptina e insulina dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 2$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 2$ ). (A) Concentração de adiponectina; (B) Concentração de leptina; (C) Concentração de insulina. Test  $t$ . \*  $p < 0,05$ .

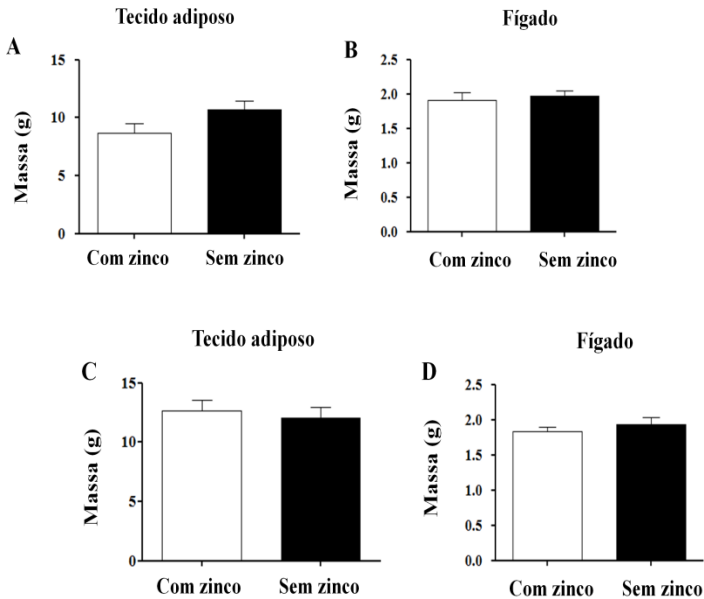
### Grupo controle



**Grupo obeso**

O volume da massa do tecido adiposo e o fígado foram avaliados. Nos resultados obtidos observou-se que, quando comparamos o grupo controle com zinco com o grupo controle sem zinco (Figura 21A – tecido adiposo – e 21B – fígado), e quando comparamos o grupo obeso com zinco com o grupo obeso sem zinco (Figura 21C – tecido adiposo – e 21D – fígado), não apresentam diferença significativa.

**Figura 21.** Volume da massa do tecido adiposo e do fígado dos camundongos do grupo controle com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo controle sem zinco ( $n = 2$ ), e do grupo obeso com zinco ( $n = 2$ ) e do grupo obeso sem zinco ( $n = 2$ ). (A) Volume da massa do tecido adiposo do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (B) Volume da massa do fígado do grupo controle com zinco e do grupo controle sem zinco; (C) Volume da massa do tecido adiposo do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco; (D) Volume da massa do fígado do grupo obeso com zinco e do grupo obeso sem zinco. Test  $t$ .





## 6. DISCUSSÃO

Devido a diversas interações diretas do zinco no metabolismo de carboidratos e lipídeos (WIJESEKARA, CHIMIANTI & WHEELER, 2009) e fato de que pacientes obesos apresentam baixas concentrações plasmáticas deste mineral (XANTHAKOS, 2009; KAIDAR-PERSON, 2008), foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo* na tentativa de elucidar o papel do zinco na adipogênese e no metabolismo de carboidratos em diferentes situações metabólicas. Vimos que *in vitro*, o zinco favorece a diferenciação celular (acúmulo de lipídeos intracelular) de células pré-adipócitas, e *in vivo*, reflete em menor ganho de massa corpórea após sobrecarga de carboidrato, melhorando as concentrações plasmáticas de adiponectina e reduzindo as de insulina.

A adipogênese é o processo de proliferação e de diferenciação do tecido adiposo. Para elucidar este processo *in vitro*, tem se utilizado células da linhagem 3T3-L1, que são pré-adipócitos do tipo fibroblástico, provenientes de embriões murinos (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2009). Estas células tem sido extensivamente estudadas. Filippin-Monteiro e colaboradores (2010) utilizaram estas células para identificar a ação inflamatória e a indução de resistência à insulina pela proteína inflamatória amiloide sérica A (SAA). Os autores verificaram que a presença dessa proteína impediu a diferenciação de pré-adipócitos evidenciado pelo menor acúmulo de triacilgliceróis intracelulares. Esta menor diferenciação foi comprovada pela diminuição da expressão de genes adipogênicos incluindo o gene que codifica o receptor GLUT4. Mais recentemente, Oliveira et al. (2015) utilizaram as células 3T3-L1

para examinar o efeito da triiodotironina (na ausência e em diferentes concentrações) sobre a expressão dos genes que codificam a leptina e a adiponectina em diferentes períodos de tempo a fim de avaliar a diferença de expressão entre as duas adipocinas.

Neste trabalho, verificou-se, inicialmente o processo de proliferação celular da 3T3-L1 na ausência e na presença de zinco. Como o objetivo não foi diferenciá-las, mas manter as características fibroblásticas sem acúmulo de lipídeos intracelulares, o meio de cultura que foi usada para plaquear as células, foi suplementado com 10% de CS, que contém abundantes fatores de crescimento. Estas células foram tratadas, com DMEM suplementado com 10% CS exposto a resina Chelex® e suplementada com zinco em diferentes concentrações. Para garantir concentrações baixas de zinco nos soros de cultura celular (CS e SFB) que foram utilizados nestes experimentos, utilizou-se a resina Chelex® 100 que captura esse mineral. A remoção do zinco com a resina foi eficaz reduzindo as concentrações de zinco nos soros em cerca de 80%. Essa eficácia é devido a seletividade que a resina tem para cátions divalentes em um pH de 6,5 ou superior. É uma resina que sequestra metais que mantém as concentrações de outros constituintes não metálicos dos soros de cultura intactos (REAVES et al.,2000).

Nos resultados obtidos na viabilidade celular de pré-adipócitos 3T3-L1 com azul de tripan, verificou-se um aumento na densidade celular das amostras suplementadas com zinco (2 µg/mL e 4 µg/mL) após 24 h de tratamento. Entretanto, na ausência deste metal, obteve-se discreta diminuição. Estes achados foram confirmados com análise morfológica por fluorescência, nas mesmas condições acima citadas. As sondas fluorescentes (laranja de acridina e brometo de etídio), marcadoras de morte celular, não evidenciaram morte celular por necrose ou apoptose na presença de zinco, tampouco na ausência deste. É possível que a realização da análise de viabilidade celular em um maior período de tempo de tratamento, como 36 ou 48 h,

poderia revelar um maior aumento na proliferação das células suplementadas com zinco. Tal hipótese foi levantada pelo fato de que na análise do ciclo celular por citometria de fluxo, obteve-se uma diminuição significativa da porcentagem de células na fase S quando na ausência de zinco. Ainda, observou-se um aumento significativo das células suplementadas com zinco nas concentrações de 2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$  na fase S do ciclo celular, onde ocorre a síntese de material genético, dos filamentos de cromatina, além da síntese de histonas e a duplicação dos centríolos, imprescindíveis para a proliferação celular (BEHL & ZIEGLER, 2014). Estes achados sugerem que o aumento da concentração de zinco estimula a progressão do ciclo celular, que por sua vez, aumenta a divisão celular, ou seja, estimula a proliferação celular.

A interferência do zinco na proliferação celular também foi relatada por Ghosh e colaboradores (2013), onde utilizaram o zinco quelado a vitamina C (ZNC) para verificar o potencial efeito deste sobre a proliferação e a citotoxicidade das células 3T3-L1 após 24 e 48 h de tratamento em diferentes concentrações (0, 0,012 e 0,025 mg/mL). Os autores verificaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, observou-se um discreto aumento das células tratadas após 48 h, quando comparadas com as células sem o ZNC.

As células da linhagem 3T3-L1 também são utilizadas para avaliar a capacidade das células em amadurecerem de pré-adipócitos para adipócitos ricos em triacilgliceróis intracelulares. Este processo de amadurecimento consiste no desenvolvimento da capacidade de pré-adipócitos realizarem lipogênese (síntese de ácidos graxos) a partir da glicose captada do meio de cultura, por meio da insulina presente no meio de diferenciação (MDI). A presença de constituintes importantes no MDI garante o processo de diferenciação. A insulina, em concentrações farmacológicas ( $\mu\text{M}$ ), liga-se ao

receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). Ainda no MDI, a dexametasona (DEX) ativa receptores glicocorticoides e a isobutilmetilxantina (IBMX) inibe fosfodiesterases competitivamente aumentando o cAMP intracelular. A junção destas diversas ações leva a ativação de eventos transcripcionais essenciais para a diferenciação celular (FARMER, 2006). Os fatores de transcrição ativados neste processo são os C/EBP- $\beta$  e C/EBF- $\delta$  (proteínas  $\beta$  e  $\delta$  ligantes ao amplificador CCAAT) que ativam a expressão dos fatores de transcrição C/EBP- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  (receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissomas) que por sua vez, induzem transcrição de genes-alvos, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e manutenção do fenótipo do adipócito, como as envolvidas no transporte de glicose sensível à insulina, lipogênese, lipólise e síntese e secreção de adipocinas (FARMER, 2006; KIESS et al., 2008; FONSECA-ALANIZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2009; MERUVU, HUGENDUBLER & MUELLER, 2011).

Neste trabalho, os resultados da diferenciação celular mostram que houve um aumento da absorvância do eluato do corante para triacilglicerol intracelulares das células suplementadas com zinco (1  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ ), mostrando assim que houve uma maior proporção de células que se diferenciaram, nestas concentrações de zinco, em relação ao controle. Estes achados sugerem que a presença de zinco facilitou o acúmulo de triacilglicerol intracelular, possivelmente auxiliando na captação de glicose. Nossos resultados estão de acordo com o que foi pesquisado por Tanaka et al. (2001). No intuito de verificar se a suplementação de zinco no rebanho melhora a qualidade da carne bovina marmorizada, estes pesquisadores avaliaram a relação da concentração sérica de zinco e marmoreio ou atividade adipogênica, e também o efeito do zinco na diferenciação celular. Os autores utilizaram pré-adipócitos 3T3-L1 que foram cultivadas com 1  $\mu\text{M}$  de cloreto de zinco, 5% de SFB, com ou sem 5  $\text{g/mL}$  de insulina. Verificaram

que o zinco promovia a diferenciação destas células *in vitro* na ausência de insulina, e na presença de insulina, havia um maior aumento do processo. Estes achados devem-se, provavelmente, pelo fato de que o zinco estimula os receptores de insulina tirosina cinase, aumentando a translocação dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) para a membrana celular, aumentando assim, a captação de glicose pelas células, tal como a teoria de Marreiro e colaboradores (2002), que foi citada por Leão e Santos (2012). No trabalho de Myers e colaboradores (2013), o papel do Zip7, um tipo de transportador de zinco que regula a sua concentração citosólica, na regulação do controle glicêmico no músculo esquelético, foi verificado. Os autores utilizaram os mioblastos C2C12 e bloquearam o Zip com siRNA. Verificaram que houve uma redução da expressão do GLUT4 e a síntese de glicogênio estimulada por insulina foi diminuída. Isto foi associado com uma redução na expressão de mRNA de Insr, IRS1 e Irs2 (substratos do receptor de insulina) e a fosforilação da Akt, comparando com os resultados do controle.

Com o intuito de verificarmos o papel do zinco e sua ausência no metabolismo de carboidratos, realizou-se estudos *in vivo* utilizando-se camundongos *Swiss webster*, por serem espécies não isogênicas, se assemelhando com a adversidade populacional e por ser um bom modelo animal de indução de obesidade, tal como mostra o trabalho realizado por White e colaboradores em 2013. A dieta hiperlipídica e hipercalórica utilizada neste trabalho e o modelo animal de indução de obesidade foram testados. Para este teste, utilizou-se 9 camundongos de 6 semanas de vida, que foram divididos em grupo controle (GC, n = 4) que consumiu dieta normolipídica e grupo obeso (GO, n = 5) que consumiu a dieta hiperlipídica durante 5 semanas. Verificou-se que tanto a dieta como o modelo de obesidade foram apropriadas para este trabalho. Os animais do grupo grupo obeso (peso

final:  $2,918\% \pm 0,387$ ) não rejeitaram a dieta e tiveram um aumento significativo do peso quando comparação com o grupo controle (peso:  $1,168 \pm 0,231\%$ ).

Na fase de indução da obesidade, verificou-se um aumento significativo do peso, do índice de Lee e do consumo de ração no grupo obeso, em relação ao grupo controle. O consumo de ração é um aspecto crucial no estabelecimento de um modelo de obesidade, pois nem sempre resultados satisfatórios são alcançados. No trabalho realizado por Santos em 2013, o grupo que consumiu dieta hiperlipídica consumiu menos ração em comparação com os outros grupos, porém, a sua variação de peso e o índice de Lee foram maiores. Provavelmente, este aumento do consumo desta ração seja devido a presença de sacarose que a tornou mais palatável e o aumento de peso seja pela carga energética maior.

O modelo de indução da obesidade também foi avaliado quanto aos aspectos hematológicos e bioquímicos dos animais após os 3 meses. Os parâmetros hematológicos não sofreram alterações, mostrando assim que o grupo obeso não apresentou doença provocada pela dieta consumida, tal como anemia. Entretanto, nos parâmetros bioquímicos obteve-se uma diminuição na determinação de triacilglicerol do grupo obeso.

Uma vez estabelecido o modelo de indução da obesidade, a etapa seguinte consistiu na subdivisão dos grupos grupo obeso e grupo controle em dois grupos, perfazendo um total de quatro grupos. Dois grupos receberam sobrecarga de carboidratos com concentrações adequadas de zinco (grupo controle com zinco e grupo obeso com zinco) e os outros dois, sobrecarga de carboidratos em condições de deficiência de zinco (grupo controle sem zinco e grupo obeso sem zinco).

Na fase de sobrecarga de carboidratos, os grupos em condições de deficiência de zinco, tanto obesos quanto não obesos, mostraram um aumento na variação da massa corpórea. Os grupos que receberam zinco perderam massa

corpórea de maneira significativa. No intuito de estudar a relação entre o zinco e a obesidade, Bock e colaboradores, em 1995, avaliaram os resultados da adiposidade de ratos que receberam uma solução de sacarose a 32% e uma dieta com baixo teor de zinco, em relação com os animais que receberam a mesma solução, porém com depleção de zinco. Foi verificado que o grupo que recebeu baixo teor de zinco desenvolveu maior adiposidade em relação ao grupo que recebeu zinco (BOCK, 1995). No presente trabalho, as alterações da massa corpórea dos animais de todos os grupos foram confirmadas com a determinação do índice de Lee. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle (grupo controle com zinco e o grupo controle sem zinco) e os grupos obesos (grupo obeso com zinco e o grupo obeso sem zinco). Nesta fase do experimento, os parâmetros hematológicos também não apresentaram alterações nos quatro grupos mesmo com as alterações de ração ou gavagem diária.

Uma das características da obesidade é quadro inflamatório crônico e o aumento do tecido adiposo, levando assim, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a redução de citocinas anti-inflamatórias levando a uma disfunção metabólica. A insulina, a leptina e a adiponectina são marcadores importantes da obesidade. Neste quadro a concentração de insulina e a leptina encontram-se elevadas e a concentração da adiponectina reduzida (SILVA et al., 2003).

Neste trabalho também foi avaliado a concentração de insulina, leptina e adiponectina, e na fase de sobrecarga de carboidrato, também foi avaliado o volume da massa do TA e do fígado. Verificamos que na fase da indução de obesidade, não houve diferença na concentração de adiponectina e de leptina entre os grupo controle e o grupo obeso. Porém, o grupo obeso apresentou uma concentração de insulina maior que o grupo controle. E na fase da sobrecarga de carboidratos, verificamos que o grupo controle com zinco apresentou um aumento na concentração de adiponectina, e uma diminuição da concentração de leptina,

em relação ao grupo controle sem zinco; e os grupos obeso não apresentara diferenças.

No trabalho do Santos em 2013, foi estudada a função de macrófagos peritoniais de camundongos *Swiss* submetidos à dieta hipoprotéica e hiperlipídica. Os camundongos foram separados em três grupos: controle, hipoprotéico e hiperlipídico. Além de avaliar o quadro nutricional, o TA e a função dos macrófagos peritoniais, foram avaliados também as concentrações séricas de leptina, adiponectina e insulina. Observou-se não haver alteração na concentração de insulina entre o grupo controle e o grupo hiperlipídico. Na concentração de leptina observaram concentrações mais elevada no grupo hiperlipídico em comparação com o controle, e as concentrações de adiponectina estavam reduzidas em relação ao grupo controle.

Observamos que o volume da massa do TA, na primeira fase foi significativamente maior no grupo obeso. E na segunda fase, não houve diferença significativa entre o grupo controle com zinco e o grupo controle sem zinco, e entre o grupo obeso com zinco e o grupo obeso sem zinco.

## 7. CONCLUSÃO

Neste contexto, concluímos que o zinco promoveu a proliferação e a diferenciação celular de adipócitos 3T3-L1, e a progressão do ciclo celular evidenciado pelo maior proporção de células na fase S. Ainda, a presença de zinco facilitou o acúmulo de triacilgliceróis intracelulares em pré-adipócitos 3T3-L1. Além disso, a ausência de zinco promoveu a perda da capacidade das células se diferenciarem, provavelmente pela diminuição da captação de glicose.

O modelo murino de indução da obesidade (*Swiss*) se mostrou eficiente devido ao ganho de massa corpórea, aumento da adiposidade e aumento da concentração de insulina sem promover alterações relevantes nos parâmetros



bioquímicos e hematológicos. E na sobrecarga de carboidratos, tanto em animais obesos quanto em não obesos, promoveu menor ganho de massa corpórea naqueles animais suplementados com zinco. Ainda, as maiores diferenças de massa corpóreas foram observadas no grupo de animais não obesos.

Na sobrecarga de carboidratos ainda houve uma diminuição das concentrações de adiponectina e um aumento da leptina em animais não obesos com deficiência de zinco.

Apesar de não haver diferença significativa nos marcadores do metabolismo, os animais suplementados com concentrações adequadas de zinco parecem melhor tolerar a sobrecarga de carboidratos.

## 8. REFERÊNCIAS

BASTARD, J. P. et al. **Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance.** European cytokine network. v 17, n 1, p. 4 – 12, 2006.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M; ARÊAS, J. A. G. **Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade.** Arq. Bras. Endocrinol. Metab. v 53, n 5, p. 646 – 56, 2009

BEHL, C.; ZIEGLER, C. **Cell aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease.** Springer. p. 34. 2014.

BOCK, B.C; KANAREK, R.B; APRILLE,J.R. **Mineral content of the diet alters sucrose-induced obesity in rats.** Physiology of Behavior, v. 57, p. 659-668, 1995.

BULLÓ, M. et al. **Inflammation, obesity and comorbidities: The role of diet.** Public Health Nutrition. v 10, n 10A, p. 1164-1172, 2007.

CABALLERO, B. **The global epidemic of obesity: Na overview.** Epidemiologic Reviews. v 29, p. 1-5, 2007.

CAMARGOS, R. N. **Obesidade e seus desdobramentos subjetivos.** 2009. 40 f. Monografia (Graduação em Psicologia). Faculdade de Ciências da Saúde, Universitário de Brasília. Brasília - DF.

CAMPOS, L. V. A. **Efeitos do exercício físico de baixa intensidade em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos.** 2009. 18 f. Monografia (Graduação em Educação Física). Faculdade de Educação

Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG.

COMINETTI C. **Avaliação do estudo nutricional relativo ao zinco de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica (gastroplastia com derivação em Y de Roux)**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, M. C. et al. **Adiponectina e baixo risco cardiometabólico em obesas**. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. v 55, n 2, p. 146 – 154, 2011.

CRUZ J. B. F.; SOARES H. F. **Uma revisão sobre o zinco**. Ensaios e ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde. Universidade Anhanguera. Brasil. v 15, p. 207 – 222, 2011.

DELGADINHO, M. J. C. **Distúrbios do metabolismo do cobre, ferro e zinco**. 2014. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Food and Nutrition Board. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, Cooper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc**. National Academy of Sciences: Washington. p. 1 – 773, 2001.

ECKARDT, K. et al. **The adipokine zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein activates AMP kinase in human primary skeletal muscle cells**. Archives of Physiology and Biochemistry. v 117, n 2, p. 88 – 93, 2011.

ERDMANN A. **Efeito da suplementação de zinco em indivíduos obesos**. 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

FANDIÑO J. et al. **Cirurgia bariátrica: aspectos clínico-cirúrgicos e psiquiátricos**. Rer. Psiquiatr. v 26, p. 47-51, 2004.

FARMER S. R. **Transcriptional control of adipocyte formation**. Cell Metabolism. v 4, n 4, p. 263-273, 2006.

\_\_\_\_\_. **Obesity: Be cool, lose weight**. Nature. v 458, n 16, p. 839 – 840, 2009

FEITOSA M. C. P.; LIMA V. B. S.; MARREIRO D. N. **Inflamação e metabolismo do zinco**. Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. v. 37, p. 93-104, 2012.

FERREIRA, L. M.; HACHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. **Experimental models in research**. Acta Cir Bras. v. 20 (suppl. 3), p. 28 – 34, 2005.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. F. **Papel da amilóide sérica A (SAA) nos processos de proliferação e diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1**. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Farmácia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FONSECA-ALANIZ M. H. et al. **O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo**. Arq Bras Endocrinol Metab. v 50, n 2, p. 216-229, 2006.

\_\_\_\_\_. **O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática**. Jornal de Pediatria. v 83 (5supl), p. S192-203, 2007.

FRESHNEY, R. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. New York, Alan R. Liss. Inc., p. 117, 1987.

GHOSH, C. et al. **Zinc-chelated vitamin C stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells**. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. v 26, n 8, p. 1189 – 1196, 2013.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. **Understanding adipocyte differentiation**. Physiol Ver. v. 78, p. 783 – 809, 1998.

GREGOR, M. F.; HOTAMISGIL, G. S. **Inflammatory mechanisms in obesity**. Annu Rev Immunol. v. 29, p. 415 – 445, 2011.

GUIMARÃES, D. E. D. et al. **Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo**. Rev Nutr. Campinas. v 20, n 5, p. 549 – 559, 2007.

HENRIKSEN, E. J.; DIAMOND-STANIC, M. K.; MARCHIONNE, E. M. **Oxidative stress and rtiology of insulin resistance and type 2 diabetes**. Radic Biol Med. v 51, n 5, p. 993 – 999, 2011.

HAMBIDGE at al. **Dietary reference intakes for zinc may require adjustment for phytate intake based upon**. J Nutr. v 138, p. 2363 – 2366, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. **Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013.

KANTER R.; CABALLERO B. **Global gender disparities in obesity: A review**. Adv. Nutr. v 3, p. 491-492, 2012.

KAIDAR-PERSON, O. et al. **Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: A new form of malnutrition?** Obesity Surgery. v 18, n 8, p. 1028 – 1034, 2008.

KENNEDY, M. L.; FAILLA, M. **Zinc metabolism in genetically obese (*ob/ob*) mice**. J Nutr. v 117, p. 886 – 893, 1987.

KIESS, W. et al. **Adipocytes and adipose tissue**. Best Prac Res Clin Endocrinol Metabol. v 22, p. 135 – 153, 2008

LEÃO A. L. M.; SANTOS L. C. D. **Consumo de micronutrientes e excesso de peso: existe relação?** Rev Bras Epidemiol. v 15, p. 85-95, 2012.

LIMA, F. B. **Tecido adiposo: Uma breve perspectiva histórica e o momento atual**. Arq Bras Endocrinol Metab. v 52, n 6, p. 927 – 928, 2008.

LIU M. J. et al. **Zinc deficiency augments leptin production and exacerbates macrophage infiltration into adipose tissue in mice fed a high-fat diet**. The Journal of Nutrition. v 143, n 7, p. 1036 – 1045, 2013.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. **Impartância do zinco na nutrição humana**. Rev Nutr, Campinas. v. 17, p. 79 – 87, 2004.

MARREIRO, D. N. et al. **Participação do zinco na Resistência à insulina**. Arq Bras Endocrinol Metab. v 48, n 2, p. 234 – 239, 2004.

MARREIRO, D. N.; FISBERG, M.; COZZOLINO, S. M. F. **Zinc nutritional status in obese children and adolescents**.

Biological trace element research. v 86, n 2, p. 107 – 122, 2002.

MARTINS, L. M. **Relação entre as concentrações de cortisol e o metabolism do zinco em mulheres obesas mórbidas.** 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MERUVU, S.; HUGENDUBLER, L.; MUELLER, E. **Regulation of adipocyte differentiation by the zinc finger protein ZNF638.** Journal of Biological Chemistry. v 286, n 30, 26516 – 26523, 2011.

MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. K. **Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules.** Int. J. Mol. Sci. v 124, n 17, p. 1 – 24, 2016.

MOULIN, C. M. et al. **Impact of adiposity on immunological parameters.** Arq Bras Endocrinol Metab. v 53, n 2, p. 183 – 189, 2009.

MYERS,S. A. et al. **The zinc transporter, *Slc39a7 (Zip7)* is implicated in glycaemic control in skeletal muscle cells.** PLoS ONE. v 8, n 11, p. e79316, 2013.

NEVES, S. M. P. et al. **Manual de cuidados e procedimento com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP.** São Paulo. p. 1 – 216, 2013.

NTAMBI J. M.; YOUNG-CHEUL K. **Adipocyte differentiation and Gene Expression.** The Journal of Nutrition. v 130, n. 12, p. 3122S-3126S, 2000.

OLIVEIRA, M. et al. **Triiodotironina modula a expressão de leptina e adiponectina em adipócitos 3T3-L1.** Einstein. v 13, p. 72 – 78, 2015.

OUCHIN, N. et al. **Adipokines in inflammation and metabolic disease.** Nat Rev Immunol. v 11, n 2, p. 85 -97, 2011.

PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. **The essential toxin: impact of zinc on human health.** Int J Environ ResPublic Health. v. 7, p. 1342 – 1365, 2010

QIAN, S. W. et al. **Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow.** BMC Devel Biol. v 47, n 10, p. 1 – 11, 2010.

QUEIROZ J. C. F. D. et al. **Controle da adipogênese por ácidos graxos.** Arq Bras Endocr Metab. v 53, n 5, p. 582-594, 2009.

REAVES, S. K. et al. **Expression of the p53 tumor suppressor gene is up-regulated by depletion of intracellular zinc in HepG2 cells.** J Nutr. v 130, p. 1688 – 1694, 2000.

REEVES, P. G. **Symposium: Animal diets for nutritional and toxicological research.** J Nutr. v 127, p. 838S – 841S, 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, 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.** J Nutr. v. 123, p. 1939 - 1951, 1993.

REPETT, G.; RIZZOLLI, J.; BONATTO, C. **Prevalência, risco e soluções na obesidade e sobrepeso: Here, There,**



**and Everywhere.** Arq Bras Endocrinol Metab. v 47, n 6, p. 633 – 635, 2003.

ROSA G. et al. **Tecido adiposo, hormônios metabólicos e exercício físico.** Ver Andal Med Deporte. v 6, n 2, p. 78 – 84, 2013.

SANTOS, E. W. C. O. **Estudo da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica.** 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, L. C.; TORRENT I. F. **O tecido adiposo e a produção de adipocinas.** Syn Thesis Revista digital FAPAM. Pará de Minas. v 2, n 2, p. 110 – 119, 2010.

SENA, K. C. M.; PEDROSA, L. F. C. **Efeito da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes.** Ver Nutr. Campinas. v 18, n 2, p. 251 – 259, 2005.

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. **The role of TNF $\alpha$  in adipocyte metabolism.** Seminars in Cell & developmental biology. v. 10, p. 19 – 29, 1999.

SILVA, J. V. et al. **Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlation with insulin resistance.** Eur J Endocrinol. v 149, p. 331 – 335, 2003.

SILVA, L. S. V. et al. **Micronutrientes na gestação e lactação.** Ver Bras Saúde Matern Infant: Recife. v. 7, n. 3, p. 237 – 244, 2007.

SHENG, X. et al. **Adipocyte differentiation is affected by media height above the cell layer.** Int. J. Obes. v 38, p. 315 – 320, 2014.

SOLOMONS, N. W. **The importance of dietary and environmental zinc for human health can be ignored only at significant peril to child well-being throughout the world.** Ann Nutr Metab. v. 62 (suppl 1), p. 8 – 17. 2013

SOUZA, F. **Indução de obesidade em ratos através do glutamato monossódico. Avaliação biométrica.** 1999. 55 f. Dissertação (Pós-graduação em Clínica Cirúrgica), Setor de Ciências da Saúde, universidade federal do Paraná, Curitiba – Paraná.

TANAKA, S. et al. **Zinc promotes adipocyte differentiation *in vitro*.** Asian-aust J. Anim Sci. v 14, n 7, p. 966 – 969, 2001.

TANG Q. Q.; LANE M. D. **Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte.** Biochemistry. v 81, p. 715-736, 2012.

TAVARES, A. A. S.; TAVARES, J. M. R. S. **Princípios gerais de culturas de células e citometria de fluxo para avaliação dos efeitos da radiação ionizante.** 2009. 29 f. Relatório interno. Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto/Portugal.

VIGITEL BRASIL 2014: **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância da Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde – Brasília: Ministério da Saúde. p. 1 - 152, 2015.

WAJCHENBERG B. L. **Tecido adiposo como glândula endócrina.** Arq Bras Endocrinol Metab. v 44, p. 13 – 20, 2000.

WIJESEKARA, N.; CHIMIANTI, F.; WHEELER, M. B. **Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis.** Diab, Obes Metabol. v 11 (suppl, 4), p. 209 – 214, 2009.

WHITE, P. A. S. et al. **Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à insulina à ação da insulina e tolerância à glicose.** Arq Bras Endocrinol Metab. v 57, n 5, p. 339 – 345, 2013.

**World Health Organization - WHO.** Disponível em: [<http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/obesity\\_text/en/>](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/). Acessado em: 16 de Abril de 2015.

\_\_\_\_\_. Disponível em: [http://gamapserv.who.int/gho/interactive\\_charts/ncd/risk\\_factors/obesity/atlas.html](http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/obesity/atlas.html) >. Acessado em: 04 de Fevereiro de 2016.

XANTHAKOS, S. A. **Nutritional deficiencies in obesity and after bariatric surgery.** Pediatr Clin North Am. v 56, n 5, p. 1105 – 1121, 2009.

YANG L, et al, - **Dihydro cucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37).** Cancer Letters, v. 256, n.2, p.267-278, 2007.

YANG W.; KELLY T.; HE J. **Genetic epidemiology of obesity.** Epidemiol Rev. v 29, p. 49-61, 2007.

## 9. ANEXO

### Anexo A

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/275304c2473aa908325703d...>

#### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00892

**Título**

Avaliação das propriedades antitumorais e antiadipogênicas de compostos sintéticos, semissintéticos e nanoestruturados: estudos agudos e subagudos

**Data de Entrada**

17/10/2013

**Resultado:**

Aprovado

**Data /Prazo**

01/11/2013

**Considerações**

Ofício nº 121/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à). Prof(a) Dr(a) Tânia Beatriz Creczynki Pasa, Departamento de Farmácia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de um mil e seiscentos camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e laboratórios de modelos biológicos.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**

**Data 13/02/2018**

Data 13/11/2013

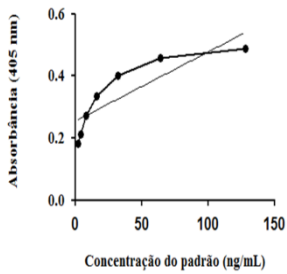
**Parecer(es):**

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

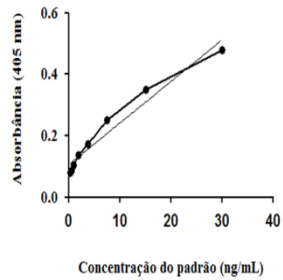
## Anexo B

### Curvas de calibração da adiponectina, leptina e insulina.

Curva de calibração de adiponectina



Curva de calibração de leptina



Curva de calibração da Insulina

