

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTUDO DA ADIPOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMAL  
E INGUINAL DE RATOS *WISTAR* ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM  
CARBOIDRATOS SIMPLES**

**JOANA JULIA ACUÑA CARVALHO**

**Ouro Preto, MG**

**2020**

Joana Julia Acuña Carvalho

**ESTUDO DA ADIPOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSE BRANCO EPIDIDIMAL  
E INGUINAL DE RATOS *Wistar* ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM  
CARBOIDRATOS SIMPLES**

Trabalho apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso- TCC do curso de Nutrição, da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Renata Guerra de Sá

Co-orientadora: Ms. Isabela da Costa Fernandes

**Ouro Preto, MG**

**2020**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C331e Carvalho, Joana Julia Acuña .  
Estudo da adipogênese do tecido adiposo branco epididimal e inguinal  
de ratos Wistar alimentados com dieta rica em carboidratos simples.  
[manuscrito] / Joana Julia Acuña Carvalho. - 2020.  
46 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra Sá Cota.  
Coorientadora: Dra. Isabela da Costa Fernandes.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola  
de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Tecido adiposo branco. 2. Dieta de alto carboidrato. 3. Hipertrofia.  
I. Fernandes, Isabela da Costa. II. Sá Cota, Renata Guerra . III.  
Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 613.2: 612.015.3

Bibliotecário(a) Responsável: Sonia Marcelino - CRB6-2247

**Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:**

**"ESTUDO DA ADIPOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSEO  
BRANCO EPIDIDIMAL E INGUINAL DE RATOS WISTAR  
ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM CARBOIDRATOS  
SIMPLES".**

Aos vinte e seis dias do mês de novembro de 2020, às 14 horas, via Google Meet no link: [meet.google.com/ewu-kntg-fdc](https://meet.google.com/ewu-kntg-fdc) (apresentação remota/online), reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da(o) estudante **Joana Julia Acuña Carvalho**, orientada pela Professora Renata Guerra de Sá Cota. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROVAR** a estudante.

Membros da Banca Examinadora:

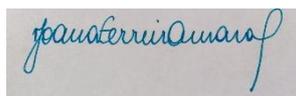


**Prof<sup>a</sup>. Renata Guerra de Sá Cota**  
Presidente (DECBI/ICEB/UFOP)



---

**Prof<sup>a</sup>. Júlia Cristina Cardoso Carraro**  
Examinadora (DENCs/ENUT/UFOP)



---

**Prof<sup>a</sup>. Joana Ferreira do Amaral**  
Examinadora (DENCs/ENUT/UFOP)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Dedico este trabalho à minha mãe, Vanilda, por todo apoio, compreensão e exemplo de que a educação pode ser transformadora.

## AGRADECIMENTOS

À toda minha família, por todo apoio e incentivo durante todos os anos da graduação em que estive distante. À minha mãe, pelo exemplo de luta e empoderamento que me nortearam até esta etapa. À minha irmã Sofia e ao meu pai Luís por todo amor, compreensão e paciência.

Às moradoras e ex-alunas da República Paraíso por ser lar durante esses anos distante de casa.

À cidade de Ouro Preto e todos os seus encantos que me proporcionaram momentos de alívio na correria do dia-a-dia.

A todos os amigos que fiz em Ouro Preto, inúmeros!! E a todas as histórias que compartilhamos juntos.

À Universidade Federal de Ouro Preto por proporcionar ensino público de qualidade e aos funcionários que trabalharam com amor e contribuem para o avanço da ciência.

À Escola de Nutrição e a todos os professores que nos inspiram a compreender as infinitas e complexas relações entre o homem e o alimento.

Agradeço imensamente a toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, pela acolhida e pelas trocas de experiências.

Um agradecimento especial, à orientadora Prof.<sup>a</sup> Renata Guerra, pela oportunidade de conhecer os trilhos da pesquisa e pela imensa contribuição com seus ensinamentos e reflexões em nossas discussões. E à Co-orientadora Isabela da Costa pela paciência, atenção e disposição em estar sempre tirando minhas ansiosas dúvidas.

Aos animais de experimentação que foram sacrificados para a construção de mais um capítulo na história da ciência.

E, por fim, agradecimento à mãe natureza por me iluminar e me proporcionar saúde e disposição para finalizar mais uma etapa.

## RESUMO

Atualmente compreende-se que o aumento da incidência de sobrepeso e obesidade gera uma sobrecarga nos serviços de saúde pública, uma vez que o aumento dos estoques adiposos predis põe os indivíduos ao desenvolvimento de comorbidades metabólicas. Nesse sentido, a adipogênese compreende uma rede abrangente de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de proteínas chave que controlam a homeostase energética. Com o intuito de compreender melhor os mecanismos acerca da adipogênese que o nosso grupo de pesquisa vem estudando o efeito temporal da ingestão de uma dieta repleta de carboidratos simples e demonstrou que o consumo da dieta rica em carboidratos simples durante 12 semanas por ratos *Wistar* foi capaz de promover a hiperplasia e a hipertrofia do tecido adiposo retroperitoneal e promoveu a *up regulation* dos sinais adipogênicos. O objetivo do presente trabalho foi ofertar a dieta rica em carboidratos durante 15 semanas em ratos *Wistar* recém-desmamados e avaliar os efeitos da dieta quanto ao teor de lipídeos (triglicerídeos, colesterol total e HDL-c); a morfometria e aos níveis de expressão dos genes adipogênicos *Ppar $\gamma$ 2* e *Cebpa* no tecido adiposo branco epididimal e inguinal além de avaliar os parâmetros bioquímicos e possíveis alterações metabólicas. Os 20 ratos *Wistar* machos foram distribuídos em dois grupos, um alimentado com carboidratos simples (n=12) outro alimentado com dieta controle (n=8); a avaliação biométrica foi realizada por meio do cálculo do índice de *Lee* e índice de adiposidade; os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório Piloto de Análises Clínicas-UFOP; a extração de lipídeos foi realizada pelo método de Folch; o tecido adiposo foi avaliado quanto à área e ao número de adipócitos; e a expressão gênica foi conduzida pela técnica de PCR em tempo real. Não houve diferença em relação à ingestão alimentar entre os grupos, no entanto a dieta rica em carboidratos simples induziu o aumento do índice de adiposidade ( $p < 0,0001$ ), o aumento dos níveis de triglicerídeos e VLDL-c ( $p < 0,05$ ); aumento do HOMA-IR ( $p < 0,05$ ); bem como menor conteúdo lipídico e menor dosagem do colesterol total extraídos do tecido adiposo epididimal ( $p < 0,05$ ) e menor dosagem da fração HDL do colesterol em ambos os tecidos adiposos ( $p < 0,05$ ). A expressão gênica de *Ppar $\gamma$ 2* foi menor no tecido adiposo inguinal dos animais alimentados com a dieta ( $p < 0,05$ ) e não apresentou diferença estatística em sua expressão no tecido epididimal, assim como a expressão do *Cebpa* que se manteve em patamares estatisticamente iguais entre os grupos. É possível concluir que o consumo da dieta rica em carboidratos simples foi suficiente para induzir o aumento da adiposidade, alterações dos parâmetros bioquímicos e a hipertrofia dos tecidos adiposos, que por sua vez foi suficiente para armazenar os produtos da síntese endógena de triglicerídeos estimulada pela dieta rica em carboidratos simples sem que houvesse a necessidade da hiperplasia desses tecidos, esse dado é reforçado pela redução da expressão significativa dos sinais adipogênicos (*Ppar $\gamma$ 2* e *Cebpa*).

**PALAVRAS-CHAVE:** Adipogênese, epididimal, inguinal, hipertrofia, dieta rica em carboidratos simples.

## ABSTRACT

Currently, it is understood that the increased incidence of overweight and obesity generates an overload on public health services, since the increase in adipose stocks predisposes individuals to the development of metabolic comorbidities. In this sense, adipogenesis comprises a comprehensive network of transcription factors responsible for the expression of key proteins that control energy homeostasis. In order to better understand the mechanisms about adipogenesis that our research group has been studying the temporal effect of eating a diet full of high sugar diet and demonstrated that the consumption of the high sugar diet for 12 weeks by Wistar rats was able to promote hyperplasia and hypertrophy of retroperitoneal adipose tissue and promoted the up regulation of adipogenic signs. The aim of the present study was to offer the high sugar diet for 15 weeks in newly weaned Wistar rats and to evaluate the effects of the diet on the content of lipids (triglycerides, total cholesterol and HDL-c); the morphometry and expression levels of the adipogenic genes *Ppar $\gamma$ 2* and *C/ebp $\alpha$*  in the epididymal and inguinal white adipose tissue, in addition to assessing the biochemical parameters and possible metabolic changes. The 20 male Wistar rats were divided into two groups, one fed high sugar diet (n=12) and the other fed a control diet (n=8); the biometric evaluation was performed by calculating the Lee index and adiposity index; biochemical tests were performed at the Pilot Laboratory of Clinical Analysis-UFOP; lipid extraction was performed using the Folch method; adipose tissue was evaluated for area and number of adipocytes; and gene expression was conducted using the real-time PCR technique. There was no difference regarding food intake between the groups, however the high sugar diet an increase in the adiposity index ( $p < 0.0001$ ), an increase in the levels of triglycerides and VLDL-c ( $p < 0, 05$ ); increase in HOMA-IR ( $p < 0.05$ ); as well as lower lipid content and lower dosage of total cholesterol extracted from epididymal adipose tissue ( $p < 0.05$ ) and lower dosage of the HDL cholesterol fraction in both adipose tissues ( $p < 0.05$ ). The gene expression of *Ppar $\gamma$ 2* was lower in the inguinal adipose tissue of animals fed the diet ( $p < 0.05$ ) and there was no statistical difference in its expression in the epididymal tissue, as well as the expression of *Cebp $\alpha$*  which was kept at statistically equal levels between groups. It is possible to conclude that the consumption of high sugar diet was sufficient to induce increased adiposity, changes in biochemical parameters and hypertrophy of adipose tissues, which in turn was sufficient to store the products of endogenous triglyceride synthesis stimulated by the high sugar diet without the need for hyperplasia of these tissues, this data is reinforced by the reduction of the significant expression of adipogenic signs (*Ppar $\gamma$ 2* and *Cebp $\alpha$* ).

**KEYWORDS:** Adipogenesis, Epididymal, Inguinal, Hypertrophy, High Sugar Diet.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise da integridade de RNA total	26
Figura 2: Ingestão alimentar diária média avaliada em gramas	28
Figura 3: Ingestão calórica média dos ratos submetidos ao experimento	28
Figura 4: Área média dos adipócitos do tecido adiposo branco epididimal e inguinal	31
Figura 5: Número médio dos adipócitos do tecido adiposo branco epididimal e inguinal	31
Figura 6: Fotomicrografias de seções histológicas de tecido adiposo branco epididimal	32
Figura 7: Fotomicrografias de seções histológicas de tecido adiposo branco inguinal	32
Figura 8: Teor de lipídeos teciduais extraídos em tecido adiposo branco epididimal e inguinal	33
Figura 9: Dosagem de colesterol total (mg/dL) em lipídeos teciduais extraídos por Folch em tecido adiposo branco epididimal e inguinal	33
Figura 10: Dosagem de triglicerídeos (mg/dL) em lipídeos teciduais extraídos por Folch em tecido adiposo branco epididimal e inguinal	34
Figura 11: Dosagem de colesterol HDL (mg/dL) em lipídeos teciduais extraídos por Folch do tecido adiposo branco epididimal e inguinal	34
Figura 12: Expressão relativa ao constitutivo do fator de transcrição <i>Ppar<math>\gamma</math>2</i> do tecido adiposo branco epididimal e inguinal	34
Figura 13: Expressão relativa ao constitutivo do fator de transcrição <i>Cepba</i> no tecido adiposo branco epididimal	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal das dietas analisadas por bromatologia pela empresa Hidrocepe	22
Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	27
Tabela 3: Características biométricas dos ratos <i>Wistar</i> alimentados pela DCS e DC por 15 semanas.	29
Tabela 4: Parâmetros bioquímicos dos grupos analisados.	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase;

AST – Aspartato aminotransferase;

CEA – Centro de Experimentação Animal;

CEBP $\alpha$  - *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$* ;

°C- Graus Celsius;

DCS – Dieta Carboidratos Simples;

DC- Dieta Controle;

GLUT-4 – Transportador de glicose do tipo 4;

FABP- Proteína de ligação de ácido graxo

HDL-c – Lipoproteína de alta densidade;

HOMA-IR – Modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina;

HOMA- $\beta$  – Modelo de avaliação da homeostase da capacidade das células  $\beta$ ;

IRS-1 – Substrato receptor de insulina 1;

IRS-2- Substrato receptor de insulina 2;

IMC – Índice de massa corporal

Kcal – Quilocalorias;

Kg- Quilogramas;

mg- miligramas;

mmol/L – milmol por litro

$\mu$ M – micrómetro;

LDL-c - Lipoproteína de baixa densidade;

PPAR $\gamma$  - *Peroxisome proliferador-activated receptor  $\gamma$* ;

PPIA- *Peptidilprolil isomerase A*;

RPLP2 – *Acidic Ribosomal Protein 2*;

TAB – Tecido Adiposo Branco;

TAM – Tecido Adiposo Marrom;

TAV- Tecido Adiposo Visceral;

TAS- Tecido Adiposo Subcutâneo;

TAG – Triacilglicerol;

VLDL-c – Lipoproteína de muito baixa densidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>22</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>23</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>24</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 HÁBITOS ALIMENTARES, OBESIDADE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA .....	14
1.2 O TECIDO ADIPOSE: ADIPOGÊNESE E O BALANÇO ENTRE LIPÓLISE E LIPOGÊNESE .....	16
1.3. <i>PEROXISOME PROLIFERADOR-ACTIVATED RECEPTOR <math>\gamma</math> (PPAR<math>\gamma</math>)</i> E <i>CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN A (C/EBA)</i> : REGULADORES CENTRAIS DA ADIPOGÊNESE.....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBEJTIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1 ANIMAIS E DIETA .....	21
4.2 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA.....	22
4.3 EXAMES BIOQUÍMICOS .....	23
4.4 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E DOSAGENS DE COLESTEROL TOTAL, HDL-C E TRIGLICERÍDEOS .....	23
4.5 MORFOMETRIA DOS ADIPÓCITOS .....	24
4.6 EXPRESSÃO GÊNICA .....	25
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
5.1 PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL .....	27
5.2 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA DOS ANIMAIS .....	28
5.3 AVALIAÇÃO DOS EXAMES BIOQUÍMICOS .....	29
5.4 AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA DOS ADIPÓCITOS .....	30
5.5 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E DAS DOSAGENS EXTRAÍDAS DO TECIDO ADIPOSE BRANCO	32
5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	34
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hábitos alimentares, obesidade e sua importância epidemiológica

De modo geral, a obesidade pode ser caracterizada pelo excesso de peso resultante do acúmulo de gordura corporal, refletindo no índice de massa corporal (IMC) igual ou acima de 30 kg/m<sup>2</sup>. A Organização Mundial da Saúde adverte que a obesidade é um dos mais graves problemas de saúde atual e estima que 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estejam acima do peso até 2025 (ABESO, 2018).

Dados nacionais indicam que o índice de obesidade aumentou nos últimos treze anos, passando de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. De acordo com o Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), o excesso de peso (IMC igual ou maior do que 25) atinge 55,7% da população no Brasil e a obesidade 19,8% (VIGITEL, 2018).

Atualmente, sabe-se que a crescente epidemia mundial de obesidade pela população humana possui etiologia multifatorial, refletindo, principalmente o desequilíbrio energético, resultante da ingestão alimentar inadequada associada ao sedentarismo. Trata-se de uma doença crônica, ocasionada pelo aumento dos estoques adiposos que propiciam condições favoráveis para o desenvolvimento de comorbidades ou de doenças de base metabólica nos indivíduos, sendo essa a maior preocupação para a rede de saúde pública (GUAY *et al.*, 2011).

Desse modo, é importante destacar o papel do desenvolvimento econômico e do processo de urbanização no cenário atual, pois reflete no estilo de vida da população, que corresponde por padrões alimentares inadequados e pela predominância de modelos ocupacionais sedentários que se somam aos fatores determinantes para o ganho e acúmulo excessivo de peso (HUANG *et al.*, 2016).

No entanto, são os hábitos alimentares atuais que representam uma grande parcela dos fatores determinantes do ganho de peso, caracterizada pelo consumo excessivo de alimentos industrializados, altamente processados e ricos em açúcares simples e gorduras, associada à ingestão insuficiente de frutas e hortaliças (RIPPE, 2016).

Anteriormente, associava-se o ganho de peso e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis à ingestão de uma dieta rica em gorduras. Conseqüentemente, os alimentos

ricos em gordura foram reconhecidos como vilões e as recomendações mundiais apontavam erroneamente os alimentos *low-fat* (pobres em gorduras) como saudáveis e incapazes de proporcionar o acúmulo de gordura corporal (POLACOW; LANCHÁ, 2007).

Devido à nova demanda, a indústria de alimentos passou a investir recursos a fim de desenvolver alimentos palatáveis a altura dos alimentos ricos em gordura, com o preceito de que quanto menor o teor de gordura mais saúde à mesa dos consumidores. No entanto, a maior preocupação em volta das recomendações da adoção de uma dieta hipolipídica, é a adoção de dietas ricas em carboidratos provenientes de alimentos processados e com alto índice glicêmico, que provocam efeitos tão severos quanto às dietas ricas em gorduras, entre eles: aumento dos níveis de triglicerídeos, diminuição da concentração plasmática de HDL colesterol, hiperinsulinemia, resistência à insulina (RI) e aumento da adiposidade corporal (POLACOW; LANCHÁ, 2007).

Embora as recomendações apontem para a adoção de dietas com baixo teor de lipídeos, como o intuito de diminuir a prevalência da obesidade, ao diminuir um nutriente específico, modifica-se toda a composição da dieta. Dietas em que os lipídeos representam menos do que 30% do valor energético total (VET) são frequentemente hiperglicídicas. Ao passo que, uma ingestão moderada em lipídeos 30% a 40% do VET resulta em uma dieta normoglicídica. Por outro lado, uma restrição mais severa de 10 a 15% do VET em lipídeos pode resultar em uma dieta hiperglicídica (mais do que 60% do VET em carboidratos) (IOM, 2002). A recomendação geral segundo o Guia Alimentar da População Brasileira é que o consumo de carboidratos fique entre 55 a 75% do VET, na prática as recomendações de macronutrientes incluindo de carboidratos, devem seguir um rigor individual considerando o nível de atividade física, idade, a presença de alguma doença, entre outras variáveis (IOM, 2002; GUIA ALIMENTAR PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA, 2014).

Os efeitos adversos de uma dieta hiperglicídica são, consideravelmente, acentuados quando esta é composta por carboidratos simples de alto índice glicêmico, como é o caso de alguns alimentos processados e farinhas refinadas. Em contrapartida, tais efeitos podem ser reduzidos com a ingestão de uma dieta predominantemente rica em carboidratos com baixo índice glicêmico, presente em grãos integrais, por exemplo, (RIPPE; ANGELOPOULOS, 2016).

Basicamente, os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra, sua oxidação é a principal via de produção de energia na maioria das células não fotossintéticas e

podem ser classificados em três classes principais: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (LEHNINGER, 1970).

Nesse sentido, os açúcares simples incluem os monossacarídeos e dissacarídeos adicionados aos alimentos e às bebidas pelo fabricante, pelo cozinheiro ou pelo consumidor, além dos açúcares naturalmente presentes nos alimentos. Dados nacionais indicam que o brasileiro consome 80g de açúcar por dia, sendo 64% desse consumo é de açúcar adicionado aos alimentos e 36% presente nos alimentos industrializados, consumindo 50% a mais do que a recomendação de ingestão de açúcar pela OMS. A recomendação é que a ingestão de açúcares seja até 10% do total das calorias diárias e que se possível limitar ainda mais o consumo para até 5% do valor calórico total (OMS, 2015; Ministério da Saúde, 2018).

O tecido adiposo possui um importante papel nesse cenário. Apesar de ser historicamente conhecido pela sua capacidade de armazenar energia na forma de ácido graxo esterificado, ele atua também como um órgão endócrino envolvido na modulação da homeostase energética. (CHOE *et al.*, 2016).

## **1.2 O tecido adiposo: adipogênese e o balanço entre lipólise e lipogênese**

O tecido adiposo apresenta duas variações: tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM), que podem ser diferenciados por meio de parâmetros morfológicos, moleculares e funcionais. Morfológicamente, o tecido adiposo marrom pode ser distinguido do tecido adiposo branco por possuir gotículas lipídicas multiloculares, rica vascularização e maior densidade mitocondrial (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Por outro lado, os adipócitos brancos são especializados no armazenamento energético e na secreção de substâncias que influenciam o metabolismo de todo o organismo. (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

Nesse contexto, os adipócitos são células especializadas no armazenamento de energia sob a forma de triacilgliceróis (TAG), de tal maneira que não haja prejuízo à integridade funcional destas células, e que secretam ativamente citocinas, hormônios e peptídeos, substâncias denominadas de adipocinas e são alvos de intensa investigação por seu relevante papel no controle da homeostase energética, uma vez que podem sofrer alterações em função dos hábitos alimentares e estilo de vida (CHOE *et al.*, 2016).

Anatomicamente, 80% da gordura corporal estão localizados em depósitos de tecido adiposo subcutâneo (TAS), distribuídos pela região abdominal subcutânea e região glúteo-

femoral. Enquanto o restante está localizado no tecido adiposo visceral (TAV), predominantemente nos depósitos intra e retroperitoneais (GUGLIELMI e SBRACCIA, 2018).

A distribuição da gordura corporal também difere quanto ao sexo. Os homens apresentam uma tendência ao acúmulo de gordura corporal nos depósitos viscerais, exibindo a forma clássica do corpo androide e que tem sido amplamente correlacionada ao aumento do risco cardiovascular, como já evidenciada associação entre o aumento da circunferência da cintura e o risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (PINHO *et al.*, 2018); (PALMER e CLEGG, 2013).

Embora as mulheres possuam maior porcentagem de gordura corporal total em comparação aos homens, o acúmulo ocorre preferencialmente nas regiões subcutâneas, mais especificamente na região glúteo-femoral conferindo o biotipo corporal conhecido como ginóide. Sendo assim, o corpo ginóide caracteriza um fator de proteção contra as consequências associadas à obesidade e síndrome metabólica. No entanto, já foi visto anteriormente que após a menopausa ocorre o favorecimento de acúmulo de gordura direcionado aos depósitos viscerais contribuindo para maior risco cardiovascular (PALMER e CLEGG, 2013).

O risco eminente associado à deposição de gordura visceral é atribuído parcialmente à drenagem de ácidos graxos via sistema porta-hepático, diferentemente dos ácidos graxos e citocinas pró-inflamatórias liberados do tecido adiposo subcutâneo que são drenados sistemicamente (ITEM; KONRAD, 2012). Sendo assim, indivíduos com obesidade central são susceptíveis ao desenvolvimento de resistência hepática à insulina e diabetes (ITEM; KONRAD, 2012). No entanto, o TAS representa o depósito principal de estoque adiposo garantindo a deposição efetiva de energia sob condições de excedente calórico. Portanto, o direcionamento de lipídeos para o TAV pode refletir um esgotamento do TAS como um “esconderijo metabólico” para estoque adicional de triglicerídeos refletindo a evolução da obesidade (GUGLIELMI; SBRACCIA, 2018).

De maneira simplificada, a expansão do tecido adiposo pode ocorrer por meio da hipertrofia quando os adipócitos evoluem de tamanho para o armazenamento de lipídeos ou por hiperplasia em que ocorre o processo de formação de novos adipócitos (CHOE *et al.*, 2016). Cabe ressaltar, que a hipertrofia não é um recurso ilimitado, pois, ao atingir sua capacidade máxima de armazenamento, as células de gordura são eventualmente emergidas do tecido conduzindo um aumento de ácidos graxos livres no plasma e se acomodam ectopicamente em órgãos não adiposos causando lipotoxicidade (CHOE *et al.*, 2016).

Sabe-se que os adipócitos viscerais se expandem preferencialmente por meio da hipertrofia celular, enquanto que os adipócitos subcutâneos, por apresentarem uma maior quantidade de pré-adipócitos e respondem melhor aos estímulos de diferenciação celular, portanto, se expandem predominantemente por meio da hiperplasia (WANG *et al.*, 2013).

Além disso, o suprimento vascular também é um fator determinante na hipertrofia ou hiperplasia dos adipócitos. Estudos com amostras de tecido adiposo em humanos demonstrou que TAS possui maior densidade capilar e maior capacidade de crescimento angiogênico em relação as amostra de TAV, uma vez que o suprimento vascular é limitado e, somado à expansão do volume dos adipócitos, conduz o tecido à hipóxia celular, estimulando uma cascata de eventos pró-inflamatórios resultando em RI tipicamente observado no TAV (GEALEKMAN *et al.*, 2011). Sendo assim, o acúmulo de gordura visceral é amplamente associado a uma série de desfechos clínicos negativos, independentemente da adiposidade corporal total (NEELAND *et al.*, 2019).

### **1.3. Peroxisome proliferador-activated receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) e CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$ (C/EB $\alpha$ ): reguladores centrais da adipogênese**

Compreender os mecanismos da adipogênese bem como o processo de desenvolvimento dos adipócitos pode proporcionar novas perspectivas acerca do tratamento da obesidade doenças metabólicas relacionadas. A adipogênese envolve uma rede abrangente de ações coordenadas por fatores de transcrição determinantes de linhagem e reguladores epigenômicos, apesar de não atuarem isoladamente, o *Ppar $\gamma$*  e o *C/ebp $\alpha$*  são reguladores chave nesse processo (CORRALES *et al.*, 2018).

Os *PPARs* compõem uma família de fatores de transcrição que controlam diversas vias metabólicas no organismo, incluindo metabolismo de lipídeos e glicose que atuam na diferenciação celular e no equilíbrio energético (SONG *et al.*, 2018). As isoformas do *PPAR* ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) estão envolvidas em ações metabólicas específicas no fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, rim e coração (AMMAZZALORSO e AMOROSO, 2019).

Frequentemente, o *Ppara* é utilizado como alvo molecular de fibratos e fármacos hipolipemiantes, pois sua ação contribui com o catabolismo de ácidos graxos, diminuição dos triglicerídeos e aumento do colesterol HDL (AMMAZZALORSO e AMOROSO, 2019). O *Ppar $\delta$*  atua no controle da expressão de genes envolvidos na captação de ácidos graxos e  $\beta$ -

oxidação (AMMAZZALORSO e AMOROSO, 2019). O *Ppar $\gamma$*  é um mediador chave da homeostase da glicose, promovendo a sensibilidade à insulina e a utilização da glicose nos tecidos (SONG *et al.*, 2018).

O *Ppar $\gamma$*  é expresso em duas principais proteoformas: *Ppar $\gamma$ 1* e *Ppar $\gamma$ 2*. O *Ppar $\gamma$ 1* atua em diversas via metabólicas e é amplamente expresso em diversos tecidos, incluindo fígado, músculo, intestino, células  $\beta$ -pancreáticas, ossos, placenta e tecido adiposo. Enquanto que o *Ppar $\gamma$ 2* exerce um papel fundamental na adipogênese e sua expressão é predominantemente no tecido adiposo (SONG *et al.*, 2018).

O *Ppar $\gamma$ 2* estimula a diferenciação dos adipócitos e sua expressão define o processo de hipertrofia. A ablação desse fator de transcrição em camundongos resultou na incapacidade de desenvolvimento de tecido adiposo funcional, além da hipertrigliceridemia e resistência à insulina (CORRALES *et al.*, 2018). Além disso, foi observado que a diminuição da expressão do *Ppar $\gamma$ 2* em roedores com adiposidade elevada conduziu a um alto grau de inflamação, à diminuição dos níveis de adiponectina e limitou a expansão do tecido adiposo (CORRALES *et al.*, 2018).

O *C/ebpa* é um membro da família *C/EBPs* ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ), da qual todos os membros são expressos em tecido adiposo branco e marrom e atuam na ativação e manutenção de genes envolvidos na adipogênese (SHEN *et al.*, 2016). Em conjunto com o *Ppar $\gamma$ 2*, o fator de transcrição *C/EBP $\alpha$*  trabalha na diferenciação terminal dos adipócitos brancos e desempenha um papel crucial na regulação da sensibilidade à insulina no adipócito maduro. (MOSETI *et al.*, 2016). Em estudos anteriores, a importância do *Ppar $\gamma$ 2* foi reforçada quando foi verificado que células com falhas na expressão de *C/EBP $\alpha$* , o *Ppar $\gamma$ 2* por si só foi capaz que conduzir a adipogênese, enquanto o *C/EBP $\alpha$*  não foi capaz de conduzir a adipogênese na ausência do *Ppar $\gamma$ 2* (MOSETI *et al.*, 2016).

Além disso, já foi visto que o *Ppar $\gamma$*  e o *C/EBPs* induzem a expressão de uma cascata de genes responsáveis por mediar a sensibilidade e a insulina (via transportador de glicose tipo 4-GLUT4), lipogênese (via proteína de ligação de ácido graxo-FABP), lipólise (via lipase de lipoproteína-LPL), assim como algumas adipocitocinas (adiponectina e leptina) (LOWE; O'RAHILLY; ROCHFORD, 2011). Anteriormente, foi observado que a ausência completa do *C/EBP* prejudicou a gliconeogênese hepática, e levando a hipoglicemia, induzindo um fenótipo letal (SHEN *et al.*, 2016).

Ao considerar-se que os mecanismos específicos responsivos à ingestão crônica de uma dieta rica em carboidratos simples ainda não foram totalmente elucidados, um estudo realizado com ratos *Wistar* mostrou que a ingestão de uma alimentação rica em carboidratos simples pós-desmame, ofertada durante 8 semanas aumentou os coxins gordurosos retroperitoneal e epididimal, os níveis séricos de insulina, o índice de HOMA-IR e a diminuição dos níveis de mRNA das sirtuínas 1, 2, 6 e 7 induzidas pela DCS (SANTOS, 2018).

Durante 12 semanas de ingestão, a DCS induziu à expressão de genes envolvidos na adipogênese e despertou a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos no tecido adiposo branco retroperitoneal, conduzindo uma *up regulation* dos sinais adipogênicos regulados pelo *Ppar $\gamma$*  (QUEIROZ *et al.*, 2014).

O efeito da ingestão crônica da DCS durante 18 semanas induziu aumento dos índices biométricos, intolerância à glicose, RI, aumento dos níveis de triglicerídeos e do colesterol VLDL, além de hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo visceral retroperitoneal de ratos *Wistar* (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Os efeitos deletérios também foram observados em nível hepático, com aumento do conteúdo lipídico e hepatomegalia (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os nutrientes na etiologia da obesidade e o consumo habitual de uma alimentação enriquecida de carboidratos simples, frequentemente observada atualmente, é capaz de alterar a programação de expressão do adipócito e assim, cooperar para instalação e manutenção do fenótipo obeso. Admite-se que é fundamental ampliar os estudos sobre os efeitos dessa dieta, uma vez que ela ainda é pouco estudada na literatura.

Sabe-se que a obesidade é uma doença crônica complexa, caracterizada por excesso de gordura corporal, sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo e fator de risco para desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Uma ampliação da compreensão do processo de desenvolvimento do tecido adiposo e dos mecanismos que governam este processo é vital na luta contra a crescente incidência de obesidade.

Nessa perspectiva, o presente trabalho tem por finalidade dar continuidade às investigações e preencher as lacunas acerca dos efeitos glicometabólicos e da avaliação dos níveis expressão de fatores de transcrição envolvidos na adipogênese durante a fase crítica de

desenvolvimento de 15 semanas de ingestão da DCS, contribuindo com a construção de um raciocínio cronológico de mecanismos envolvidos na adipogênese do tecido adiposo visceral epididimal e tecido adiposo subcutâneo inguinal.

### **3. OBEJTIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Avaliar os efeitos de uma dieta rica em carboidratos simples sobre o processo de adipogênese do tecido adiposo branco epididimal e inguinal de ratos *Wistar*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Ofertar dieta rica em carboidratos simples durante 15 semanas aos ratos *Wistar* recém-desmamados;
- II. Dosar o teor de lipídeos (triacilgliceróis, colesterol total e HDL-c) acumulado no tecido adiposo branco epididimal e inguinal;
- III. Avaliar a morfometria dos adipócitos do tecido adiposo branco epididimal e inguinal;
- IV. Analisar os exames bioquímicos e caracterizar as possíveis alterações metabólicas;
- V. Avaliar os níveis de expressão dos genes adipogênicos *Ppar $\gamma$ 2* e *C/ebpa* no tecido adiposo branco epididimal e inguinal.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Animais e dieta**

Para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa foram utilizados como modelos experimentais ratos *Wistar*, desmamados com 21 dias de vida. Todos os métodos experimentais foram aprovados pelo CEUA de acordo com o protocolo nº 2016/26.

Em relação ao cálculo amostral, considerou-se as diferenças mínimas entre as médias de 63 e erro padrão da média de 27, com poder de 0,95 e nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05. Sendo assim, foi realizado o teste de comparação de médias do programa Bioestat, versão 5,0.

Os animais foram distribuídos em dois grupos. Um grupo foi alimentado com a ração comercial (Nuvilab), denominada em nosso trabalho como dieta controle (DC) grupo este composto por oito animais. O outro grupo foi alimentado com dieta rica em carboidratos simples (DCS) composto por doze animais. A DCS foi preparada no laboratório a partir da mistura da ração comercial adicionada ao açúcar refinado e leite condensado *Moça Nestlé*. A composição centesimal de ambas as dietas oferecidas encontra-se na tabela 1.

Ambas as dietas foram oferecidas aos animais por um período de 15 semanas. O consumo e a ingestão calórica foram registrados em gramas e kcal respectivamente e avaliadas em média por rato e comparadas entre os grupos.

**Tabela 1:** Composição centesimal da dieta controle analisada por bromatologia pela empresa Hidrocepe – Serviços de qualidade Ltda/ Belo Horizonte-2018.

<b>Composição centesimal</b>		
	<b>DC</b>	<b>DCS</b>
<b>Energia (kcal/g)</b>	3,08	2,86
<b>Carboidratos</b>	44,08	47,86
<b>Proteínas</b>	21,67	12,81
<b>Lipídeos</b>	5,06	4,85
<b>Água</b>	10,89	25,77
<b>Fibra</b>	11,43	5,08
<b>Minerais</b>	6,87	3,63
<b>Total</b>	100	100
<b>porcentagem calórica (%)</b>		
<b>Carboidratos</b>	57,15	66,85
<b>Proteínas</b>	28,1	17,89
<b>Lipídeos</b>	14,75	15,26
<b>Total</b>	100	100

Valores em gramas informados em cada 100g da dieta. Percentual de calorias provenientes de cada macronutriente em relação ao total calórico em 100g de dieta.

## 4.2 Avaliação Biométrica

A massa corporal foi acompanhada semanalmente e, ao completar 15 semanas de oferta das dietas, foram aferidos novamente a massa corporal dos ratos e o comprimento

nasoanal. As etapas seguintes foram: eutanásia dos animais, coleta de amostra sanguínea e ressecção dos tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal, marrom e epididimal de cada animal. Posteriormente, os tecidos foram dissecados, pesados e congelados a -80 °C. Os índices biométricos utilizados foram o índice de adiposidade e índice de Lee (BERNARDIS e PATTERSON, 1968) calculados conforme as fórmulas ilustradas respectivamente:

$$\text{índice de adiposidade: } 100x \frac{\sum \text{peso tecidos adiposos}}{\text{peso corporal}}$$

$$\text{índice de Lee: } 3\sqrt{\frac{\text{peso}}{\text{comprimento nasoanal}}}$$

### 4.3 Exames Bioquímicos

As amostras sanguíneas foram analisadas em parceria com o Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os parâmetros analisados foram: glicemia de jejum, colesterol total e frações LDL-c, HDL-c, VLDL-c, triglicerídeos, creatinina, uréia, aspartato amino transferase e alanina amino transferase. Foram utilizados os kits de dosagem Bioclin e as análises bioquímicas foram determinadas por espectrometria em analisador bioquímico automatizado *Randon Acess Clinical Analyzer* – modelo Wiener Lab, CM 200.

### 4.4 Extração de lipídeos e dosagens de colesterol total, HDL-c e triglicerídeos

A extração do conteúdo lipídico presente nos tecidos adiposos foi determinada pelo método de Folch adaptado a partir de 100mg de tecido adiposo branco macerado com o auxílio do homogeneizador politron em meio clorofórmio e metanol em proporção 2:1, respectivamente. As amostras foram levadas ao vórtex por 3 minutos e o homogenato foi transferido para o tubo de ensaio cônico (limpo e seco) com adição de 400µl de metanol e mantido em repouso em temperatura ambiente com leves agitações durante cerca de 60 minutos. Após centrifugação dos tubos por 10 min a 3000 RPM, o sobrenadante foi transferido para novos tubos pesados e identificados, foi acrescentado a amostra 800µl de clorofórmio e 640µl de solução NaCl 0,73%, as amostras foram novamente homogenizadas em vórtex e centrifugadas e o sobrenadante foi descartado delicadamente e então três sucessivas lavagens da parede do tubo foram realizadas com a solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,29%). Entre cada lavagem da parede do tubo,

após separação das fases, foi descartado o sobrenadante. Os tubos foram submetidos a evaporação em estufa, posteriormente foram pesados e o conteúdo lipídico foi ressuspensionado em 500µl de isopropanol, com armazenamento em freezer -80°C até a dosagem. O cálculo do conteúdo lipídico em função da diferença de peso dos tubos antes e depois da extração (FOLCH e STANLEY, 1953).

O seguinte cálculo foi utilizado na mensuração do teor de lipídeo extraído:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{\text{Peso final do tubo(g)} - \text{Peso inicial do tubo(g)}}{\text{Peso do tecido(g)}} * 100$$

A partir do teor lipídico extraído dos tecidos adiposos foram realizadas as dosagens de colesterol total e frações por meio do Kit Labtest. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos, seguido de leitura da absorbância no espectrofotômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata por amostra. Para os cálculos das concentrações de colesterol total, triglicérides e HDL-c foram considerados os valores médios de absorbância para cada amostra. No espectrofotômetro, a leitura de triglicérides foi realizada a 505 nm e para colesterol total e HDL-c a 500 nm. Os cálculos foram determinados por meio das fórmulas abaixo:

$$\text{Colesterol total ml/dL} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do Padrão}} * 200$$

$$\text{Colesterol HDL ml/dL} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do Padrão}} * 40$$

#### 4.5 Morfometria dos adipócitos

Todo o processo de análise histológica e morfológica foi realizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (NUBEP/UFOP). As amostras de tecido adiposo epididimal e inguinal foram acondicionadas em solução fixadora Metanol 80%-Dimetilsulfóxido 20%. Posteriormente, os fragmentos foram processados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 5µM foram desparafinalizados com banhos de xilitol, hidratados em banho de álcool (100, 95, 80 e 70%) e em água e, então, foram corados com Hamatoxiliana e Eosina (HE). As imagens foram capturadas em aumento de 40x e 20x para tecido epididimal e inguinal respectivamente com microscópio acoplado a um sistema de

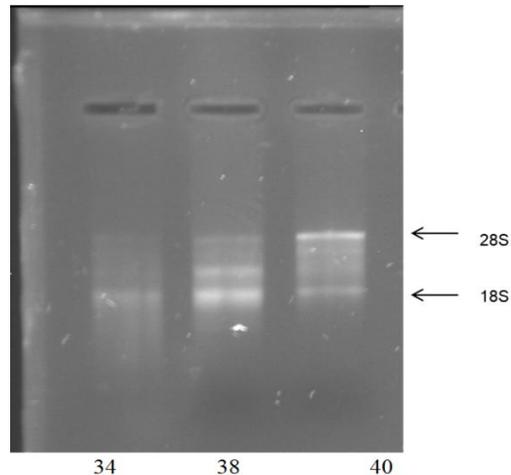
detecção com auxílio de uma câmera modelo MC170HD. A mensuração do tamanho dos adipócitos foi realizada a partir da análise de 500 células por grupo e com auxílio do software *Image J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

As lâminas de tecido adiposo epididimal foram avaliadas quanto ao número dos adipócitos pelo software *Image J*, por método manual e a área foi avaliada por meio do software Leica Qwin disponível no Laboratório de Microscopia do NUPEB. Enquanto que as lâminas de tecido adiposo inguinal foram avaliadas quanto ao número e quanto à área dos adipócitos pelo software *Image J*.

#### **4.6 Expressão gênica**

Inicialmente, foram realizadas as extrações de RNA total a partir de 170 mg de tecido adiposo epididimal e inguinal com os reagentes do Kit SV RNA *Isolation System Promega*, além de trizol e etanol 100% Merck com protocolo adaptado para tecido adiposo. Após a extração, a concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas no Nanodrop® pela razão 260/280.

A verificação da integridade do RNA extraído foi realizada em eletroforese de gel de agarose 1,2%. As amostras de RNA foram preparadas da seguinte maneira: para 1 µg de RNA foi usado 2,5 µL de tampão de RNA 10x e 7,5µL de formamida. Após o preparo, o RNA aliquotado foi desnaturado por aquecimento de 5 minutos a 65°C no termobloco, e resfriamento por 5 minutos em gelo. A eletroforese foi realizada a 90 volts em TBE 1X, por aproximadamente 40 minutos, onde foram avaliadas possíveis contaminações, degradações e a relação entre a separação eletroforética das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S, como exemplificado na figura 1.



**Figura 1:** Análise da integridade de RNA total. Cinco  $\mu\text{g}$  de cada preparação foram desnaturados em tampão formamida e analisado em gel de agarose TBE 1,2%, corado com brometo de etídeo. A figura ilustra as bandas 18S e 28S de duas amostras de RNA obtidos do tecido adiposo epididimal de ratos *Wistar* alimentados com DC.

O RNA total foi convertido em cDNA pela reação da transcriptase reversa por meio do preparo do *mix* de reação para cada amostra, conforme protocolo do Kit *High-capacity cDNA reverse transcription* Thermo Fisher (número do catálogo:4368813).

A expressão gênica foi realizada por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real. A técnica foi realizada com o sistema *Sybr Green*<sup>®</sup> em placas de 96 poços (*Applied Biosystems*) e, ao final do procedimento foi utilizado selo óptico (*Applied Biosystems*). Foram pipetados 3 $\mu\text{L}$  de primers (iniciadores) na concentração de 2,5 $\mu\text{M}$  em triplicata, e 7 $\mu\text{L}$  do mix de reação foi preparado com 2 $\mu\text{L}$  de cDNA diluído a 50ng/ $\mu\text{L}$  com água milliq estéril, e 5 $\mu\text{L}$  de *Sybr Green*<sup>®</sup> *PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). As reações foram preparadas em triplicata e os genes avaliados foram *Ppar $\gamma$ 2* e *Cebpa*.

A quantificação gênica relativa foi determinada no aparelho 7300 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) no qual, a intensidade do amplicon é comparada à referência passiva ROX. O resultado expresso em valor de CT e se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os níveis de expressão relativa foram calculados a partir do  $\Delta\text{CT}$  relacionado ao gene normalizador para detectar as alterações na expressão gênica nos grupos submetidos à ingestão DCS, conforme descrito em (BUSTIN *et al.*, 2009). A tabela 2 mostra a sequência dos *primers* utilizados.

A análise de expressão gênica por meio de PCR em tempo real representa a quantificação relativa aos genes de interesse, uma vez que requer um controle endógeno, cuja

expressão apresente a menor taxa de variação entre as amostras analisadas, independente de quaisquer condições experimentais ou tipo celular.

Para seleção do gene normalizador foi avaliado a expressão gênica para quatro controles endógenos: *Rplp2*, *Hprt1*, *Gapdh*, *rRNA18S* e *Ppia*. Os resultados foram analisados utilizando o software *NormFinder*, que estima a variação na expressão dos genes. O gene normalizador que se mostrou mais apropriado e que foi utilizado nesse trabalho foi *Ppia* e *Rplp2*, para o tecido adiposo epididimal e inguinal respectivamente.

**Tabela 2:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores

Iniciadores	Número de acesso	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<b>Rplp2</b>	BC099697	GCGGACGATGAACGACTC	CCAACACCCTGAGCGAGAC
<b>Cebpa</b>	AC_000069	TGT CCA GTT CAC GGC TCA GC	CGC AGC AGA AGG TGT TGG AG
<b>Ppar<math>\gamma</math>2</b>	AB011365	ACA TCC CGT TCA CAA GAG	ACC GAG GCT CTA CTT TGA TC
<b>Ppia</b>	XM_024302576.1	CAT GGA CAA GAT GCC AGG ACC	ATG TGC CAG GGT GGT GAC TTC

#### 4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software *Graph Pad Prim*. Os dados apresentados em tabela foram expressos em média e desvio padrão. A normalidade (distribuição Gaussiana) foi avaliada pelo teste *Komolgorov-smirnov*. Os dados de expressão gênica foram apresentados em expressão relativa ao gene normalizador ( $2^{-\Delta CT}$ ) e foi comparada entre os grupos dieta rica em carboidratos simples e dieta controle. Foi utilizado teste *T* de *Student* para dados paramétricos e para dados não paramétricos pelo teste *Mann-Whitney*.

## 5. RESULTADOS

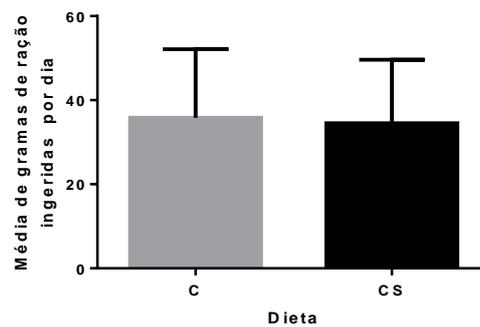
### 5.1 Parâmetros de caracterização do modelo experimental

Os resultados apresentados abaixo foram obtidos durante o desenvolvimento do Projeto “Efeito epigenético induzido por dieta hiperglicídica na regulação da expressão gênica do tecido

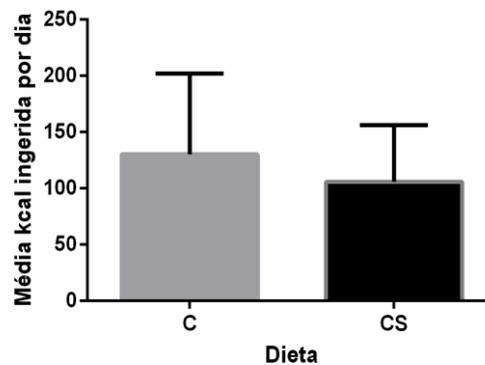
adiposo de ratos” e parte do projeto de tese desenvolvida por Isabela da Costa Fernandes, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFOP.

## 5.2 Avaliação biométrica dos animais

O consumo alimentar e a ingestão calórica entre os grupos não apresentaram diferença significativa conforme apresentado nas figuras 2 e 3.



**Figura 2:** Ingestão alimentar diária média avaliada em gramas. DC: dieta controle; DCS: dieta rica em carboidratos simples. A comparação das médias foi feita pelo teste *test t student*. Foi considerada diferença estatística significativa quando \*  $p < 0,05$ .



**Figura 3:** Ingestão calórica média dos ratos submetidos ao experimento DC: dieta controle; DCS: dieta rica em carboidratos simples. A comparação das médias foi feita pelo teste *test t student*. Foi considerada diferença estatística significativa quando \*  $p < 0,05$ .

A DCS influenciou a adiposidade dos animais, cujo grupo demonstrou maior índice de adiposidade ( $p < 0,0001$ ), representado na tabela 3. Não foi encontrada diferença significativa em relação ao índice de Lee.

**Tabela 3:** Características biométricas dos ratos *Wistar* alimentados pela DCS e DC por 15 semanas.

	DC n=8	DCS n=12	p-valor
<b>Ganho de peso corporal (g)</b>	389±15,71	419±12,72	0,094
<b>Branco Retroperitoneal</b>	4,398±0,3052	8,707±0,6030	<0,0001*
<b>Branco Inguinal</b>	8,534±0,3815	11,55±0,6521	0,0026*
<b>Branco Epididimal</b>	5,097±0,1821	7,768±0,4177	<0,0001*
<b>Marrom</b>	0,722±0,0609	0,801±0,0969	0,5451
<b>Índice de adiposidade</b>	4,798±0,56	7,069±1,13	p<0,0001*
<b>Índice de Lee</b>	0,3504±0,00304	0,3493±0,00453	0,8581

DC:dieta controle – DCS: carboidratos simples. A comparação das médias foi feita pelo teste *t de Student* quando os resultados tinham distribuição paramétrica e os dados foram apresentados na tabela em média +/- desvio padrão. Houve diferença estatística significativa quando p<0,05.

### 5.3 Avaliação dos exames bioquímicos

Como mostra a tabela 4, percebe-se o aumento dos níveis de triglicédeos, VLDL-c e creatinina. Ao passo que, houve diminuição dos níveis de LDL-c e ureia estatisticamente significantes quando comparado aos animais alimentados pela dieta controle.

Os níveis de aspartato amino transferase-AST não demonstraram diferença estatística significativa na comparação de ambos os grupos, assim como nos resultados de alanina amino transferase-ALT, colesterol total, HDL-colesterol e glicose.

**Tabela 4:** Parâmetros bioquímicos dos grupos analisados.

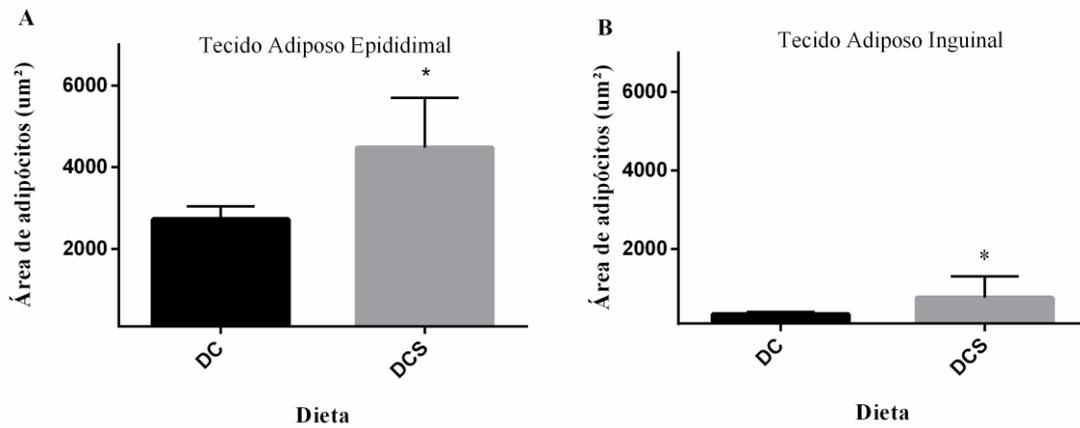
Parâmetros	15 semanas		p-valor
	DC(n=6)	DCS(n=12)	
AST ou TGO (U/L)	248,9±17,51	241,50±10,38	0,7032
ALT ou TGP (U/L)	95,53±4,90	83,17±6,13	0,07
Creatinina (mg/dL)	0,735	0,867	0,0003*
Ureia (mg/dL)	61,52±2,71	50,74±2,42	0,0149*
Colesterol (mg/dL)	111±7,4	97,5±4,1	0,10
VLDLc (mg/dL)	21,41±2,13	34,31±3,91	0,0409*
LDL-c (mg/dL)	46	21	p<0,0001*
HDL-c (mg/dL)	45,71±2,796	42,02±2,02	0,3058
Triglicerídeos (mg/dL)	104,3±11,03	169,7±17,55	0,0244*
Glicose (mmol/L)	5,71±0,333	6,60±0,50	0,33
HOMA-β	140±30,79	218±46,87	0,22
HOMA-IR	4	5,7	0,005*

DC: dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. A comparação das médias foi feita pelo *test t student* quando os resultados tinham distribuição paramétrica. E os dados foram apresentados na tabela em média +/- desvio padrão. O teste *Mann-Whitney* foi feito quando os dados eram não paramétricos e esses foram apresentados em mediana. Houve diferença estatística significativa quando \* p<0,05.

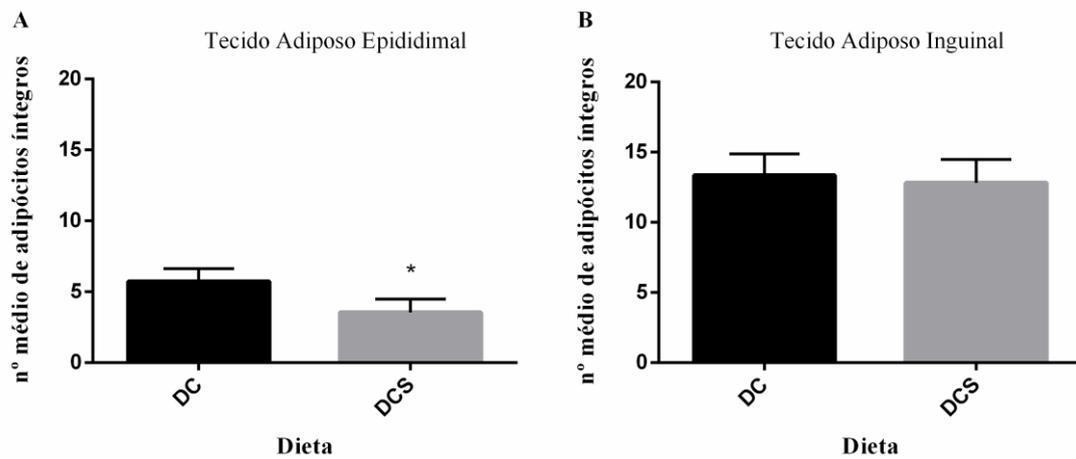
#### 5.4 Avaliação da morfometria dos adipócitos

A DCS foi capaz de influenciar a morfometria dos adipócitos. Os animais alimentados pela DCS apresentaram hipertrofia dos adipócitos do tecido adiposo epididimal e inguinal (p <0,05) em comparação com os animais do grupo DC (figura 4).

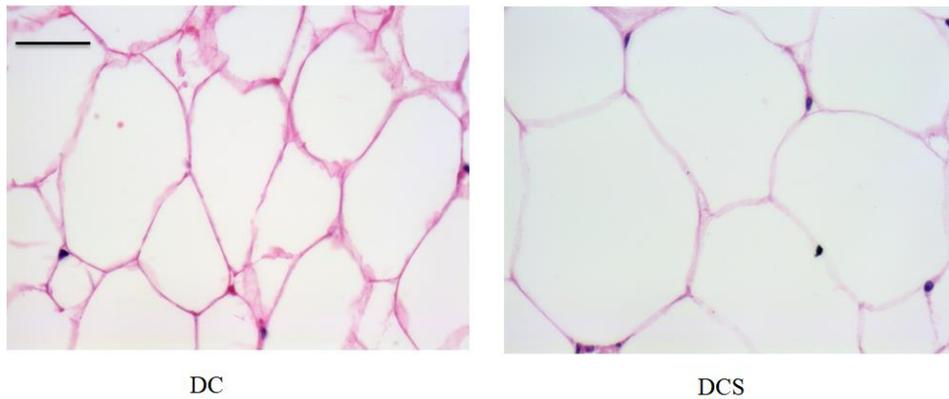
Em relação ao número médio de adipócitos o tecido adiposo epididimal dos animais do grupo DCS apresentou número de adipócitos inferior aos animais do grupo DC (p <0,05). O número médio de adipócitos íntegros do tecido adiposo inguinal não apresentou diferença estatística entre os grupos no período de 15 semanas (figura 5).



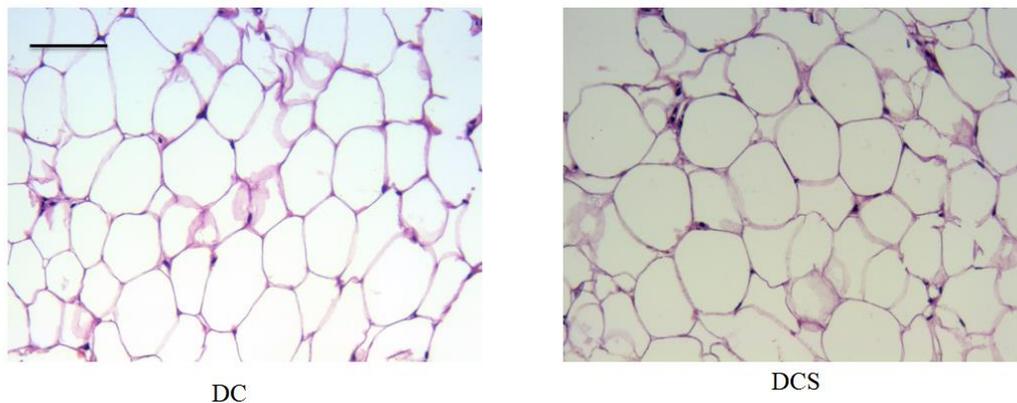
**Figura 4:** Área média dos adipócitos do tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B) de ratos *Wistar* alimentados com dieta rica em carboidratos simples. DC: dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC: n=5 DCS:n=5; tecido inguinal DC:n=7; DCS:n=7. Foi realizado teste *Mann-Whitney* para ambos os tecidos e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



**Figura 5:** Número médio dos adipócitos do tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B) de ratos *Wistar* alimentados com dieta rica em carboidratos simples. DC:dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=5); DCS(n=5); Tecido inguinal DC (n=7); DCS (n=7). Foi realizado *test t student* para ambos os tecidos e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.



**Figura 6:** Fotomicrografias de seções histológicas de tecido adiposo branco epididimal de ratos *Wistar* registradas em aumento de 40x. Aspecto histológico normal evidenciando parênquima preenchido por células adiposas uniloculares permeadas por estroma conjuntivo. Corado por Hematoxilina-Eosina. Barra=50 µm. DC-grupo que recebeu dieta controle; DCS- grupo que recebeu dieta rica em carboidratos simples.

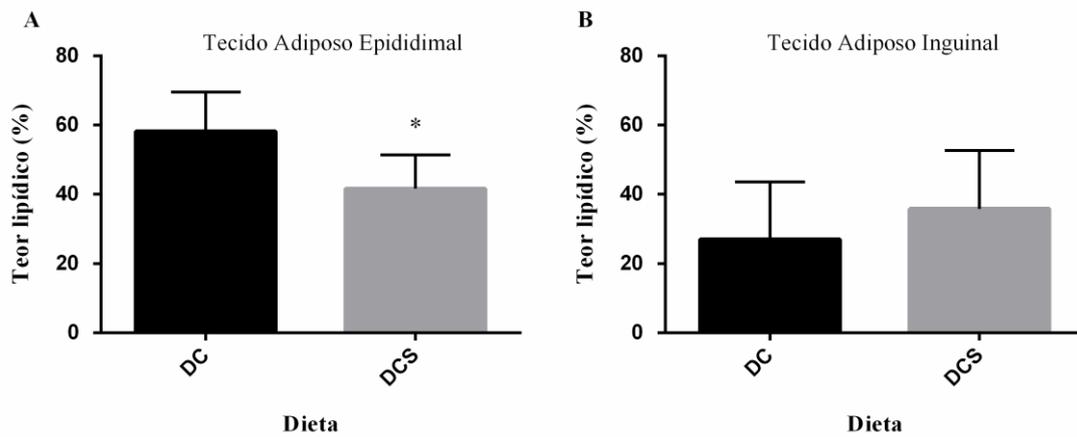


**Figura 7:** Fotomicrografias de seções histológicas de tecido adiposo branco inguinal de ratos *Wistar* registradas em aumento de 20x. Aspecto histológico normal evidenciando parênquima preenchido por células adiposas uniloculares permeadas por estroma conjuntivo. Corado por Hematoxilina-Eosina. Barra=50 µm. DC-grupo que recebeu dieta controle; DCS- grupo que recebeu dieta rica em carboidratos simples.

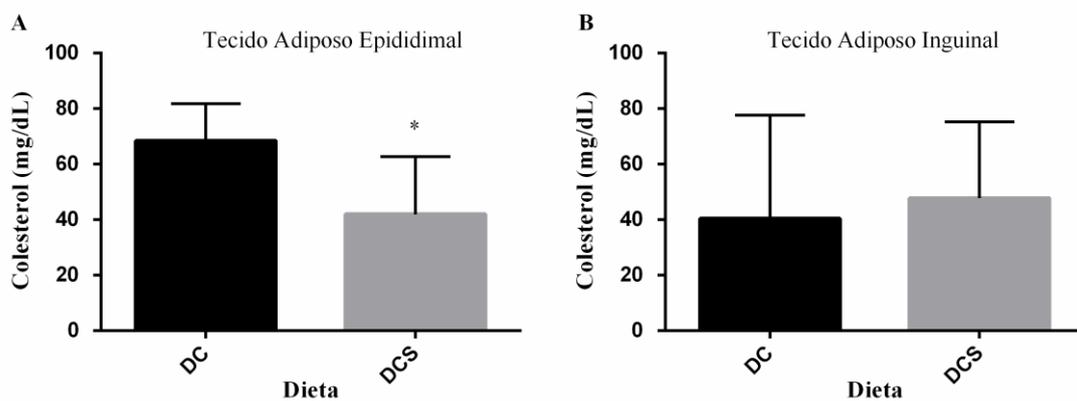
### 5.5 Avaliação do conteúdo lipídico e das dosagens extraídas do tecido adiposo branco

Os animais alimentados com a DCS apresentaram menor conteúdo lipídico e menor dosagem do colesterol total extraídos do tecido adiposo epididimal ( $p < 0,05$ ) (figura 8 e 9). O tecido inguinal não demonstrou diferença estatística entre os grupos em relação ao teor de lipídeos e em relação à dosagem do colesterol total (figura 8 e 9).

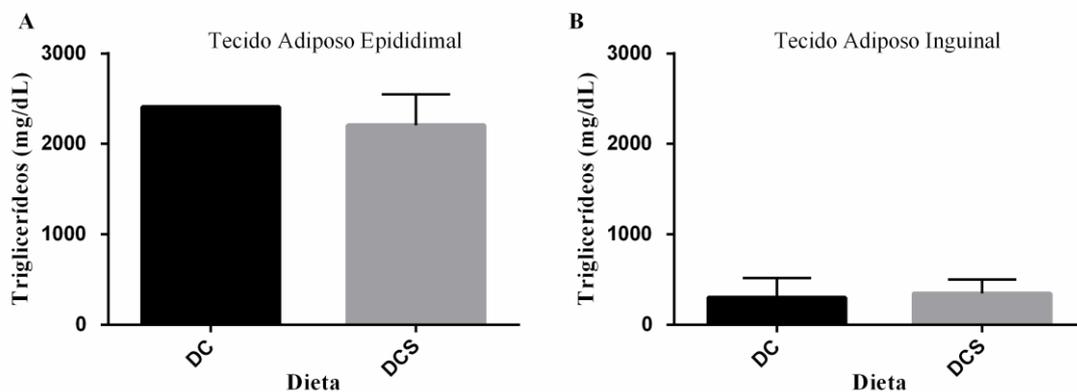
A DCS foi capaz de diminuir a dosagem da fração HDL do colesterol em ambos os tecidos adiposos ( $p < 0,05$ ) (figura 11). Por outro lado, os triglicerídeos extraídos dos tecidos demonstraram dosagens equivalentes entre os grupos analisados (figura 10).



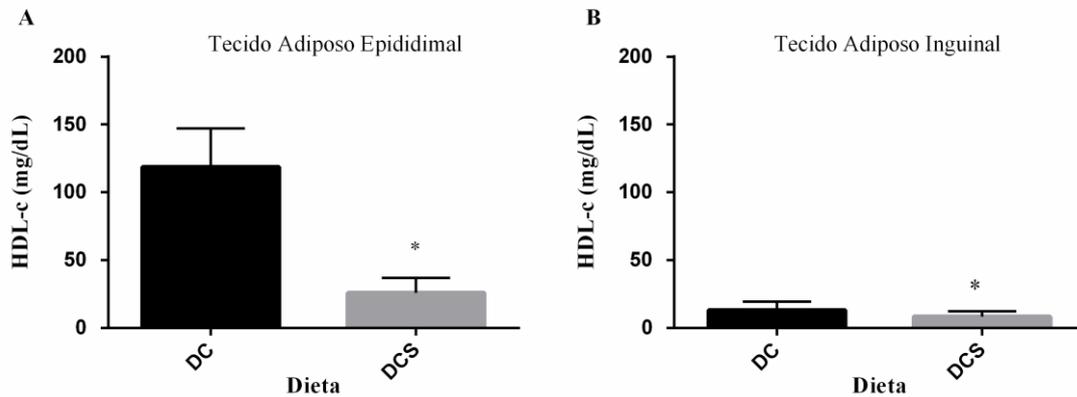
**Figura 8:** Teor de lipídeos teciduais extraídos em tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B) de ratos *Wistar* alimentados com dieta controle e dieta carboidratos simples. DC: dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=7); DCS(n=11); Tecido inguinal DC (n=8); DCS (n=10). Foi realizado *test t student* para ambos os tecidos e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.



**Figura 9:** Dosagem de colesterol total (mg/dL) em lipídeos teciduais extraídos por Folch em tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B). DC:dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=8); DCS(n=12); Tecido inguinal DC (n=8); DCS (n=12). Foi realizado *test t student* para ambos os tecidos e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.



**Figura 10:** Dosagem de triglicerídeos (mg/dL) em lipídeos teciduais extraídos por Folch em tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B). DC: dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=8); DCS(n=12); Tecido inguinal DC (n=8); DCS (n=12). Foi realizado teste *Mann-Whitney* e *test t student* respectivamente e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.

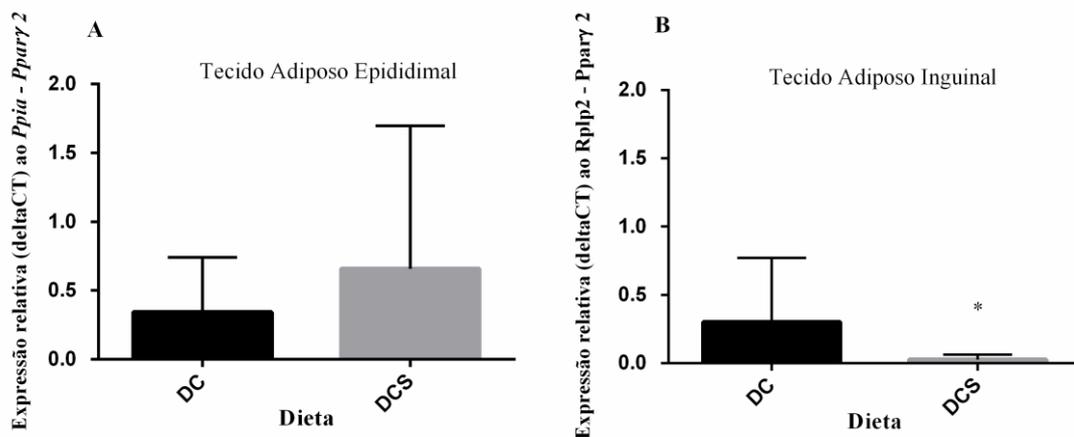


**Figura 11:** Dosagem de colesterol HDL (mg/dL) em lipídeos teciduais extraídos por Folch do tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B). DC: dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=8); DCS (n=12); Tecido inguinal DC (n=7); DCS (n=11). Foi realizado *test t student* e teste *Mann-Whitney* respectivamente e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.

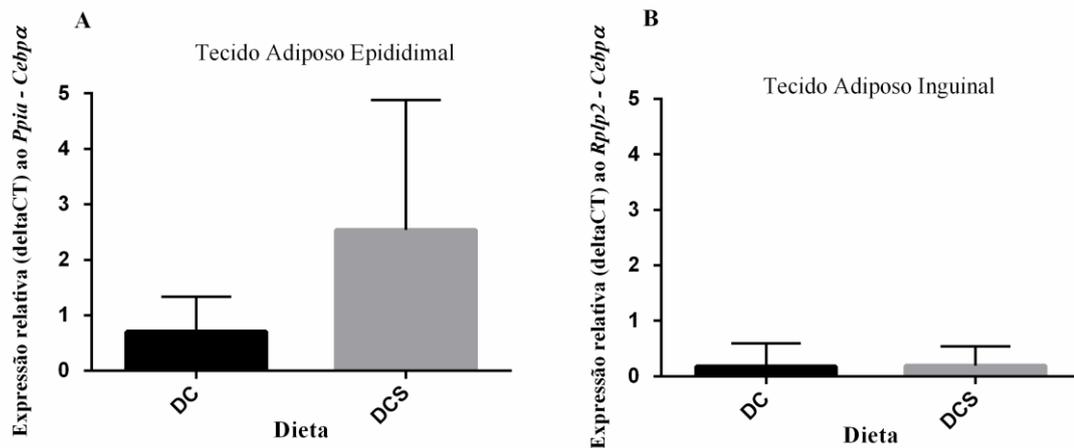
## 5.6 Avaliação da expressão gênica

A expressão gênica de *PPAR $\gamma$ 2* foi menor no tecido adiposo inguinal dos animais alimentados com DCS ( $p < 0,05$ ) e não apresentou diferença estatística em sua expressão no tecido epididimal ao comparar os grupos (figura 12).

A expressão gênica do *CEBP $\alpha$*  não demonstrou diferença estatística entre os grupos em ambos os tecidos analisados (figura 13).



**Figura 12:** Expressão relativa ao constitutivo do fator de transcrição *Ppar $\gamma$ 2* do tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B). DC:dieta controle; DCS: dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=5); DCS (n=5); Tecido inguinal DC (n=7); DCS (n=7). Foi realizado *test t student* e teste *Mann-Whitney* respectivamente e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.



**Figura 13:** Expressão relativa ao constitutivo do fator de transcrição *Cepba* no tecido adiposo branco epididimal (A) e inguinal (B). DC:dieta controle; DCS:dieta carboidratos simples. Tecido epididimal DC (n=5); DCS (n=5); Tecido inguinal DC (n=7); DCS (n=7). Foi realizado teste *Mann-Whitney* e valor de \*  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.

## 6. DISCUSSÃO

Anteriormente, atribuíam-se a etiologia da obesidade ao consumo excessivo de alimentos ricos em gordura. Atualmente, sabe-se que a restrição de gorduras isoladamente na maioria dos casos analisados, não contribuiu para redução da prevalência da obesidade e do desenvolvimento de suas comorbidades uma vez que, tal restrição é acompanhada pelo aumento do consumo de carboidratos (FERRETTI; MARIANI, 2017). Nesse sentido, o consumo de carboidratos simples ganhou destaque ao ser associado não só à obesidade, mas também ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças de base metabólica, como o diabetes mellitus tipo II e doenças cardiovasculares (RIPPE; ANGELOPOULOS, 2016).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito temporal da ingestão crônica da DCS. A ingestão pós-desmame durante 4, 8, 12 e 18 semanas induziu alterações nos parâmetros bioquímicos sem necessariamente apresentar o aumento da massa corporal (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SANTOS, 2018). Esses resultados foram associados à hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos e à regulação positiva da expressão de genes das vias pró-adipogênicas (*Ppar $\gamma$* ) e regulação negativa de sinais anti-adipogênicos no tecido adiposo retroperitoneal (QUEIROZ *et al.*, 2014). Tais resultados motivam a continuação das investigações acerca das adaptações metabólicas observadas no tecido adiposo ocorridas durante os intervalos críticos de desenvolvimento, se seriam suficientes para preservar a homeostase metabólica e prevenir o desenvolvimento de um fenótipo mais patológico, durante uma exposição crônica da DCS.

No presente estudo, ainda que a DCS tenha menor teor calórico por grama de dieta em relação à DC, a média de ingestão de dieta em gramas não demonstrou diferença entre os grupos, bem como a ingestão calórica total dos animais. No entanto, a ingestão da DCS foi capaz de propiciar o aumento da adiposidade dos animais e alterações no perfil lipídico.

A DCS também foi capaz de induzir alterações na composição corporal com o aumento na massa dos tecidos adiposos brancos epididimal e inguinal. Anteriormente foi observado o aumento da massa dos tecidos adiposos retroperitoneais, epididimais e inguinais de animais alimentados pela DCS ao final de 4, 8 e 18 semanas corroborando com os achados do presente estudo (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SANTOS, 2018).

De acordo com os dados da avaliação biométrica, foi constatado maior índice de adiposidade dos animais alimentados com a DCS (tabela 3). Por outro lado, ao comparar o índice de Lee não foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

Diante de estudos desenvolvidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa, é possível afirmar que houve uma progressão do índice de adiposidade dos animais alimentados pela DCS, visto que foi encontrado aumento da adiposidade ao final de 12 semanas dos procedimentos experimentais, precedente as alterações no índice de Lee e no peso corporal, assim como no presente estudo com 15 semanas de ingestão da dieta (QUEIROZ *et al.*, 2014).

Somente com 18 semanas de uso da dieta que foi observado aumento no índice de Lee, o que reforça a hipótese de que a ingestão de açúcar e o consequente desenvolvimento de obesidade não estão associados ao maior consumo energético e sim à ingestão prolongada da dieta (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

O índice de Lee é uma ferramenta amplamente utilizada para mensuração da obesidade em ratos e equivale ao índice de massa corporal (IMC) empregado na classificação do estado nutricional para humanos. Sendo assim, outros parâmetros antropométricos são úteis e necessários para estimar a composição corporal, considerando que, tanto o índice de Lee como o IMC, não diferem a massa associada ao músculo ou à gordura corporal. (MALAFAIA *et al.*, 2013).

Por outro lado, o índice de adiposidade representa melhor a evolução da massa dos tecidos adiposos sob a massa corporal total ao considerar em seus cálculos a massa de todos os tecidos adiposos em relação à massa corporal (MALAFAIA *et al.*, 2013).

Além disso, outro estudo que forneceu ração suplementada com sacarose 300g/l na água aos animais demonstrou evolução dos tecidos adiposos retroperitoneal e gonadal sem diferença no índice de Lee (MALAFAIA *et. al.*, 2013), corroborando com os resultados deste presente estudo.

Dessa forma, o consumo frequente de uma dieta rica em carboidratos simples estimula a via de síntese de ácidos graxos provenientes da glicose, o que proporciona o armazenamento de gordura, aumento da adiposidade e, conseqüentemente, o ganho de peso e pode conduzir humanos e roedores ao sobrepeso e obesidade (QUEIROZ *et al.*, 2014; ANGELOPOULOS, 2016; SANTOS, 2018). Desta maneira, no presente estudo, o índice de adiposidade do grupo DCS pode estar associado ao consumo da dieta, assim como aumento da gordura corporal, refletindo a evolução da massa dos tecidos adiposos.

Tão importante quanto mensurar a gordura corporal total, é a identificação da forma pela qual a gordura está distribuída pelo corpo. O excesso de tecido adiposo localizado na região abdominal (obesidade central ou androide) está intimamente relacionado ao risco de desenvolvimento de disfunções metabólicas e à doenças cardiovasculares (PINHO *et al.*, 2018).

Outro estudo também apontou que o aumento da circunferência da cintura e dos níveis séricos de triglicerídeos simultaneamente, ou chamado fenótipo da cintura hipergliceridêmica (FCH) para homens e mulheres foi associado à obesidade, risco cardiovascular e, especialmente, à síndrome metabólica (FREITAS *et. al.*, 2018).

A obesidade, sobretudo a visceral, predispõe à disfunção dos adipócitos e o aumento do trânsito de adipocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, podendo resultar em disfunção endotelial, remodelação vascular, aterosclerose, deslipidemias, hipertensão arterial, além de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo II (MOLICA *et al.*, 2015).

A DCS foi capaz de provocar o aumento dos níveis séricos de triglicerídeos e VLDL-c nos animais analisados no presente estudo. A literatura atribui essa alteração ao aumento da lipogênese hepática via responsável pela síntese de ácidos graxos a partir de carboidratos em excesso provenientes da dieta. Portanto, aumentando a síntese endógena de triglicerídeos, a produção e secreção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) nos níveis séricos (STRABLE; NTAMBI, 2010).

Essas alterações do metabolismo lipídico também foram observadas em outros estudos, nos quais os animais foram alimentados pela DCS por um período de 4 e 8 semanas (SANTOS, 2018), 12 semanas (QUEIROZ *et al.*, 2014) e 18 semanas (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Embora a DCS tenha aumentado os níveis séricos de triglicerídeos e VLDL dos animais, os níveis do colesterol LDL diminuíram nesse grupo. Pesquisas anteriores demonstraram que, ao reduzir os lipídeos provenientes da dieta e aumentar os carboidratos, sem que ocorra alteração do aporte calórico total, como observado na composição da DCS do presente estudo, é presumível a hipertrigliceridemia concomitante com a redução dos níveis de LDL (POLACOW E LANCHI, 2007).

Apesar de euglicêmicos os animais alimentados pela DCS apresentaram resistência à insulina, avaliada por meio da elevação do HOMA-IR. Assim como no estudo de Oliveira (2020), no qual os animais alimentados pela DCS ao final de 18 semanas, além de resistência à insulina, apresentaram intolerância à glicose, hiperinsulinemia e aumento da função secretora das células  $\beta$ , elucidando o comprometimento da sensibilidade à insulina em função da ingestão crônica da dieta (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Entre os impactos observados nos parâmetros bioquímicos, a dieta rica em carboidratos simples induziu a redução dos níveis de ureia dos animais em comparação ao grupo DC. Sabe-se que a ureia sofre influência do catabolismo proteico (NEMER; NEVES; FERREIRA, 2012). Nesse sentido, a redução dos níveis de ureia no soro observada neste estudo e em outros envolvendo uma dieta rica em carboidratos simples (SANTOS, 2018) e (OLIVEIRA *et al.*, 2020), pode ocorrer em função do menor teor de proteínas da DCS (17,89%) em comparação à composição da dieta controle (28,1%).

A ingestão da dieta rica em carboidratos simples, ainda que isocalórica, quando comparada com a dieta controle, foi capaz de induzir a hipertrofia dos adipócitos epididimais e inguinais dos animais alimentados pela dieta. Nesse contexto, a hipertrofia celular do tecido adiposo ocorre quando os adipócitos evoluem de tamanho para o armazenamento de lipídeos em função da hiperinsulinemia, causada pelo consumo de alimentos de alto índice glicêmico (REILLY E SALTIEL, 2017), como o açúcar e leite condensado.

Este resultado assemelha-se aos estudos anteriores desenvolvidos no laboratório em que a DCS induziu a hipertrofia de depósitos de gordura visceral, como nos adipócitos do tecido

adiposo retroperitoneal de ratos *Wistar*, alimentados pela dieta durante 4, 8, 12 e 18 semanas (SANTOS, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Em geral, os adipócitos viscerais exibem potencial adipogênico aumentado em relação aos adipócitos subcutâneos em adultos obesos (HACZEYNI; FARRELL 2018). No entanto, no presente estudo a DCS induziu hipertrofia tanto nos adipócitos viscerais do tecido adiposo epididimal como nos adipócitos subcutâneos do tecido adiposo inguinal, concordando com a literatura que relata que os dois tipos de depósitos adiposos são capazes de se expandirem na obesidade, contribuindo com a disfunção tecidual (BARGUT *et al.*, 2016).

Guillermier e Cols (2017) observaram a hipertrofia dos adipócitos do tecido adiposo epididimal, após a oferta de uma dieta hiperlipídica durante 4 semanas, enquanto os depósitos subcutâneos apresentaram hipertrofia apenas 2 meses depois da ingestão da dieta, reforçando a distinta dinâmica adipogênica entre os diferentes territórios gordurosos em roedores.

Quando hipertrofiado o tecido adiposo estimula a cascata de citocinas pró-inflamatórias induzindo a hipóxia celular, inflamação e o recrutamento de macrófagos exacerbando a resistência à insulina (CHOE *et al.*, 2016). Após atingir um limiar de hipertrofia ocorre a hiperplasia dando continuidade ao armazenamento energético. A hiperplasia dos adipócitos, por sua vez, permite que o metabolismo energético do tecido adiposo seja reestabelecido. Dessa forma, por meio do citoesqueleto preservado o adipócito é capaz de realizar a regulação do metabolismo em resposta à insulina (CHOE *et al.*, 2016).

Em estudos realizados anteriormente, encontra-se hiperplasia do tecido adiposo retroperitoneal de animais alimentados com DCS durante 12 semanas. (QUEIROZ *et al.*, 2014) e esse fenômeno pode ser observado também ao final de 18 semanas (OLIVEIRA *et al.*, 2020). No entanto, no presente estudo, apesar de ter constatado a hipertrofia do tecido adiposo epididimal, não houve hiperplasia nesse tecido ao final de 15 semanas dos animais do grupo DCS.

Esses dados sugerem que a hipertrofia e a hiperplasia ocorrida aproximadamente à altura das 12 semanas do procedimento experimental, como observado anteriormente em nosso grupo de estudo, foram suficientes para dar continuidade ao armazenamento lipídico nos adipócitos dos animais ao longo das 15 semanas de ingestão da DCS sem que houvesse a necessidade de formação de novos adipócitos. No entanto, com a ingestão crônica da DCS ao longo de 18 semanas demonstrou que o aumento na demanda de armazenamento lipídico induziu

novamente o processo de adipogênese e hiperplasia do tecido adiposo retroperitoneal/visceral a fim de dar continuidade ao armazenamento eficiente dos produtos da síntese endógena de triglicerídeos (QUEIROZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Além disso, os tecidos adiposos inguinais dos animais do presente estudo não apresentaram hiperplasia. Contudo, estudos anteriores indicam que o grau de potencial adipogênico dos depósitos subcutâneos, caracterizam-se um fator de adaptação contra o agravante das comorbidades metabólicas da obesidade (HACZEYNI; FARRELL, 2018).

Nesse sentido, o conceito de que existe uma maior plasticidade dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo em relação aos depósitos viscerais reforça que a obesidade central/androide com hipertrofia dos adipócitos de viscerais contribui para a gravidade às condições do estado metabólico quando comparada à obesidade do tipo ginoide (HACZEYNI; FARRELL, 2018). Já é amplamente reconhecido que o excesso de tecido adiposo visceral contribui para a RI através secreção exacerbada de adipocinas inflamatórias, como interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , proteína quimioatraente de macrófago-1 e resistina (MOON *et al.*, 2019).

Outro agravante do acúmulo de tecido adiposo visceral, é a redução dos níveis plasmáticos da adiponectina na obesidade visceral, uma vez que a adiponectina é uma adipocina anti-inflamatória e ateroprotetora que reduz a gliconeogênese hepática e aumenta a captação de glicose e a sensibilidade à insulina sistêmica, portanto desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da RI (MOON *et al.*, 2019).

O tecido adiposo epididimal, como já descrito anteriormente, é caracterizado como um depósito visceral. Sendo assim, é reconhecido por ser um tecido mais ativo do que o tecido inguinal devido a maior sensibilidade à lipólise mediada pela insulina consequentemente liberando ácidos graxos livres por meio do sistema porta hepático (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Esse mecanismo pode ser responsável pelo menor teor do conteúdo lipídico e menor nível de colesterol total extraído e dosado no tecido epididimal dos animais DCS, objetos de análises deste estudo.

No entanto, a DCS foi capaz de reduzir os níveis de HDL em ambos os tecidos analisados. Esse resultado evidencia a relação entre a obesidade visceral e o potencial aterogênico frente à hipertrigliceridemia causada pela ingestão crônica de carboidratos simples. Sabe-se que a manutenção basal dos níveis de HDL plasmáticos desempenham um papel

ateroprotetor contra o desenvolvimento de dislipidemia secundárias à obesidade (SUBRAMANIAN; CHAIT, 2012).

Além disso, não houve diferença significativa na expressão do fator de transcrição *PPAR $\gamma$ 2* no tecido adiposo epididimal constatado neste estudo. Sabe-se que o *PPAR $\gamma$ 2*, além de atuar na diferenciação dos adipócitos, favorece a funcionalidade do tecido adiposo regulando genes envolvidos na captação e no armazenamento lipídico. (CORRALES; VIDAL-PUIG; MEDINA-GÓMEZ, 2018). Estudos anteriores já relataram que a ausência completa desse fator de transcrição induziu um fenótipo composto por adipócitos hipertróficos com hiperplasia reduzida além de ácidos graxos plasmáticos elevados, assim como os resultados neste estudo (HE *et al.*, 2003). Desta maneira, é provável que a redução da expressão significativa do *PPAR $\gamma$ 2* no tecido adiposo epididimal seja um obstáculo para o remodelamento do tecido adiposo e manutenção do armazenamento eficiente de lipídeos e da flexibilidade metabólica. (HE *et al.*, 2003).

Estudos desenvolvidos anteriormente constataram que a ausência total da expressão do *PPAR $\gamma$ 2* no tecido adiposo branco comprometeu a cascata de sinalização e expressão de fatores envolvidos na diferenciação celular, na captação, transporte e armazenamento de ácidos graxos, como também os genes que codificam proteínas secretadas em relação aos animais controle com expressão inalterada desse fator. Posteriormente, esses resultados também foram visíveis no tecido epididimal e inguinal. (BOOTH *et al.*, 2017). Nesse sentido, é possível justificar que a falta de expressão significativa de *PPAR $\gamma$ 2* no tecido epididimal pode ter comprometido a expressão de diversos fatores, incluindo o *CEBPa*. (BOOTH *et al.*, 2017).

A dieta rica em carboidratos simples induziu a *down regulation* do *PPAR $\gamma$ 2* no tecido adiposo inguinal neste estudo. Esse resultado corrobora com achados anteriores que indicam que o comprometimento da obesidade está relacionado à diminuição desse fator de transcrição e, conseqüentemente, conduzindo alto grau de inflamação, angiongênese e fibrose do tecido adiposo branco. (CORRALES; VIDAL-PUIG; MEDINA-GÓMEZ, 2018). Contudo, a regulação equilibrada do *PPAR $\gamma$ 2* está associada à manutenção da hiperplasia dos adipócitos e da sensibilidade à insulina. (CORRALES; VIDAL-PUIG; MEDINA-GÓMEZ, 2018).

Em geral, sabe-se que o *PPAR $\gamma$ 2* e *CEBPa* desempenham, de maneira cooperativa, um papel fundamental na diferenciação e maturação dos adipócitos (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). No entanto, a ausência de expressão significativa do *CEBPa* no tecido adiposo inguinal também pode estar vinculada à particularidade adipogênica desse tecido, pois há evidência de

que a ausência do *CEBPA* em camundongos não interferiu no desenvolvimento do tecido adiposo inguinal (SHEN *et al.*, 2016).

## 7. CONCLUSÃO

A ingestão isocalórica entre os grupos evidencia o impacto que a DCS possui sob a homeostase metabólica governada pelo tecido adiposo. A ingestão da DCS durante 15 semanas induziu o aumento da massa dos tecidos adiposos epididimal e inguinal, refletindo no aumento do índice de adiposidade dos animais. A plasticidade dos adipócitos também foi influenciada pela DCS e ambos os tecidos apresentaram hipertrofia. No entanto, alterações na expressão do *Ppar $\gamma$ 2* podem representar um obstáculo para o remodelamento do tecido adiposo epididimal e inguinal. Os parâmetros glicometabólicos indicam que a DCS estimulou a síntese de triglicerídeos e VLDL-c, além de conduzir a resistência à insulina em animais euglicêmicos. No entanto, o tecido adiposo epididimal demonstrou redução da expressão significativa do *Ppar $\gamma$ 2* e *Cebpa* e, conseqüentemente, menor hiperplasia dos adipócitos.

Esses resultados corroboram com a literatura que evidencia a complexidade metabólica da obesidade com predominância de acúmulo de gordura nos depósitos viscerais. Nesses casos, a hiperplasia pode ser um recurso de adaptação da obesidade com a finalidade de moderar a resistência à insulina.

Sendo assim, é possível concluir que a hipertrofia dos tecidos adiposos foi suficiente para armazenar os produtos da síntese endógena de triglicerídeos estimulada pela DCS sem que houvesse a necessidade da hiperplasia desses tecidos adiposos, esse dado é reforçado pela redução da expressão significativa dos sinais adipogênicos (*PPAR $\gamma$ 2* e *CEBPA*). Esse é um retrato do período crítico de desenvolvimento da exposição à dieta durante 15 semanas.

## 8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA E P, PINHO C S, LEÃO A D, RODRIGUES I G, DINIZ A S, A. I. K. Ratio of visceral to subcutaneous fat as a predictor of cardiometabolic risk. **Revista Chilena de Nutrição**, v. 45, n. 1, p. 28–36, 2018.

AMMAZZALORSO, A.; AMOROSO, R. Inhibition of PPAR $\gamma$  by Natural Compounds as a Promising Strategy in Obesity and Diabetes. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 13, n. 1, p. 7–15, 2019.

BERNARDIS LL, PATTERSON BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**. 1968 Apr;40(4):527-8. doi: 10.1677/joe.0.0400527. PMID: 4868415.

BARGUT, T. C. L. et al. Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice. **Food and Function**, v. 7, n. 3, p. 1468–1476, 2016.

BOOTH, A. D. et al. Inhibition of adipose tissue PPAR $\gamma$  prevents increased adipocyte expansion after lipectomy and exacerbates a glucose-intolerant phenotype. **Cell Proliferation**, v. 50, n. 2, p. 1–10, 2017.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. APR, p. 1–16, 2016.

CORRALES, P.; VIDAL-PUIG, A.; MEDINA-GÓMEZ, G. PPARs and metabolic disorders associated with challenged adipose tissue plasticity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 2018.

BRITO OLIVEIRA COSTA, E.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125, 2013.

OLIVEIRA, D. et al. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases in ad libitum-fed rats irrespective of caloric intake. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 71–81, 2020.

FERRETTI, F.; MARIANI, M. Simple vs. complex carbohydrate dietary patterns and the global

overweight and obesity pandemic. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, p. 12, 2017.

FONSECA-ALANIZ, M. et al. Tecido Adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 216–29, 2006.

FREITAS, R. et al. Hypertriglyceridemic waist phenotype: associated factors and comparison with other cardiovascular and metabolic risk indicators in the ELSA-Brasil study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p. 1–16, 2018.

GEALEKMAN, O. et al. Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. **Circulation**, v. 123, n. 2, p. 186–194, 2011.

GUAY, C. et al. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? **Translational Research**, v. 157, n. 4, p. 253–264, 2011.

GUGLIELMI, V.; SBRACCIA, P. Obesity phenotypes: Depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v. 23, n. 1, p. 3–14, 2018.

GUILLERMIER, C. et al. Imaging mass spectrometry demonstrates age- related decline in human adipose plasticity Find the latest version : Imaging mass spectrometry demonstrates age-related decline in human adipose plasticity. **JCI INSIGHT**, v. 2, n. 5, p. 1–11, 2017.

HACZEYNI, F.; FARRELL, G. C. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 2, p. 406–420, 2018.

HE, W. et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15712–15717, 2003.

HERMSDORFF, H.; MONTEIRO, J. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde está o problema? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, p. 804–809, 2004.

HUANG, H. et al. A social contagious model of the obesity epidemic. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–9, 2016.

ITEM, F.; KONRAD, D. Visceral fat and metabolic inflammation: The portal theory revisited. **Obesity Reviews**, v. 13, p. 30–39, 2012.

JORDI FOLCH, L.; STANLEY, S. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. **United States Public Health Service**, n. 3, p. 13, 1953.

LOWE, C. E.; O'RAHILLY, S.; ROCHFORD, J. J. Adipogenesis at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 16, p. 2681–2686, 2011.

MALAFAIA PAULO AFONSO; KAREN NEGUME SUE, M. A. C. A. B. N. N. C. A. P. M. R. B. L. A. A Indução de obesidade com sacarose em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 26, n. Suplemento 1, p. 17–21, 2013.

MOLICA, F. et al. Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 113, n. 2, p. 1–14, 2015.

MOON HU, Ha KH, Han SJ, Kim HJ, Kim DJ. The Association of Adiponectin and Visceral Fat with Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. **J Korean Med Sci**. 2018 Dec 26;34(1):e7. doi: 10.3346/jkms.2019.34.e7. PMID: 30618514; PMCID: PMC6318440.

MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. K. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1–24, 2016.

NEELAND, I. J. et al. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 715–725, 2019.

NEMER, A. S. DE A.; NEVES, F. J. DAS N.; FERREIRA, J. E. DE S. **Exames Laboratoriais - Nemer, Neves e Ferreira (1).pdf**. [s.l: s.n.].

PALMER, B. F.; CLEGG, D. The sexual dimorphism of obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 31, n. 3, p. 477–479, 2013.

PINHO, C. P. S. et al. Waist circumference measurement sites and their association with visceral and subcutaneous fat and cardiometabolic abnormalities. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 416–423, 2018.

POLACOW, V. O.; LANCHI, A. H. Dietas hiperglicídicas: Efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 3, p. 389–400, 2007.

QUEIROZ, K. et al. Molecular Mechanism Driving Retroperitoneal Adipocyte Hypertrophy and Hyperplasia in Response to a High-sugar Diet. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, p. 1–38, 2014.

RIPPE, J. A. T. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors : Current Understanding. **NUTRIENTS**, v. 8, p. 1–19, 2016.

RIPPE, J. M.; ANGELOPOULOS, T. J. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors : Current Understanding. **NUTRIENTS**, v. 8, n. 697, p. 1–19, 2016.

SANTOS, Talita Adriana Pereira dos. Epigenética no tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com dieta rica em carboidratos simples após treinamento físico de natação. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

SHEN, Y. et al. Acute exercise regulates adipogenic gene expression in white adipose tissue. **Biology of Sport**, v. 33, n. 4, p. 381–391, 2016.

SONG, J. et al. Distinctive Roles of Sirtuins on Diabetes, Protective or Detrimental? **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. November, p. 1–13, 2018.

STRABLE, M. S.; NTAMBI, J. M. Genetic control of de novo lipogenesis : role in diet-induced obesity. v. 45, n. January, p. 199–214, 2010.

SUBRAMANIAN, S.; CHAIT, A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 819–825, 2012.

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

## 9. ANEXO

### I. Certificado de aprovação do protocolo nº 2016/26 do uso de animais.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@ufop.ufop.br](mailto:ceua@ufop.ufop.br)



#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2016/26**, intitulado "**Efeito da dieta rica em carboidratos simples e dieta rica em gorduras sobre a modulação metabólica e cardiovascular em ratos Wistar treinados por natação: Fase II- análises epigenéticas**", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). **Lenice Kappes Becker**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Ratos Wistar	130	22 dias	Macho	CCA/UFOP

**Restrição de dieta:** ( X ) sim ( ) não

**Especificar a dieta:** Dieta controle grupos 1, 4, 5, 8/ Dieta rica em açúcar grupos 2, 3, 6 e 7/ Dieta Hiperlipídica grupos 9 e 10.

**Este Certificado expira em: 15/07/2020**

Ouro Preto, 9 de junho de 2016.

**Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker**  
Coordenadora da CEUA/UFOP