



JULIANA FALCATO VECINA

Atividade moduladora da alga *Chlorella vulgaris* sobre os parâmetros imunohematopoéticos, metabólicos e de sinalização de insulina em animais obesos.

Campinas

2013





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

JULIANA FALCATO VECINA

Atividade moduladora da alga *Chlorella vulgaris* sobre os  
parâmetros imunohematopoéticos, metabólicos e de  
sinalização de insulina em animais obesos.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Mary Luci de Souza Queiroz

Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Mario José Abdalla Saad

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Este exemplar corresponde à versão final da tese  
defendida por Juliana Falcato Vecina e orientada pelo  
Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz.

Projeto Financiado pela Fapesp

Processos n<sup>º</sup> 10/50100-3 e 11/50903-1

Campinas

2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V496a	<p>Vecina, Juliana Falcato, 1981- Atividade moduladora da alga <i>Chlorella vulgaris</i> sobre os parâmetros imunohematopoiéticos, metabólicos e de sinalização de insulina em animais obesos / Juliana Falcato Vecina. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz. Coorientador : Mario Jose Abdalla Saad. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Dislipidemia. 4. Imunossupressão. I. Queiroz, Mary Luci de Souza, 1948-. II. Saad, Mario Jose Abdalla, 1956-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Modulation by the algae *Chlorella vulgaris* on immunohematopoietic, metabolic and insulin signaling parameters in obese animals

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

Insulin resistance

Dyslipidemia

Hematopoiesis

Immunosuppression

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Doutora em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Mario Jose Abdalla Saad [Coorientador]

Gabriel Forato Anê

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Eduardo Rochete Ropelle

Suzana Beatriz Verissimo de Mello

**Data da defesa:** 31-07-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JULIANA FALCATO VECINA

---

ORIENTADORA: PROF. DR. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

COORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD

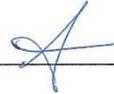
---

---

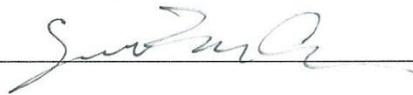
### MEMBROS:

---

1. PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD



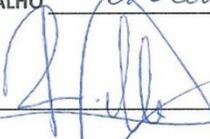
2. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHE



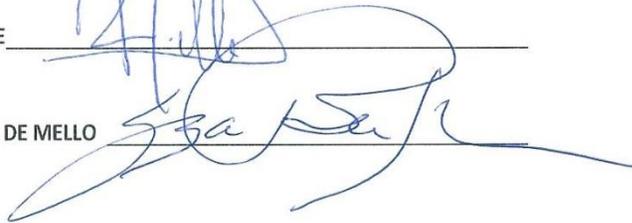
3. PROF. DR. CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO



4. PROF. DR. EDUARDO ROCHETE ROPELLE



5. PROF. DR. SUZANA BEATRIZ VERISSIMO DE MELLO



---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 31 de julho de 2013

---



## **DEDICATÓRIA**

*À minha família, única e essencial.*

*Aos meus queridos pais, sempre presentes, Aline e José Francisco.*

*Ao meu irmão, meu porto seguro, Juarez,*

*à minha cunhada do coração, Flávia,*

*e aos meus sobrinhos, amores verdadeiros, Alexandre e Rafaela.*



## AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre iluminou meu caminho e nunca me abandonou sempre me guiando no caminho da luz.

À Maria Desatadora dos Nós que nunca deixou de passar na minha frente.

Ao meu querido São Francisco, Santo protetor dos animais, que sempre me iluminou para que todos os procedimentos fossem tranquilos, permitindo paz aos animais.

Ao meu anjo da guarda que sempre me protegeu nas horas de solidão.

À minha orientadora, Profa Dra Mary Luci de Souza Queiroz, pela oportunidade e por me ajudar a buscar meu eu interior.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad, pela oportunidade e, principalmente por permitir entrar em contato com seu laboratório de pesquisa, proporcionando novos ensinamentos profissionais e pessoais.

Ao Prof. Antonio Zorzano, meu orientador temporário na Espanha (IRB – Barcelona), que com toda sua paciência, me ensinou novas metodologias e conselhos para melhorar meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por conceder minha bolsa de doutorado e auxílio do projeto permitindo que tudo isso se realizasse.

Ao Laboratório CFU/Imunotoxicologia que me acolheu de braços abertos.

À Sueli, técnica do laboratório CFU/Imunotoxicologia, por sua paciência, seus puxões de orelha sempre quando necessário e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do laboratório CFU/Imunotoxicologia, Cristiane, Samara e Jessica, que sempre estiveram dispostas para solucionar dúvidas e ajudar quando necessário.

À Julia de Souza Queiroz, colega de trabalho e amiga, que sempre ajudou e mesmo a distância sei que está na torcida.

À Érica do Cemib, que sempre atendeu meus pedidos com toda simpatia e paciência.

À Amanda, do laboratório multidisciplinar, por permitir que os experimentos fossem continuados e contatos para análises posteriores.

À Profa Dra. Claudia Bincoletto (Infar – UNIFESP) por permitir que as citometrias fossem realizadas em seu laboratório.

Aos colegas conquistados na Unifesp, em especial ao Christiano Barbosa que ajudou a desenvolver as metodologias de toda citometria.

Ao Antonio, responsável pelo laboratório no Gastrocentro, que, com toda paciência, me ensinou a metodologia para dosar ácidos graxos livres.

Ao seu Miguel e Denise, que sempre cuidaram bem das minhas caixas e meus animais experimentais. Sempre com conversas bem animadas.

Ao Sr. Luís Janeri e Sr. Jósimo Pinheiro, funcionários do Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina (LICRI), pelo constante suporte e apoio.

Ao Bruno, secretário da pós-graduação, que sempre foi acessível ajudando em qualquer dúvida necessária.

À minha banca de qualificação, Prof Dr. Gabriel Anhê, Profa. Dra. Sissi Paschoal, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, por seus conselhos a fim de melhorar meu projeto.

Aos membros da minha banca de defesa, Prof. Dr. Mario Saad, Prof. Dr. Gabriel Anhê, Profa Dra. Carla Carvalho, Prof. Dr. Eduardo Ropelle, Profa. Dra. Suzana de Mello, pela paciência e conselhos no desenvolvimento final desse projeto.

Às alunas de iniciação científica do CFU, Fabiana Gomes Ferreira e Camilla Biancalana de Aquino, que sempre me receberam com sorrisos e cuidaram dos meus animais nas minhas idas e vindas à Congressos.

Aos animais que não morreram em vão e fizeram parte desse projeto.

Ao Marcos Jr (Marquito), colega de trabalho, amigo e braço direito, que fez parte de mais da metade do desenvolvimento desse projeto. Que mesmo quando tomou bronca não deixou de me ajudar e apoiar.

Às minhas queridas amigas, Michelle Parise e Andrana Calgarotto, amizade conquistada entre tantas turbulências, mas sólida como uma pedra. Que sempre me apoiaram nos períodos difíceis e alegres.

Ao meu querido colega de trabalho e grande amigo, Alexandre Gabarra de Oliveira, que nunca me deixou desistir, sempre incentivando e dando orientações não só para o desenvolvimento profissional, mas para a vida.

Aos colegas e amigos conquistados no LICRI, em especial à Sandra, Carol, Juliana, Fernanda, Natália, Any, Patrícia, Marília, Bruno, Thiago e Guilherme, sempre com bom humor me ajudaram a encontrar as coisas e descobrir meus erros nas metodologias.

Ao Prof. Dr. Dennys Cintra, pela oportunidade de realizar meu estágio docente e conselhos didáticos.

À Dioze, amiga da época do mestrado, que hoje me ajuda e me ensina novas metodologias.

Aos colegas do laboratório do Prof Gabriel Anhê e Prof André Shenka, Ana, Andressa, Carols, Danilo e André que sempre emprestaram coisas, soluções e conversas.

Aos meus queridos amigos, Ana Paula Corrêa, Cristina Spacki, Bárbara dos Anjos, Mariana Baccaglioni, Thiago Matos, Kleiton Conceição, Juliana Faria, Carla Nunez, Ana Ligia Nassar, Fernanda Nascimento, Michelle Sabrina e Viviane Ferraz que sempre me aconselharam e me apoiaram nas horas difíceis, não deixando que eu desistisse desse projeto.

Aos meus queridos amigos argentinos, Andres e Carla, pela amizade e incentivo.

Ao meu amigo, Bruno Monteiro, companheiro pelo facebook de todas as minhas incubações dos ELISAs.

À minha querida amiga-irmã, Tatiana Vianna, que sempre me apoiou me ouvindo e, principalmente me aconselhando, coisa que só uma irmã mais velha poderia fazer.

Aos meus amigos da Espanha, M<sup>a</sup> Àngels, Yuliana, Nacho, Montse, Ana, Helena, que nunca se esqueceram de mim e sempre estiveram na torcida para que isso se realizasse.

Às minhas queridas amigas, Maria João e Amandine, irmãs do velho continente.

À Victória Rovira, minha mãe catalã.

À Profa Dra Helena Gotto, minha orientadora de mestrado e amiga, que sempre me aconselhou e cedeu seu colo de mãe.

A todos que fizeram parte e me ajudaram com tanta dedicação fazendo com que tudo isso acontecesse.

A todos da minha família que sempre acreditaram em mim. Em especial à minha avó que sempre me abençoou à distância.

Ao meu morzinho do coração, Rafaela de Oliveira (prima), que sempre foi meu anjo da guarda.

À Gesa Maria e ao Conan José, meus animais de estimação, sempre me acompanhando nas jornadas de estudos e me esperando em casa com tanta alegria.

Ao PoiZé, meu carro, que sempre quebrou, mas quebrou muitos galhos também, agilizando minha vida.

À minha cunhada querida, Flávia, pela amizade, pelos conselhos e risadas, pelo carinho em minhas estadias em sua casa.

Ao meu sobrinho, Alexandre, amor-eterno e xodó da Tia Jú, por brincar de massinha e assistir desenhos para desestressar o cérebro cansado da Tia Jú.

Ao novo membro Vecina, minha sobrinha, Rafaela, que mesmo sendo tão pequena já é esperada e amada por todos.

Ao meu irmão e melhor amigo, Juarez, que sempre acreditou nessa irmã e me apoiou mesmo a distância me socorrendo com seu ombro amigo.

Aos meus pais, Aline e José Francisco, pelo amor, carinho e compreensão. Por nunca desistiram de mim e, principalmente por todos os ensinamentos transmitidos e por continuarem acreditando no meu potencial e por sempre se dedicarem para que eu tivesse o melhor. Obrigada!!! Amo vocês...



*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.*

*Albert Einstein*



# RESUMO



A obesidade é um problema de epidemia mundial. Considerada um processo inflamatório crônico, favorece a resistência à insulina e o desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 2. Além disso, pode gerar diversos mediadores capazes de influenciar a complexa regulação hematopoética. A procura de agentes naturais que minimizam os transtornos da obesidade está recebendo uma atenção da comunidade científica. Nesse sentido, a *Chlorella vulgaris* (CV) surge como uma alternativa terapêutica e profilática das complicações da obesidade. Estudos realizados por nosso grupo demonstraram o efeito da alga na restauração da mielossupressão em diferentes modelos experimentais. Considerando estes aspectos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação profilática da CV na modulação imunohematopoética, metabólica e de sinalização da insulina em animais obesos. Para tanto, camundongos Balb/C foram divididos em 4 grupos: controle (C), dieta padrão e CV (C+CV), dieta hiperlipídica (DH) e DH+CV, em diferentes períodos. A administração de CV restaurou a redução da hematopoese medular e o aumento na hematopoese extramedular promovidos pela DH. A CV aumentou os níveis de atividade estimuladora de colônias (CSA) em todos os grupos estudados, sendo que o grupo DH+CV produziu um aumento adicional de 2 vezes em todos os períodos avaliados. O grupo DH apresentou diminuição no número de progenitores de granulócitos-monocítico na medula, a CV reverteu tal alteração. Em relação ao metabolismo e sinalização de insulina, o grupo DH demonstrou glicemia significativamente elevada em relação ao grupo C, CV foi capaz de reduzi-la neste grupo. Além disso, o grupo DH+CV mostrou maior tolerância à glicose e insulina, paralelamente a melhora na fosforilação de IR $\beta$ , IRS-1 e AKT no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Como esperado, o grupo DH apresentava níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e INF $\gamma$ ) confirmando a presença de inflamação subclínica nesses animais. A CV reduziu significativamente os níveis séricos dessas citocinas. Além disso, o grupo DH apresentou diminuição dos níveis de IL-10, sendo que a CV reverteu tais valores. A CV manteve os níveis de ácidos graxos livres, corpos cetônicos, triglicérides, colesterol e suas frações dentro dos valores fisiológicos no grupo DH+CV. Portanto, tais resultados mostram que a CV foi capaz de modular os parâmetros imunohematopoéticos e prevenir os efeitos deletérios induzidos pela DH em camundongos obesos. Sendo assim, a alga *Chlorella vulgaris* surge como uma promissora alternativa terapêutica e/ou complementar no tratamento da obesidade e suas complicações.



# **ABSTRACT**



Obesity is a worldwide epidemic problem. Considered a chronic inflammatory process, promotes insulin resistance and development of Diabetes Mellitus type 2 (DM2). In addition, could generate several mediators, which are capable to influence the complex hematopoiesis regulation, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) and leptin. The search for natural agents that minimize obesity-associated disorders is receiving attention from the scientific community. In this sense, *Chlorella vulgaris* (CV) has emerged as an alternative treatment and prophylaxis agent against obesity-related complications. Studies by our group have demonstrated the alga effect in myelosuppression recovery in different experimental models. Considering these aspects, the present study aimed to evaluate the prophylactic effect of CV on immunohematopoietic modulation, metabolic and insulin signaling in obese animals. To this, Balb/C mice were divided into 4 groups (n=6): control (C), standard diet and CV (C+CV), high-fat diet (HFD), HFD and CV (HFD+CV) in different periods. The administration of CV restored medullar hematopoiesis reduction and increased extramedullar hematopoiesis promoted by HFD. The CV increased the CSA levels in all groups. While, HFD+CV group produced a twice additional increase in the CSA levels in all periods studied. Only HFD group showed decrease in the number of GMP in BM, CV reverted this change. In relation to metabolism and insulin signaling, HFD group showed a significant increase in blood glucose compared to C, CV was able to decrease blood glucose on this group. In addition, HFD+CV group improve tolerance of glucose and insulin, together with the improvement of IR $\beta$ , IRS-1, and AKT phosphorylation in the liver, skeletal muscle and adipose tissue. As expected, HFD group showed increased levels of pro-Inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IFN $\gamma$ ), confirming the presence of subclinical inflammation in these animals. The CV causes a significant reduction in serum levels of these cytokines in this group. Moreover, HFD group showed reduced levels of IL-10, and the CV reverted such values. The CV maintained the levels of free fatty acids, ketone bodies, triglycerides, cholesterol and its fractions within the physiological values in HFD+CV group. Therefore, these results show that CV was able to modulate the immunohematopoietic parameters and prevent the deleterious effects of diet-induced obese mice. Thus, the alga *Chlorella vulgaris* appears as a promising prophylactic and therapeutic agent against obesity-related complications.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Determinação da composição nutricional da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 67
- Tabela 2-** Determinação da composição em ácidos graxos da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 68
- Tabela 3-** Determinação de vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 69
- Tabela 4-** Determinação de fibras total, solúvel e insolúvel da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 70
- Tabela 5-** Determinação de carotenóides e tocoferóis da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 70
- Tabela 6-** Determinação de minerais da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 70
- Tabela 7-** Determinação de aminoácidos totais da CV segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz. 71
- Tabela 8-** Número de células não-aderentes e aderentes (células viáveis x  $10^5$ /mL) das culturas líquidas de longa duração de células de medula óssea (LTBMCs) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 90
- Tabela 9-** Média e desvio padrão da porcentagem de morte e viabilidade celular na medula óssea de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica (n=6) utilizando anexina V e 7 AAD. 106
- Tabela 10-** Quantificação e valores nutricionais das substâncias componentes da dieta normal e hiperlipídica. 161



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Via de sinalização da insulina (esquema). Adaptado: Carvalheira *et al.* Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 46(4): 419-425, 2002. 45
- Figura 2-** Linfócitos T helper (Th 1 e Th 2). Adaptado: Vaz *et.al*, 2007. 49
- Figura 3-** Hematopoese (esquema). Adaptado: Silva, P.F. 52
- Figura 4-** Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos coletados semanalmente no sobrenadante de culturas líquidas de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 86
- Figura 5-** Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos coletados semanalmente no sobrenadante de culturas líquidas de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 87
- Figura 6-** Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos coletados semanalmente no sobrenadante de culturas líquidas de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 88
- Figura 7-** Aspecto microscópico da LTBMC de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 91
- Figura 8-** Níveis de interleucina (IL)-1 $\alpha$  e IL-6 no sobrenadante das culturas líquidas de longa duração de células de medula óssea (LTBMC) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 93
- Figura 9-** Número de progenitores granulócito-macrófagos (CFU-GM) da medula óssea (A) e do baço (B) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica durante 15 dias. 95

**Figura 10-** Número de progenitores granulócito-macrofágos (CFU-GM) da medula óssea (A) e do baço (B) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica durante 30 dias. 96

**Figura 11-** Número de progenitores granulócito-macrofágos (CFU-GM) da medula óssea (A) e do baço (B) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica durante 45 dias. 97

**Figura 12-** Atividade estimuladora de colônias (CSA) nas amostras de soro (*pool*) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica e não tratados ou tratados por 5 dias prévios com 50mg/Kg/dia de CV. 99

**Figura 13-** Porcentagem de células progenitoras hematopoéticas primitivas (CTH) da medula óssea coletada de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 101

**Figura 14-** Porcentagem de progenitores: granulócito-monocítico (GMP), mielóide comum (CMP) e eritróide/megacariocítico (MEP) da medula óssea coletada de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 103

**Figura 15-** Porcentagem de granulócitos (GRA), macrófagos (MACRO), eritrócitos (ERITRO) e linfócitos (LINFO) da medula óssea coletada de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 105

**Figura 16-** Peso (A), ganho de peso (B) e peso semanal (C) dos camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 107

**Figura 17-** Glicemia (mg/dL) dos camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 108

**Figura 18-** Alterações na glicemia através dos Testes de Tolerância à Glicose (GTT – A e AUC - B) e de Tolerância à insulina (ITT – C e kITT - D) em camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 109

**Figura 19-** Níveis séricos de colesterol total (A) e frações (B-D) (mg/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. 110

<b>Figura 20-</b> Níveis séricos de triglicerídeos (mg/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	111
<b>Figura 21-</b> Níveis séricos de ácidos graxos livres (mEq/L) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	112
<b>Figura 22-</b> Níveis séricos de corpos cetônicos (mM) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	113
<b>Figura 23-</b> Níveis séricos de leptina (ng/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	114
<b>Figura 24-</b> Níveis séricos de insulina (ng/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	115
<b>Figura 25-</b> Efeitos da administração de CV na sinalização de insulina do fígado, músculo e tecido adiposo de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	117
<b>Figura 26-</b> Efeitos da administração de CV na fosforilação em serina 307 do IRS-1 do fígado (A), músculo (B) e tecido adiposo (C) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	118
<b>Figura 27-</b> Níveis séricos de citocinas de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	120
<b>Figura 28-</b> Definição do <i>gate</i> para determinar a presença de apoptose inicial e tardia, e viabilidade de células (Lin <sup>-</sup> FLK <sup>-</sup> cKit <sup>+</sup> ) da medula óssea de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.	163



## LISTA DE ABREVIATURAS

7 AAD	7 amino actinomicina D
ACTH	Hormônio adreno-corticotrópico
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGLs	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ANOVA	Análise de variância
C	Controle
CFU-GM	Células progenitoras comprometidas com as linhagens granulócitos e macrófagos
CMP	Progenitor hematopoético mielóide comum
CP	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
CSA	Atividade estimuladora de colônias
CSF	Fator estimulador do crescimento de colônias
CTH	Células tronco hematopoéticas
CV	<i>Chlorella vulgaris</i>
CVDH	<i>Chlorella vulgaris</i> e dieta hiperlipídica
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DH	Dieta hiperlipídica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DP	Desvio padrão

ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERITRO	Eritrócitos
GLUT4	Transportador de glicose 4
GM-CSF	Fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos
GMP	Progenitor hemapoético mielomonocítico
GRA	Granulócitos
GTT	Teste de tolerância à glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta Hiperlipídica (do inglês, <i>high fat diet</i> )
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IB	Imunoblot
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iKK $\beta$	inibidor do fator nuclear kappa B
IL-	Interleucina-
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
IR	Receptor da insulina
IRS	Substrato para o receptor da insulina
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	c-Jun-N-terminal quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LINFO	Linfócitos
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
M1	Macrófago clássico
M2	Macrófago alternativo
MACRO	Macrófagos
MCP-1	Proteína quimioatraente para monócitos-1
MEP	Progenitor hematopoético eritróide/megacariocítico
MO	Medula óssea
NFκB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Chumbo
PI 3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PPAR $\alpha/\gamma$	Receptor para peroxissomo proliferador-ativado
AR	Artrite reumatóide
SBF	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
$\omega$ -3	ômega-3
$\omega$ -6	ômega-6



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>21</b>
<b>1- INTRODUÇÃO</b>	<b>39</b>
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>63</b>
<b>3.1- Animais</b>	<b>65</b>
<b>3.2- Composição Nutricional da <i>Chlorella vulgaris</i> (CV)</b>	<b>65</b>
3.2.1- Determinação de Umidade e Voláteis	65
3.2.2- Determinação de Cinzas	65
3.2.3- Determinação de Lipídios Totais	66
3.2.4- Determinação de Proteínas	66
3.2.5- Determinação de Carboidratos	66
3.2.6- Determinação de Calorias	66
3.2.7- Determinação da composição em ácidos graxos da CV	67
3.2.8- Determinação de vitaminas, carotenóides, fibras, minerais e aminoácidos da CV	69
<b>3.3- Modelo de obesidade</b>	<b>71</b>
<b>3.4- Divisão dos grupos</b>	<b>71</b>
<b>3.5- Preparo da alga CV Tratamento</b>	<b>71</b>
<b>3.6- Determinação da massa corporal</b>	<b>72</b>
<b>3.7- Cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC)</b>	<b>72</b>

3.7.1- Dosagem do sobrenadante de citocinas pelo método imunoenzimático (ELISA)	73
<b>3.8- Avaliação dos níveis de Atividade Estimuladora Hematopoética do soro (CSA)</b>	<b>74</b>
3.8.1- Cultura Clonal de precursores hematopoéticos	74
<b>3.9- Imunofenotipagem de células hematopoéticas da medula óssea</b>	<b>74</b>
<b>3.10- Determinação da morte celular por citometria de fluxo</b>	<b>75</b>
<b>3.11- Dosagem sérica dos níveis de glicose</b>	<b>75</b>
<b>3.12- Análises bioquímicas dos níveis séricos de ácidos graxos livres, corpos cetônicos, triglicerídeos, colesterol total e frações</b>	<b>75</b>
<b>3.13- Teste de tolerância glicose (GTT)</b>	<b>76</b>
<b>3.14- Teste de tolerância à insulina (ITT)</b>	<b>76</b>
<b>3.15- Dosagem sérica dos níveis de leptina</b>	<b>76</b>
<b>3.16- Dosagem sérica dos níveis de insulina</b>	<b>76</b>
<b>3.17- Expressão das proteínas totais e fosforiladas (IR<math>\beta</math>, IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal</b>	<b>77</b>
3.17.1- Eletroforese	77
3.17.2- Extração dos tecidos	78
3.17.3- <i>Immunoblotting</i> ou <i>Westernblotting</i>	79
<b>3.18- Dosagem sérica dos níveis de citocinas (TGF-<math>\beta</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IL-1, IL-6, MCP-1, IL-10, TNF-<math>\alpha</math> e IL-33)</b>	<b>80</b>
<b>3.19- Análise Estatística</b>	<b>81</b>

<b>4- RESULTADOS</b>	<b>83</b>
<b>4.1- Parâmetros Imunohematopoéticos</b>	<b>85</b>
4.1.1- Cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC)	85
4.1.1.1- Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não-aderentes da LTBMC	85
4.1.1.2- Viabilidade de células não-aderentes e aderentes	89
4.1.1.3- Formação de estroma medular em LTBMC	91
4.1.1.4- Produção de citocinas (IL-1 $\alpha$ e IL-6) no sobrenadante de LTBMC	92
4.1.2- Cultura Clonal de precursores hematopoéticos	94
4.1.3- Avaliação da atividade estimuladora de colônias do soro (CSA)	98
4.1.4- Imunofenotipagem de células hematopoéticas da medula óssea	100
4.1.4.1- Células progenitoras hematopoéticas primitivas (CTH) da medula óssea	100
4.1.4.2- Células progenitoras hematopoéticas: granulócito-monocítico (GMP), mielóide comum (CMP) e eritróide/megacariocítico (MEP) da medula óssea	102
4.1.4.3- Células hematopoéticas maduras: granulócitos (GRA), macrófagos (MACRO), eritrócitos (ERITRO) e linfócitos (LINFO) da medula óssea	104
4.1.5- Determinação da morte celular em células hematopoéticas da medula óssea	106
<b>4.2- Parâmetros metabólicos e via de sinalização de insulina</b>	<b>107</b>
4.2.1- Determinação da massa corporal	107
4.2.2- Dosagem sérica dos níveis da glicose	108

4.2.3- Testes de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT)	109
4.2.4- Dosagem sérica dos níveis de colesterol total e frações	110
4.2.5- Dosagem sérica dos níveis de triglicerídeos	111
4.2.6- Dosagem sérica dos níveis de ácidos graxos livres	112
4.2.7- Dosagem sérica dos níveis de corpos cetônicos	113
4.2.8- Dosagem sérica dos níveis de leptina	114
4.2.9- Dosagem sérica dos níveis de insulina	115
4.2.10- Expressão das proteínas totais e fosforiladas (IR $\beta$ , IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal	116
4.2.11- Dosagem sérica dos níveis de citocinas (TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, MCP-1, IL-10, TNF- $\alpha$ e IL-33)	119
<b>5- DISCUSSÃO</b>	<b>121</b>
<b>6- CONCLUSÕES</b>	<b>133</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>137</b>
<b>8- ANEXOS</b>	<b>159</b>
ANEXO I	161
ANEXO II	163
ANEXO III	165
ANEXO IV	165
ANEXO V	169
ANEXO VI	171

# 1- INTRODUÇÃO



# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- Obesidade

A obesidade é considerada uma doença crônica e de caráter multifuncional sendo relacionada com alta taxa de morbidade e mortalidade. Ela integra o grupo de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT) e atinge proporções epidêmicas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Stumvoll, 2005, Pinheiro *et al.*, 2004). Devido, em grande parte, à revolução industrial, acompanhada das mudanças no estilo de vida (menor atividade física e alimentação com alto teor energético), o peso corpóreo das populações vem aumentando de forma progressiva. A obesidade é considerada um problema grave de saúde pública mundial, sobrepondo-se à desnutrição e às doenças infectocontagiosas (Carneiro, 2005). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que a incidência de obesidade no mundo duplicou desde a década de 80 (WHO, 2012). Considerada um processo inflamatório crônico (Hotamisligil, 2006, Gregor e Hotamisligil, 2011, Donath e Shoelson, 2011), a obesidade está fortemente associada ao DM2 e outras complicações, como doenças cardiovasculares, câncer, osteoartrite, apnéia do sono e depressão (Seidell, 2000, Visscher e Seidell, 2001, Paracchini *et al.*, 2005, Harcourt *et al.*, 2013). O acúmulo excessivo do tecido adiposo ocorre devido à ingestão de um aporte calórico exagerado e crônico de substratos presentes em alimentos e bebidas, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos, em relação ao gasto energético do organismo, sendo o quadro normalmente agravado pelo sedentarismo (Carneiro, 2005).

Em condições normais, a interação metabólica e do sistema imune estão entre os requisitos básicos para a sobrevivência, apresentando-se profundamente ligados e interdependentes (Wellen e Hotasmisligil, 2005). Tal interação torna-se deletéria frente a distúrbios como a obesidade (Chandra, 1996, Chandra, 1997). A obesidade e a resistência à insulina estão associadas à inflamação crônica caracterizada pela produção anormal de citocinas, aumento nos níveis séricos de proteínas de fase aguda e outros mediadores, além da ativação das vias inflamatórias (NFκB e JNK) (Hotamisligil, 2006). O tecido adiposo expressa e secreta uma variedade destas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ ), as quais são denominadas adipocinas e atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina, apresentando

importantes papéis biológicos, no metabolismo energético, nas funções neuroendócrinas e imune (Calle e Kaaks, 2004, La Cava e Matarese, 2004, Wellen e Hotamisligil, 2005, Weisberg *et al.*, 2006, Pitombo *et al.*, 2007). Portanto, o tecido adiposo exerce papel chave na correlação entre obesidade, sistema imune e resistência à insulina (Samad *et al.*, 1997, Grimble, 2002, Maury e Brichard, 2010), sendo não só um tecido acumulador de gordura, mas órgão endócrino importante para a manutenção do metabolismo sistêmico (Ahima e Flier, 2000, Shoelson *et al.*, 2006, Gutierrez *et al.*, 2009).

Estudos mostram a relação entre vias inflamatórias e vias metabólicas, principalmente as quais são ativadas em resposta à insulina (Alexandre *et al.*, 2006, Martinez, 2006, Goorsens, 2008). Nesse sentido, achados da literatura mostram que citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, desempenham papel central nessa relação. Camundongos obesos apresentam aumento na expressão de TNF- $\alpha$  a qual possui capacidade de ativar várias vias inflamatórias responsáveis pela resistência à insulina (revisado por Hotamisligil, 2006) e também ocasiona o aumento da expressão de IL-33 no tecido adiposo (Wood *et al.*, 2009). Os níveis circulantes e a síntese pelos adipócitos de IL-6 também estão elevados na obesidade (Maury e Brichard, 2010). Estudos dinâmicos em humanos sugerem que a concentração plasmática de IL-6 aumenta no período pós-prandial, paralelamente aos níveis de glicose e insulina, sugerindo modulação pela IL-6 no metabolismo da glicose (Kern *et al.*, 1995; Straub *et al.*, 2000; Lopes, 2007). Sabe-se também que os níveis séricos de IL-1 estão relacionados tanto à destruição de células  $\beta$  pancreáticas como à diminuição da sensibilidade à insulina, apresentando-se elevados em pacientes DM2 (Fève e Bastard, 2009). Devido aos níveis elevados de quimiocinas, entre elas a MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1 ou CCL-2) e IL-8, no tecido adiposo, ocorre a infiltração de macrófagos para este local agravando o processo inflamatório na obesidade (Bruun *et al.*, 2005). Contudo, os níveis de IL-10 apresentam-se diminuídos nos obesos (Blüher *et al.*, 2005). Sabe-se que esta citocina é super expressada no tecido adiposo de camundongos magros, protegendo os adipócitos da resistência à insulina induzida pelo TNF- $\alpha$  (Lumeng *et al.*, 2007). Outro aspecto importante é a capacidade do IFN- $\gamma$  promover inflamação no tecido adiposo. Quando estimulado *in vitro*, os linfócitos T presentes neste tecido produzem elevados níveis de IFN- $\gamma$  o qual pode mediar a resposta imune adaptativa contribuindo para as complicações da obesidade (Rocha

*et al.*, 2008). Portanto, o balanço existente entre citocinas pró- e anti-inflamatórias são fatores importantes na obesidade (Lumeng *et al.*, 2007).

Estudos sobre causas e tratamentos para obesidade têm sido desenvolvidos em animais por meio de lesão neural, anormalidades genéticas, alterações endócrinas e alimentares (Pinheiro *et al.*, 2004, Carneiro, 2005, Paracchini *et al.*, 2005). Há evidências que a genética contribui para a regulação do peso corporal (Pinheiro *et al.*, 2004, Paracchini *et al.*, 2005, Lewandowski, 2006). Sabe-se que camundongos submetidos à dieta hiperlipídica palatável mostram, a partir de três semanas, um aumento na quantidade de tecido adiposo, com tendências a alterações no perfil lipídico e nas etapas iniciais da sinalização da insulina (Estadella *et al.*, 2004). Estudos recentes demonstram que o consumo de dietas ricas em gordura saturada promove resistência hipotalâmica aos hormônios anorexigênicos, à leptina e à insulina levando à perda progressiva no balanço entre ingestão de alimentos e termogênese, resultando em ganho de massa corpórea (Munzberg *et al.*, 2005, Milanski *et al.*, 2009). A resistência funcional à leptina e insulina no hipotálamo é consequência da ativação da inflamação induzida pela dieta hiperlipídica que leva a falha nas vias de transdução da produção desses hormônios (revisado por Moraes *et al.*, 2009).

## **1.2- Insulina**

Mais conhecida como hormônio anabólico, a insulina também é essencial para a manutenção da homeostase da glicose e do crescimento e diferenciação celular. Sua secreção é feita pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento nos níveis de glicose e aminoácidos circulantes. A insulina reduz a produção hepática de glicose, aumenta sua captação no tecido muscular e adiposo, estimula a lipogênese hepática e aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (Carvalho *et al.*, 2002).

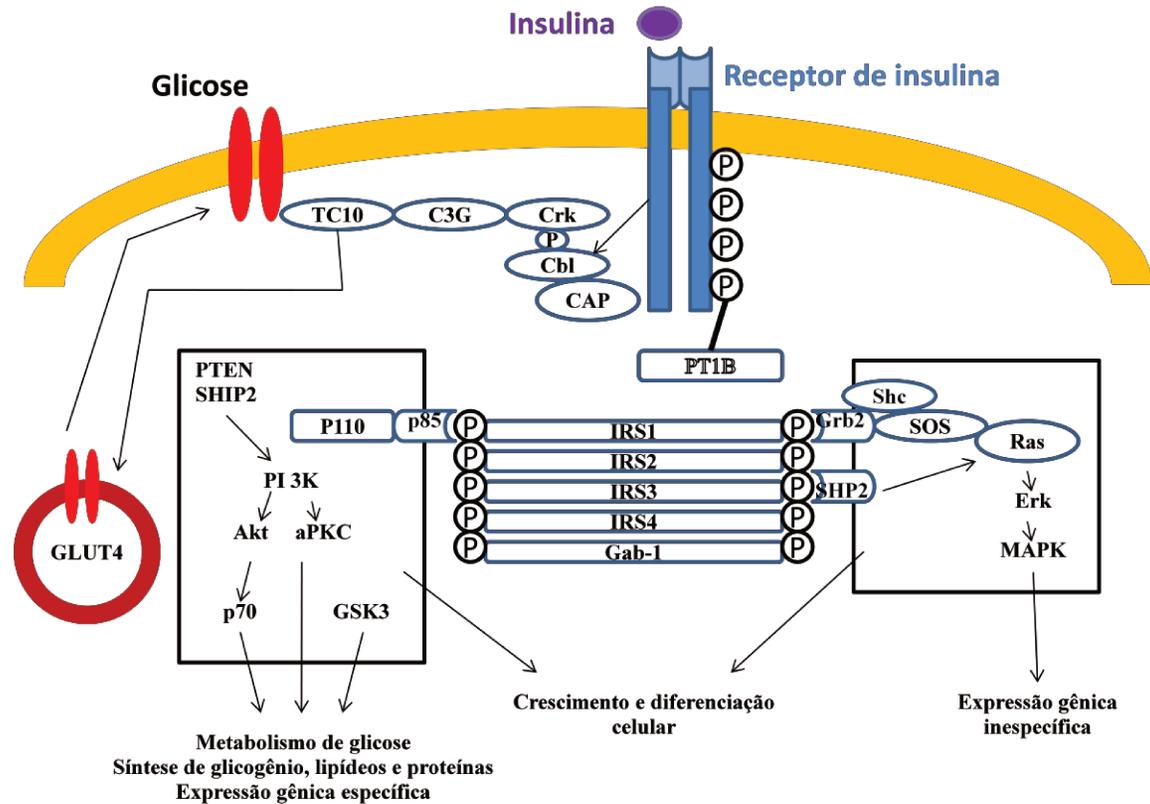
A sinalização intracelular da insulina inicia-se com a ligação da insulina ao seu receptor específico na membrana, o qual corresponde a uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . Sua ligação a subunidade  $\alpha$  faz com que a outra subunidade adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação aumentando ainda mais a atividade quinase do receptor

(Patt e Kahn, 1998). Uma vez ativado, o receptor fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Quatro desses substratos pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (White, 1998, Xu *et al.*, 2005). Outros incluem Shc, Gab-1, p60<sup>dok</sup>, Cbl, JAK2 e APS (Saad *et al.*, 1996, Pessin e Saltiel, 2000, Carvalheira *et al.*, 2001). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios homólogos a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfotidilinositol 3-quinase (PI 3K) (Araki *et al.*, 1994).

A PI 3K é um dímero composto por uma subunidade catalítica (p110) e uma regulatória (p85). As proteínas alvo dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da aPKC ( $\xi$  e  $\lambda$ ) (Baker *et al.*, 1992). A PI 3K é importante na regulação da mitogênese e diferenciação celular sendo considerada a única molécula intracelular essencial para o transporte (Saad *et al.*, 1992, Czech e Corvera, 1999).

Uma segunda via para a insulina estimular o transporte de glicose envolve a fosforilação do protooncogene Cbl, o qual está associado à proteína adaptadora CAP (Ribon *et al.*, 1998). Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína CrkII associada a proteína C3G, a qual catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10 ativando-a, o que ocasiona o segundo sinal para a translocação da proteína GLUT4, juntamente com à ativação da via PI 3K (Chiang *et al.*, 2001).

A MAP quinase (*mitogen-activated protein*) também é estimulada pela insulina. Inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc integrante da proteína Grb2 a qual está associada a SOS, proteína de troca de GDP por GTP da Ras, ativando-a. Tal ativação requer a participação da SHP2 ocorrendo a fosforilação em serina da cascata da MAPK levando à proliferação e diferenciação celulares (Boulton *et al.*, 1991, Paez-Espinosa *et al.*, 1999).



**Figura 1-** Via de sinalização da insulina (esquema). Adaptado: Carvalheira *et al.* Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 46(4): 419-425, 2002.

A insulina inibe a produção e liberação da glicose hepática por meio do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise. A síntese de glicogênio é obtida via desfosforilação da glicogênio-sintetase pela ação da Akt que fosforila a GSK-3 e pela proteína fosfatase I (Cross *et. al.*, 1995, Brady *et. al.*, 1997). Na gliconeogênese, a insulina inibe a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a frutose-1,6-bifosfatase e a glicose 6 fosfatase, mas ocasiona o aumento da transcrição de genes de enzimas glicolíticas como a glicoquinase e piruvato quinase (Pilkis e Granner, 1992). Outra ação clássica da insulina é estimular a síntese de ácidos graxos, tal mecanismo é mediado pelo aumento de fatores de transcrição SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding proteins*), que atuam sobre a acetil CoA carboxilase (ACC) responsável pela conversão da acetil CoA em malonil CoA e ácido graxo sintetase e, conseqüentemente em palmitato (Foretz *et. al.*, 1999).

A resistência à insulina refere-se a um fenômeno biológico (Kahn, 1978), no qual um nível maior de insulina é necessário não só para estimular as células a captarem a mesma quantidade de glicose, bem como para manter suas funções normais (Campbell *et al.*, 1988). Sabe-se que a resistência à insulina é um importante mecanismo fisiopatológico do DM2 (Stumvoll *et al.*, 2005, Gregor e Hotamisligil, 2011, Donath e Shoelson, 2011, Harcourt *et al.*, 2013), a qual em muitos casos, está associada a uma complexa rede de vias de sinalização, incluindo redução da fosforilação em tirosina do IR e seus substratos (IRS1/2), bem como redução da fosforilação em serina de Akt, nos tecidos-alvo da insulina (Hotamisligil *et al.*, 1996, Pessin e Saltiel, 2000, Saltiel e Kahn, 2001, Boura-Halfon e Zick, 2009). O mecanismo responsável por tal alteração é a ativação crônica de diversas serinas quinases, tais como c-Jun N-terminal quinase (JNK) e inibidor da quinase do fator de transcrição NFκB (iKKβ), que originam a resistência à insulina induzida pela obesidade, principalmente por promover fosforilação em serina do IRS-1 (Hirosumi *et al.*, 2002, Aguirre *et al.*, 2002, Shoelson *et al.*, 2006, Solinas e Karin, 2010). Nesse sentido, vários estudos tem recomendado que a fosforilação do IRS-1 em resíduos de ser 307 em roedores ou serina 312 em humanos poderia ser utilizada como marcador de resistência à insulina (Aguirre *et al.*, 2002, Shoelson *et al.*, 2006, Donath e Shoelson, 2011).

Diversos eventos podem agravar a resistência à insulina, entre eles a produção de citocina pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, que além de ativarem as vias inflamatórias (JNK, NFκB) também favorecem a migração celular, principalmente de macrófagos, para este tecido, bem como a polarização dessas células (mudança do fenótipo M2-alternativo para M1-clássico) (Lumeng *et al.*, 2007). Além disso, o excesso de nutrientes favorece o acúmulo de AGLs, bem como o estresse oxidativo, agravando o quadro de resistência à insulina (Hirosumi *et al.*, 2002, Wellen e Hotamisligil, 2005). Portanto, moduladores negativos da via de sinalização da insulina participam do estabelecimento de sua resistência e representam possíveis alvos terapêuticos para o DM2.

### **1.3- Leptina**

Inicialmente identificada como hormônio anti-obesidade (Elmqvist *et al.*, 1997), a leptina, termo de origem grega (*leptos* = magro), é um hormônio protéico produzido

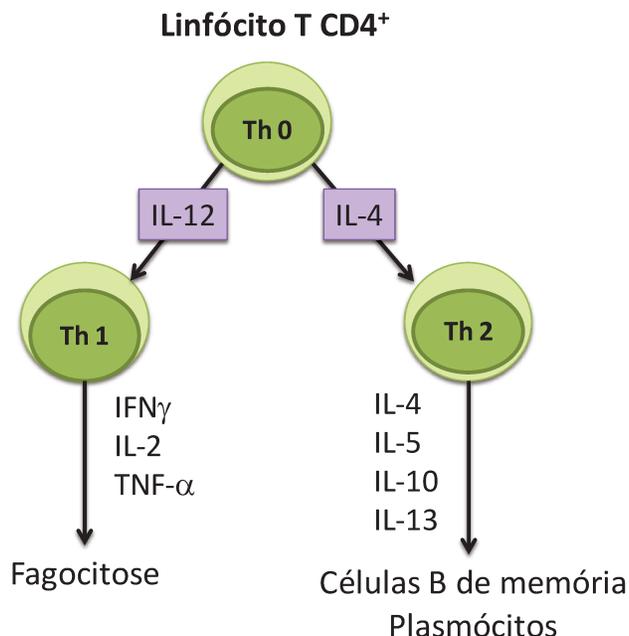
normalmente pelos adipócitos, cujo peso molecular é 16 KDa. Composta por 167 aa, apresenta estrutura semelhante às citocinas com ações pleiotrópicas na regulação da resposta imune (Lord *et al.*, 1998, Howard *et al.*, 1999). Seu gene *ob* está localizado no cromossomo 7 $\alpha$ 31.1 e foi identificado em 1994 (Zhang *et al.*, 1994). Após sua produção, é secretada na corrente sanguínea e liga-se a proteínas sendo transportada ao cérebro (hipotálamo) onde estimula ou inibe a liberação de vários neurotransmissores (Romero e Zanesco, 2006). Sua síntese também ocorre em outros locais, como na medula óssea, placenta, cartilagens, epitélio gástrico, músculo esquelético e cérebro, porém em menores quantidades (Paracchini *et al.*, 2005). Seu receptor é encontrado no saco vitelínico, fígado, estroma fetal, medula óssea (sistema linfematopoético e linhagem megacariocítica) e macrófagos (Bennett *et al.*, 1996), e pertence à superfamília de receptores de citocinas tipo I, considerado análogo ao receptor para IL-6 (Tartaglia *et al.*, 1995, Ahima e Osei, 2004). É conhecida como fator chave na regulação de respostas biológicas, tais como manutenção da homeostase, função neuroendócrina (Haynes *et al.*, 1997), angiogênese (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998, Bouloumie *et al.*, 1998), osteogênese (Ducy *et al.*, 2000) e reprodutiva (Chehab *et al.*, 2002).

A obesidade está associada com aumento dos níveis de leptina, a qual possui excelente correlação com a quantidade total de tecido adiposo. Portanto, quanto mais gordura corpórea presente, maiores serão seus níveis séricos (Friedman e Hallas, 1998, Frühbeck *et al.*, 2001). Estudos na literatura demonstram que a leptina está relacionada à sinalização da hematopoese, produzindo efeito direto sobre a proliferação de células hematopoéticas mais jovens e diferenciação de células das linhagens mielóide e eritróide (Gainsford *et al.*, 1996, Clayton *et al.*, 1997; Mikhail *et al.*, 1997; Hirose *et al.*, 1998; Konopleva *et al.*, 1999). A leptina pode ativar neutrófilos, monócitos, células dendríticas, macrófagos e células NK e estimular a produção de citocinas por linfócitos Th1 (Mattioli *et al.*, 2005). Outro aspecto importante é a ligação da leptina à modulação da imunidade adaptativa devido ao aumento da sobrevivência de células T e à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN $\gamma$  e IL-2 (Loffreda *et al.*, 1998), sendo reconhecida como um fator chave na estimulação da resposta imune.

Evidências recentes mostram seu envolvimento na promoção de várias doenças imunológicas, como a artrite reumatóide (AR), colite e esclerose múltipla (revisado por

Lam e Lu, 2007). Fatores como o jejum, o exercício prolongado, o frio, a testosterona e as catecolaminas levam à diminuição da expressão do gene de leptina, resultando na redução de sua concentração. Já a alimentação pós-jejum e insulina estimulam a transcrição do gene levando ao aumento de sua produção (Romero e Zanesco, 2006). Os glicocorticóides atuam sinergicamente com a insulina, entretanto, geralmente apresentam uma relação inversa com a leptina (Friedman e Halaas, 1998).

Em crianças com deficiência de leptina ocorre maior incidência de infecções e anormalidades no número e função de células T *in vitro*, com retorno à normalidade após o tratamento com leptina recombinante. Além disso, a sua deficiência congênita é associada à produção predominante de citocinas com perfil Th2, havendo migração para Th1 após a reposição (Farooqi e O'Rahilly, 2009). Devido aos seus efeitos múltiplos, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, a leptina pode ser considerada como imunomoduladora em algumas doenças em humanos (Peelman *et al.*, 2006). Da mesma forma, análises experimentais com camundongo deficiente para a produção de leptina (*ob/ob*) e para seu receptor (*db/db*) demonstraram mudanças no metabolismo energético e na ingestão de alimentos (Chen *et al.*, 1996), que sugerem alterações na imunidade inata e adaptativa (Mancuso *et al.*, 2006). A literatura mostra ainda o envolvimento desse hormônio na hematopoese (Fantuzzi e Faggioni, 2000). Em estudos experimentais foi verificado em cultura de células de medula óssea de camundongos *ob/ob* e *db/db* que ambos apresentaram números reduzidos de colônias linfóides e mielóides quando comparados aos animais selvagens (Bennett *et al.*, 1996, Umemoto *et al.*, 1997). A leptina ainda promove a timopoese em camundongos *ob/ob* (Hick *et al.*, 2006). O papel da leptina na linfopoese e mielopoese também foi demonstrado através de imunofenotipagem da medula óssea em camundongos normais e deficientes para este hormônio (*ob/ob*). O maior impacto da deficiência foi no compartimento das células B que apresentou uma redução de 70%, tanto no número absoluto de pré-B (21%) quanto nas células maduras (12%). A proporção mielóide manteve-se próxima à normalidade nos animais obesos, mas o número absoluto de granulócitos e monócitos sofreu diminuição de 40% e 25%, respectivamente. Após o tratamento com leptina, os valores celulares retornaram à normalidade (Claycombe *et al.*, 2008).



**Figura 2-** Linfócitos T helper (Th 1 e Th 2). Adaptado: Vaz *et.al*, 2007.

Em humanos e roedores, a leptina apresenta um ritmo circadiano e o pico de sua secreção ocorre durante a noite e nas primeiras horas da manhã com vida média de 30 minutos (Revisado por Ahima e Osei, 2004, Romero e Zanesco, 2006). O padrão de secreção também é influenciado pela alimentação (Revisado por Ahima e Osei, 2004). Em roedores as taxas sanguíneas de leptina elevam-se poucas horas após a ingestão alimentar. Em humanos, tal elevação só acontece após uma ingestão alimentar exagerada, mantida por vários dias. Após poucas horas de inanição ou jejum, ocorre diminuição nos níveis de leptina, o que indica que sua concentração não é regulada pela massa de tecido adiposo, mas por outros fatores, como alterações no balanço energético. O uso de agente hipoglicemiante, como o troglitazone, reduz a síntese de leptina devido à ação direta no gene *ob* (Cisternas, 2002).

#### **1.4- Hematopoese**

O tecido hematopoético possui alta taxa de proliferação e renovação celular. Os órgãos hematopoéticos têm a capacidade de aumentar a produção e maturação celular como mecanismo de adaptação a condições fisiológicas ou patológicas (Li *et. al.*, 2000).

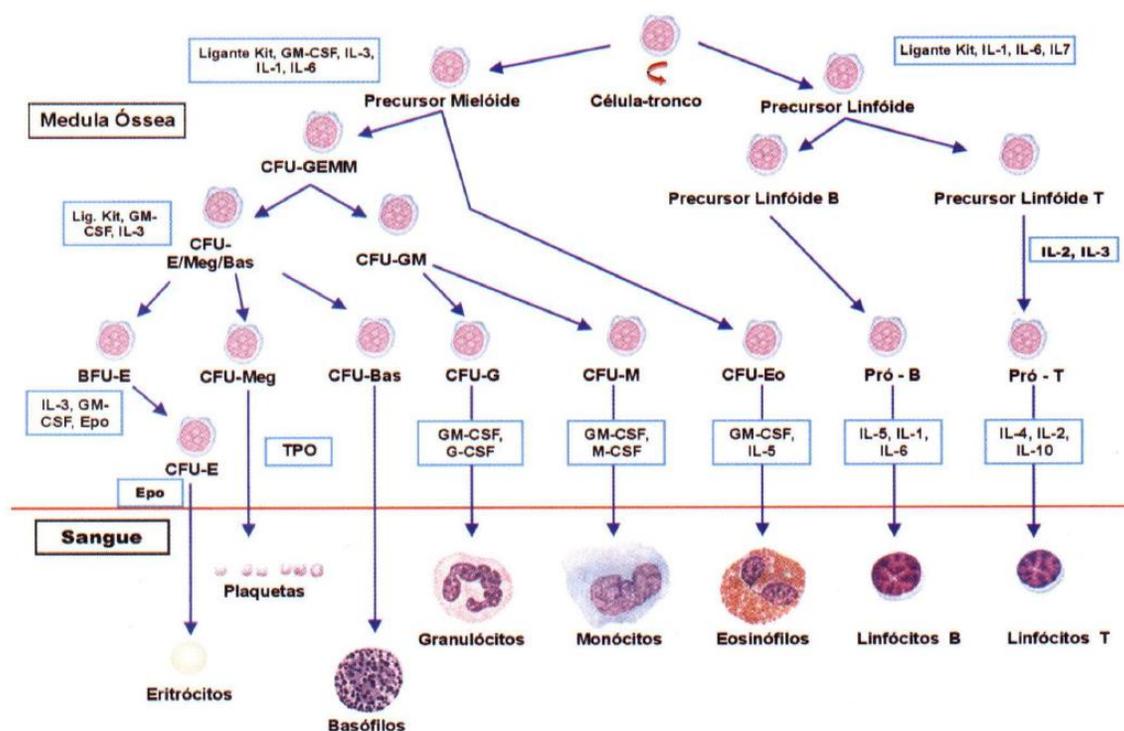
Estudos clínicos e experimentais demonstram que a exposição a várias formas de estresse altera a atividade de diferentes populações celulares comprometidas com a resposta imunológica (Chrousos, 2000). A maioria das células do sangue deriva das células progenitoras hematopoéticas da medula óssea, as quais proliferam e diferenciam em resposta a fatores neuroendócrinos locais e distantes. Desta forma, qualquer estímulo adverso capaz de influenciar o desenvolvimento destas células pode resultar em alterações na função imune. A importância das citocinas como mediadores de numerosos processos fisiológicos e patológicos e a demonstração das relevantes interações homeostáticas entre o cérebro e o sistema imunoematopoiético têm estimulado estudos para identificar as implicações funcionais da modulação dos efeitos desses mediadores em eventos de imunossupressão induzida pelos vários tipos de estresse (Marx *et al.*, 1998; Miyan *et al.*, 1998; Elenkov *et al.*, 1999).

Diferentes mecanismos atuam na regulação da hematopoese (Metcalf, 1981; Dorshkind, 1990; Gol'dberg *et al.*, 1990; Blalock, 1994; McEwen, 1997; Elenkov *et al.*, 1999; Maestroni, 2000). Um deles refere-se aos fatores do próprio microambiente da medula óssea, o qual é composto de células de músculo liso, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, adipócitos e condrócitos/osteoblastos. Estas células estromais estão em associação íntima com as células tronco-hematopoéticas e proporcionam um ambiente especializado para o crescimento e diferenciação das mesmas. Em condições de homeostase, a grande maioria destas células-tronco permanece quiescente no estroma, o que reflete a ausência de sinais estimuladores ou o envolvimento de sinais supressores. Estes sinais reguladores consistem principalmente de citocinas que agem direta ou indiretamente sobre estas células precursoras, visando regular tanto a hematopoese de repouso, quanto a rápida e reversível adaptação da hematopoese frente a diferentes tipos de estresse (Li *et al.*, 2000). As citocinas hematopoéticas [fatores estimuladores do crescimento de colônias (CSFs)] agem na medula óssea como fatores de crescimento e na periferia influenciam a atividade funcional das células maduras. Já as citocinas inflamatórias desempenham papel importante na fisiopatologia de vários estados inflamatórios e outras doenças severas como choque séptico e caquexia. Além disso, confirmando a característica pleiotrópica desses mediadores, aquelas com atividade predominantemente hematopoética também podem apresentar propriedades inflamatórias e

citocinas inflamatórias podem influenciar (direta ou indiretamente) as células hematopoéticas. Neste sentido, podem ser detectadas nas células do estroma a IL-1, a IL-6 e outras citocinas hematopoéticas. IL-1 e IL-6 sozinhas têm pouco ou nenhum efeito sobre as células precursoras da medula óssea, mas em sinergismo com outros CSFs são responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, tais como acentuada proliferação de precursores mielóides jovens, aumento nas taxas de proliferação e no número de progenitores comprometidos com diferentes linhagens, estímulo da liberação de citocinas por várias outras células, entre outras (Ikebuchi *et al.*, 1988, Eaves *et al.*, 1991, Dinarello, 1996, Metcalf, 2008). A IL-6 é considerada uma fator de sobrevivência para células tronco hematopoéticas (CTH) (Bernad *et al.*, 1994, Rodriguez *et al.*, 2004), desempenhando papel fundamental na produção e manutenção da mielopoese (Hauser *et al.*, 1994). Além disso, achados na literatura mostram que a IL-6 em associação com fatores estimuladores de colônia e outras citocinas (IL-1 e IL-3) regulam a atividade funcional das CTH (Muench *et al.*, 1992), confirmando sua ação sinérgica. Do mesmo modo, a IL-1 também é essencial para atividade funcional dessas células (Muench *et al.*, 1992) e apresenta como característica principal o aumento da síntese de CSFs (Dinarello, 1996).

O balanço existente entre citocinas pró- e anti-inflamatórias podem influenciar a hematopoese (Wellen e Hostamisligil, 2005). Citocinas como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , podem influenciar negativamente a hematopoese (revisado por Singbrant Söderberg *et al.*, 2009, Librets *et al.*, 2011, Mizrahi *et al.*, 2013). O TGF- $\beta$  é um potente inibidor da proliferação de CTH e progenitores hematopoéticos. Tal citocina controla o microambiente medular e a fase quiescente da CTH (revisado por Singbrant Söderberg *et al.*, 2009, Yamazaki *et al.*, 2009), inibindo os progenitores. Também causa redução da expressão de vários receptores para citocinas que estimulam a hematopoese (CSF, IL-3 e SCF) (Jacobsen *et al.*, 1994). As funções hematopoéticas do TNF- $\alpha$  ainda são controversas (Mizrahi *et al.*, 2013). Entretanto, estudos atribuem falha na hematopoese devido à ação nociva do TNF- $\alpha$ , favorecendo a apoptose através da indução de caspase 8 (Wang *et al.*, 2008). Outro aspecto observado é a imunossupressão medular resultante da diminuição dos receptores para CSF, IL-3 e SCF, após adição *in vitro* de TNF- $\alpha$  (Zhang *et al.*, 1995, Dybedal *et al.*, 2001). Além disso, esta citocina pode estimular a síntese de IL-8 (revisado por Kobashi *et al.*, 2009), a qual também diminui o número de progenitores hematopoéticos (Broxmeyer *et al.*, 1996,

Dudek *et al.*, 2003, Scupoli *et al.*, 2008). O IFN $\gamma$  apresenta efeito imunossupressivo medular, principalmente em relação a eritropoese, na qual há diminuição da meia-vida do eritrócito e inibição da eritropoese via IL-15 (Mullarky *et al.*, 2007, Librets *et al.*, 2011). Além de afetar a manutenção da CTH e inibir a formação de células B e eosinófilos (revisado por Librets *et al.*, 2011). Assim como o TGF- $\beta$ , também bloqueia o ciclo celular (Sato *et al.*, 1995) inibindo diretamente a formação de progenitores (revisado por Selleri *et al.*, 1996)



**Figura 3-** Hematopoese (esquema). Adaptado: Silva, P.F.

Informações acuradas sobre os mecanismos que afetam a hematopoese *in vivo* podem ser obtidas com o emprego da cultura de longa-duração das células da medula óssea (LTBMC), que consiste em um modelo *in vitro* para o estudo das interações entre as células progenitoras hematopoéticas e as células do estroma medular (Dexter *et al.*, 1977, Daniel *et al.*, 1989, Queiroz *et al.*, 2008). A importância deste tipo de cultura é que o balanço entre auto-renovação e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas é mantido por várias semanas na ausência de fatores de crescimento exógenos, sendo, portanto, totalmente

dependente da síntese e liberação de fatores de crescimento hematopoéticos endógenos. Nesta cultura, assim como ocorre *in vivo*, o contato físico entre as células do estroma e as células hematopoéticas produz o estímulo necessário para sobrevivência, crescimento, diferenciação e auto-renovação das células hematopoéticas. O estímulo para o crescimento e diferenciação destas células está localizado primariamente na superfície da membrana das células estromais através de moléculas associadas à membrana celular que se ligam a fatores de crescimento, como o GM-CSF, e os apresentam para as células hematopoéticas na forma biologicamente ativa. Este processo é totalmente dependente da formação de uma camada de células estromais aderentes, que ocorre pela combinação de vários fatores que incluem moléculas de adesão celular, comunicação intercelular, síntese, secreção e apresentação pelas células do estroma de concentrações apropriadas de fatores de crescimento estimuladores e inibitórios, além da síntese de moléculas da matriz extracelular.

Conforme apresentado acima, a obesidade pode gerar diversos mediadores, alguns com capacidade de influenciar a complexa regulação da hematopoese.

### **1.5- *Chlorella vulgaris* (descrita por M.V. Beijernick, 1890)**

CV é uma alga verde unicelular microscópica de água doce, da família *Oocystaceae*, com capacidade de se auto-reproduzir. Reconhecida principalmente pela sua rica composição de nutrientes essenciais para a manutenção da autodefesa natural do indivíduo, esta alga possui clorofila, beta caroteno, vitaminas, proteínas, minerais, enzimas, entre outros (Hasegawa *et al.*, 2000, Vijayavel *et al.*, 2007; Rodriguez-Garcia e Guil-Guerrero, 2008, Panahi *et al.*, 2012). Sua atividade adaptativa ou modificadora da resposta biológica é definida pela capacidade de reduzir no organismo os níveis de hormônios relacionados com o estresse. Resultados produzidos pelo nosso grupo demonstram que em presença de condições adversas, o hospedeiro que vem recebendo CV como complemento alimentar é capaz de reagir mais prontamente e com maior vigor na indução de mecanismos essenciais da defesa imunológica (Dantas e Queiroz, 1999; Justo *et al.*, 2001; Queiroz *et al.*, 2002, 2008, 2010, 2011; Souza-Queiroz *et al.*, 2004, 2008, 2013; Ramos, 2008 e 2010).

Em estudos anteriores, com o auxílio de modelos experimentais *in vivo*, nos quais a hematopoese tem um papel fundamental, investigamos os efeitos da alga sobre os

mecanismos reguladores do sistema imunohematopoético, visando aumentar ou restabelecer as defesas do próprio hospedeiro capazes de inibir processos malignos e infecciosos (Dantas e Queiroz, 1999, Dantas *et al.*, 1999; Justo *et al.*, 2001; Souza-Queiroz *et al.*, 2004 e 2008; Queiroz *et al.*, 2002, 2003, 2008, 2010 e 2011; Ramos, 2008 e 2010). Nossos resultados demonstram o efeito da alga na restauração da mielossupressão produzida pela evolução destas doenças pela normalização do número reduzido de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos na medula óssea. Estes resultados são importantes, uma vez que a redução no número de progenitores hematopoéticos na medula óssea representa um efeito agudo decorrente do rápido crescimento de certos tumores e da evolução de certos quadros infecciosos. Uma observação importante nestes estudos é que a reversão pela alga da mielossupressão induzida pelo agente agressor é acompanhada de aumento no tempo ou na taxa de sobrevida (Dantas e Queiroz, 1999, Dantas *et al.*, 1999; Justo *et al.*, 2001; Souza-Queiroz *et al.*, 2004 e 2008; Queiroz *et al.*, 2002, 2003a, 2008, 2010 e 2011, Ramos, 2008 e 2010).

O aumento na taxa ou duração da sobrevida e a prevenção da mielossupressão ocorreram paralelamente a um aumento significativo nos níveis *in vitro* de diferentes citocinas pró-inflamatórias e hematopoéticas, particularmente interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina-12 (IL-12), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), as quais são essenciais na recuperação do hospedeiro (Queiroz *et al.*, 2002, Ramos, 2008 e 2010 Hasegawa *et al.*, 1997, 2000). Estes achados corroboram trabalhos da literatura que demonstram a capacidade da CV em aumentar a expressão gênica de citocinas ativas no sistema hematopoético (Hasegawa *et al.*, 1997, 2000). A atividade das células *natural killer* (NK), potentes indutoras da produção de INF- $\gamma$ , também está aumentada em presença da CV (Dantas *et al.*, 1999, Ramos, 2008 e 2010).

A presença de radicais sulfidríla é outro atributo desta alga, fato que justifica seu uso *in vitro* na remoção de metais tóxicos (Wilde e Benemann, 1993; Veglio e Beolchini, 1997; Wong *et al.*, 1997; López *et al.*, 1998). Em estudos recentes sobre o efeito quelante da CV em animais expostos ao chumbo (Pb), observamos reduções significativas nos níveis do metal no sangue e em órgãos alvo, como ossos e rins em animais expostos ao metal e tratados com a alga. Além disso, a alga restaurou as concentrações elevadas de ácido 5-

aminolevulinico (ALA) no fígado e plasma, assim como a taxa de síntese de heme e de seus precursores em animais expostos ao metal (Queiroz *et al.*, 2003a, 2008 e 2011).

Em animais expostos ao Pb foram também analisados os efeitos do tratamento com CV sobre a interação entre as células do estroma da medula óssea e as células hematopoéticas, utilizando a cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC). A atividade funcional foi avaliada pela capacidade das células estromais não-aderentes de promoverem *in vitro* o crescimento e diferenciação de células progenitoras comprometidas com a linhagem granulócito-macrófago (CFU-GM). Os resultados demonstraram que o tratamento com CV de camundongos expostos ao Pb restaura tanto a reduzida capacidade das células estromais de produzirem CFU-GM, quanto os níveis reduzidos de IL-6, induzidos pelo metal (Queiroz *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que a capacidade da CV reduzir o conteúdo de Pb nos tecidos do corpo, em associação com seu efeito modulador sobre a atividade de citocinas hematopoéticas, pode inibir os efeitos imunossupressores do Pb sobre a atividade hematopoética na medula óssea e desta forma potencializar a vigilância imunológica.

Outro aspecto relevante dos efeitos da CV consiste na modulação da resposta ao estresse físico e psicogênico (Queiroz *et al.*, 2003b, Souza-Queiroz *et al.*, 2008). O estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) para produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e liberação de glicocorticóides. Nesse sentido, Hasegawa e colaboradores (2000) demonstraram que a CV pode prevenir os efeitos imunossupressores do estresse psicológico submetido em camundongos que observam outros animais receberam choque (*foot-shock*) pela inibição da produção de corticosteróides endógenos. O fato desta alga estimular a produção de citocinas como IL-1 e TNF- $\alpha$ , as quais deprimem a síntese de glicocorticóides, dão suporte a estes achados (Hasegawa *et al.*, 1997, 2000; Pariante *et al.*, 1999).

Em trabalho recente, avaliamos o crescimento e diferenciação de granulócitos e macrófagos na medula óssea de ratos tratados com CV, infectados com a bactéria *Lysteria monocytogenes* (LM) e expostos a estressores físicos e psicogênicos. Nossos resultados demonstraram que o impacto das duas modalidades de estresse aumentou de forma similar tanto a severidade quanto a duração da mielossupressão produzida pela infecção, sendo que este efeito foi completamente revertido no grupo estressado/infectado tratado com a alga. A

investigação dos mecanismos subjacentes à proteção produzida pela CV demonstrou aumentos significativos na atividade estimuladora hematopoética do soro, paralelamente à normalização dos níveis reduzidos de IFN $\gamma$  e dos níveis aumentados de interleucina 10 (IL-10), observados após exposição aos dois tipos de estressores. A avaliação da sobrevivência frente a uma dose letal de LM revelou cura de 50% no grupo apenas infectado e de 20% no grupo estressado/infectado. Estes resultados sugerem que o tratamento com CV constitui ferramenta eficaz na profilaxia da mielossupressão pós-estresse, mesmo com o agravamento do quadro clínico decorrente da presença de um estresse adicional, no caso, a infecção. (Souza-Queiroz *et al.*, 2008).

Em resumo podemos afirmar que a estimulação de células-tronco hematopoéticas e ativação de leucócitos maduros são aspectos importantes dos efeitos da CV sobre o sistema imunológico de hospedeiros imunossuprimidos. Em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que o tratamento com CV modula indiretamente a resposta imunológica e impede a supressão imunohematopoética ao induzir uma maior reserva de progenitores mielóides na medula óssea em consequência da liberação de citocinas biologicamente ativas (CSFs, IL-1, IL-6, entre outras).

Achados clínicos na literatura demonstram que a administração de CV a indivíduos expostos a fatores de alto risco para a produção de *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) e outras doenças relacionadas ao estilo de vida resultaram em aumento na expressão de genes relacionados a moléculas de transdução de sinal para a insulina, assim como de enzimas metabólicas, receptores, transportadores e citocinas relacionados com este hormônio. Nesses indivíduos, a administração de CV resultou tanto na redução da porcentagem de gordura corporal, quanto nos níveis séricos de colesterol total e glicose (Mizoguchi *et al.*, 2008). Em estudo experimental, Cherng e Shih (2005, 2006) observaram em camundongos com DM tipo I tratados com CV redução na glicemia, aumento de entrada de glicose no músculo esquelético, aumento na tolerância à ingestão de glicose e nenhuma alteração nos níveis sanguíneos de insulina. Estes relatos sugerem que a CV não afeta a secreção de insulina, mas previne a resistência a esse hormônio (Rodríguez-López e López-Quejada, 1971, Cherng e Shih, 2005, 2006). Neste contexto, Lee e Kim (2009) observaram aumento na expressão do principal transportador de glicose - GLUT4 (*glucose transporter type 4*) e

conseqüente acréscimo da entrada de glicose em células musculares de ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com CV.

Em relação ao colesterol, estudos clínicos e experimentais demonstraram que o uso de CV pode diminuir seus níveis sangüíneos devido ao aumento na excreção de esteróides neutros nas fezes (Okudo *et al.*, 1975, Sano *et al.*, 1988, Shibata *et al.*, 2001). Dietas ricas em fibras e em ácidos graxos não-saturados diminuem a absorção e favorecem a excreção intestinal de gorduras (Connor *et al.*, 1969), estando, portanto, associadas à redução dos níveis de colesterol e da taxa de lipídeos (Lee *et al.*, 2008). Segundo análises bioquímicas realizadas por Tanaka e colaboradores (1986), a CV utilizada em nosso estudo contém 44,4g de proteína, 39,5g de carboidratos e 15,4g de ácido nucléico em cada 100g (peso seco) do material total, sendo que lipídeos não foram detectados nessas análises. Por outro lado, estudos na literatura sobre a composição de outra espécie de alga denominada *Chlorella pyrenoidosa*, demonstraram presença de frações fosfolipídicas e glicolipídicas (Sano *et al.*, 1988) e de ácidos graxos (Radmann e Costa, 2008), o que explicaria a atividade moduladora desta alga nos níveis de colesterol demonstrada por Mizoguchi *et al.*, 2008. Esta aparente contradição nos levou a incluir a avaliação da composição da CV no presente estudo.



## **2- OBJETIVOS**



## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Gerais

Avaliar a ação da alga *Chlorella vulgaris* (CV) na atividade imunoematopoiética, metabólica e de sinalização da insulina em camundongos submetidos a diferentes períodos de dieta hiperlipídica.

### 2.3- Específicos

Avaliar os efeitos da administração da CV nos seguintes parâmetros:

Imunoematopoiéticos nos animais submetidos a 15, 30 e 45 dias de dieta hiperlipídica. Para isso avaliamos:

- Interação entre as células do estroma da medula óssea e as células progenitoras hematopoiéticas (células tronco) utilizando a cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC);
- Cultura clonal de células progenitoras hematopoiéticas comprometidas com o crescimento e diferenciação de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) nas células hematopoiéticas da medula óssea, baço e células não-aderentes presentes no sobrenadante da LTBMC;
- Níveis das citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-6 presentes no sobrenadante da LTBMC;
- Caracterização das populações celulares (imunofenotipagem) da medula óssea dos animais nos diferentes grupos;
- Morte celular nas células hematopoiéticas da medula óssea;
- Atividade estimuladora de colônias (CSA) de células hematopoiéticas do soro dos animais nos diferentes grupos.

Metabólicos e de sinalização de insulina nos animais submetidos a 90 dias de dieta hiperlipídica. Para isso avaliamos:

- Níveis séricos de glicose, leptina, insulina, ácidos graxos livres, corpos cetônicos, triglicerídeos, colesterol total e frações dos animais nos diferentes grupos;

- Fosforilação das proteínas (IR, IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal dos animais nos diferentes grupos;
- Níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, IL-33, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-1 dos animais nos diferentes grupos.

# **3- MATERIAL E MÉTODOS**



### 3- MATERIAL E MÉTODOS

**3.1- Animais:** Camundongos Balb/C obtidos no centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP pesando 18 a 22 g foram usados no estudo. Os animais foram mantidos sob condições estáveis de temperatura ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclos claro/escuro de 12 horas controlados, com livre acesso à água e alimentação (dieta hiperlipídica palatável ou dieta padrão de acordo com o grupo de estudo). Todo experimento foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade (CEEA/IB - UNICAMP) – protocolo nº 1987-1. Foram utilizados camundongos Balb/C devido a sua característica isogênica, a qual favorece os estudos do sistema imune (Hilgers *et. al*, 1985).

#### **3.2- Composição Nutricional da *Chlorella vulgaris* (CV):**

Este estudo foi realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, sob a coordenação da Dra. Sueli Regina Baggio, de acordo com os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (Zenebone e Pascuet, 2005):

3.2.1- Determinação de Umidade e Voláteis: A determinação de umidade e voláteis baseou-se na determinação indireta da água presente no alimento por gravimetria (Zenebon e Pascuet, 2005). A umidade foi calculada pela diferença da massa do alimento antes e após a secagem. A utilização de vácuo permitiu que a secagem da amostra ocorresse em temperaturas mais baixas do que quando foi feita em pressão atmosférica, minimizando a degradação de componentes lábeis da amostra. Os resultados foram expressos por g/100g de amostra.

3.2.2- Determinação de Cinzas: O método para a determinação de cinzas consistiu na incineração da amostra em mufla a  $550^{\circ}\text{C}$ , promovendo a evaporação da água e de substâncias voláteis e a oxidação da matéria orgânica (Zenebon e Pascuet, 2005). O resíduo da incineração foi denominado como cinzas ou resíduo mineral fixo e sua quantificação foi feita por gravimetria. Os resultados foram expressos por g/100g de amostra.

3.2.3- Determinação de Lipídios Totais: A determinação dos lipídios totais foi realizada por hidrólise ácida com HCl em ebulição, para a destruição de proteínas, carboidratos e outros componentes presentes nos alimentos, seguida da extração dos lipídios totais com éter de petróleo (Zenebon e Pascuet, 2005). Os teores de lipídios totais foram obtidos gravimetricamente e os resultados expressos por g/100g de amostra.

3.2.4- Determinação de Proteínas: O teor de proteína foi determinado de acordo com Zenebon e Pascuet, 2005. O método consistiu na digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento, na presença de catalisadores, transformando todo o nitrogênio presente na amostra em sulfato de amônia. Em um sistema fechado, o sulfato de amônia foi convertido em amônia gasosa após a alcalinização do meio com solução de hidróxido de sódio concentrada. A amônia foi destilada e recolhida em solução de ácido bórico contendo indicador ácido-base. O teor de nitrogênio foi calculado a partir do volume e da concentração de uma solução de ácido clorídrico padronizada, utilizada para a titulação do ácido bórico. O teor de proteína da amostra foi calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio total por um fator específico do produto (5,75). Os resultados foram expressos por g/100g de amostra.

3.2.5- Determinação de Carboidratos: Os teores de carboidratos totais foram calculados por diferença:  $100 - (\text{g}/100\text{g umidade} + \text{g}/100\text{g cinzas} + \text{g}/100\text{g proteína} + \text{g}/100\text{g lipídios totais})$ .

3.2.6- Determinação de Calorias: O valor calórico da amostra foi calculado pela soma das porcentagens de proteína e carboidratos multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) somado ao teor de lipídios totais multiplicado pelo fator 9 (Kcal/g).

**Tabela 1-** Determinação da Composição Nutricional da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz

DETERMINAÇÕES	RESULTADOS
Umidade e Voláteis (g/100g)	5,2 (0,0) *
Cinzas (g/100g)	7,0 (0,0) *
Lipídios totais (g/100g)	8,6 (0,1) *
Proteína (Nx5,75) (g/100g)	57,4 (0,5) *
Carboidratos totais (g/100g)	21,8 **
Calorias (kcal/100g)	394 ***
Ferro (mg/100g)	95 (2) *

\*Média e estimativa de desvio padrão.

\*\*Calculado por diferença:  $100 - (\text{g}/100\text{g umidade} + \text{g}/100\text{g cinzas} + \text{g}/100\text{g proteína} + \text{g}/100\text{g lipídios totais})$ .

\*\*\*O valor calórico da amostra foi calculado pela soma das porcentagens de proteína e carboidratos multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) somado ao teor de lipídios totais

3.2.7- Determinação da composição em ácidos graxos da CV: Para a análise dos ácidos graxos, uma alíquota do extrato lipídico contendo aproximadamente 400 mg de lipídios, foi seca em evaporador rotatório. A transmetilação foi realizada de acordo com o método de Hartman e Lago (1973), usando solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol como agente esterificante. A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo a gás, equipado com amostrador automático; injetor *split*, razão 75:1; coluna capilar CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm i.d., 0,20  $\mu\text{m}$  de filme); detector por ionização em chama (FID) e uma *workstation* para aquisição dos dados. Condições cromatográficas: temperatura da coluna programada, temperatura inicial 120<sup>0</sup>C/5min, elevando-se para 235<sup>0</sup>C numa escala de 5<sup>0</sup>C/min, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos; gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 1 mL/min; gás “*make-up*”, nitrogênio a 30 mL/min; temperatura do injetor, 270<sup>0</sup>C; temperatura do detector, 310<sup>0</sup>C; volume de injeção 1  $\mu\text{L}$ . A identificação dos ácidos graxos foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e padrões e co-cromatografia. A quantificação foi realizada por normalização de área e os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

**Tabela 2-** Determinação da composição em ácidos graxos da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

<b>ÁCIDOS GRAXOS (g/100g)</b>			
Saturados			1,67
Monoinsaturados			1,60
Poliinsaturados			4,09
Ômega 3			1,49
Ômega 6			2,60
Trans-isômeros totais			< 0,01
N.I.			0,88

<b>COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS</b>		<b>% de Área</b>	<b>(g/100g)****</b>
C12:0	láurico	1,8	0,15
N.I.		4,1	0,34
C13:0	tridecanóico	0,5	0,04
N.I.		0,9	0,07
C14:0	mirístico	0,3	0,02
N.I.		0,3	0,02
C15:0	pentadecanóico	0,1	0,01
N.I.		1,1	0,09
C16:0	palmítico	16,4	1,35
C16:1 ômega 7	palmitoléico	4,5	0,37
N.I.		0,2	0,02
C17:0	margárico	0,1	0,01
N.I.		0,1	0,01
C17:1	cis-10-heptadecenóico	7,3	0,60
N.I.		0,1	0,01
C18:0	esteárico	0,6	0,05
N.I.		0,7	0,06
C18:1 ômega 9	oléico	7,5	0,62
N.I.		2,8	0,23
C18:2 ômega 6	linoléico	25,2	2,07
C20:0	araquídico	0,1	0,01
C18:3 ômega 6	gama linolênico	4,1	0,34
C18:3 ômega 3	alfa linolênico	17,5	1,44
C20:2 ômega 6	11,14 eicosadienóico	2,2	0,18
C23:0	tricosanóico	0,1	0,01
C22:2 ômega 6	cis-13,16-docosadienóico	0,1	0,01
C24:0	lignocérico	0,2	0,02
C20:5 ômega 3	eicosapentaenóico (EPA)	0,5	0,04
C24:1	nervônico	0,1	0,01
N.I.		0,4	0,03
C22:5 ômega 3	cis-7,10,13,16,19		

-docosapentaenóico (DPA) 0,1 0,01

N.I. - Não Identificado

\*Média e estimativa de desvio padrão.

\*\*Calculado por diferença:  $100 - (\text{g}/100\text{g umidade} + \text{g}/100\text{g cinzas} + \text{g}/100\text{g proteína} + \text{g}/100\text{g lipídios totais})$ .

\*\*\*O valor calórico da amostra foi calculado pela soma das porcentagens de proteína e carboidratos multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) somado ao teor de lipídios totais multiplicado pelo fator 9 (Kcal/g).

\*\*\*\*Área x % lipídios/100 x F de conversão (F=0,956). Limite de detecção do método = 0,01 g/100g.

3.2.8- Determinação de vitaminas, carotenóides, fibras, minerais e aminoácidos da CV: Foi realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, sob a coordenação da Dra. Sueli Regina Baggio, de acordo com os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (Zenebone e Pascuet, 2005).

**Tabela 3-** Determinação de Vitaminas Hidrossolúveis e Lipossolúveis da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

DETERMINAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE (/100g)
Vitamina C (ácido ascórbico)	Tr < 1,00	mg
Vitamina B <sub>1</sub> (Tiamina)	ND < 0,02	mg
Vitamina B <sub>2</sub> (Riboflavina)	0,16 ± 0,01	mg
Vitamina B <sub>6</sub> (Piridoxina)	0,034 ± 0,004	mg
Vitamina E	6	UI
Vitamina A	451	UI

UI unidade internacional, Tr traços, ND não detectado. Média ± desvio padrão.

**Tabela 4-** Determinação de Fibras total, solúvel e insolúvel da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

DETERMINAÇÃO	RESULTADOS (g/100g)
Fibra total	15,31 ± 0,38
Fibra solúvel	2,61 ± 0,04
Fibra insolúvel	12,70 ± 0,34

Média ± desvio padrão.

**Tabela 5-** Determinação de carotenóides e tocoferóis da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

DETERMINAÇÃO	RESULTADOS	UNIDADE (/100g)
Carotenóides totais	4,97 ± 0,42	mg
Beta-caroteno	812 ± 16	ug
Alfa-tocoferol	5,67 ± 0,49	mg
Beta-tocoferol	ND < 0,02	mg
Gama-tocoferol	ND < 0,02	mg
Delta-tocoferol	ND < 0,02	mg

ND não detectado. Média ± desvio padrão.

**Tabela 6-** Determinação de Minerais da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

DETERMINAÇÃO	RESULTADO (mg/100g)
Arsênio	ND < 0,02
Cádmio	ND < 0,02
Cálcio	108 ± 2
Chumbo	ND < 0,02
Cobre	0,25 ± 0,03
Fósforo	1548 ± 14
Magnésio	315 ± 10
Manganês	0,0192 ± 0,0002
Mercurio	ND < 0,001
Potássio	901 ± 25
Sódio	13,9 ± 0,2
Zinco	0,86 ± 0,01

ND não detectado. Média ± desvio padrão.

**Tabela 7-** Determinação de aminoácidos totais da CV segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

AMINOÁCIDOS TOTAIS	UNIDADE (g/100g)
Ácido aspártico	6,98
Ácido glutâmico	8,75
Serina	2,60
Glicina	3,65
Histidina	1,09
Arginina	4,66
Treonina	3,53
Alanina	4,34
Prolina	2,65
Tirosina	3,14
Valina	3,69
Metionina	0,69
Cistina	0,32
Isoleucina	3,51
Leucina	5,71
Fenilalanina	3,89
Lisina	5,19
Triptofano	0,67

**3.3- Modelo de obesidade:** A dieta hiperlipídica composta por carboidrato (38,5%); proteína (15%); lipídeos (46,5%), totalizando: 5,4 kcal/g foi oferecida durante 15, 30, 45 e 90 dias.

**3.4- Divisão dos grupos:** Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com os diferentes períodos de administração de dieta hiperlipídica: - 15; - 30; - 45 e 90 dias (n = 20/grupo), e subdivididos nos subgrupos (n = 6/subgrupo): -1. controle; -2. dieta normal e tratados com CV (CV+Dieta Normal); -3. dieta hiperlipídica e sem tratamento (Dieta Hiperlipídica); -4. dieta hiperlipídica e tratados com CV (CV+Dieta Hiperlipídica).

**3.5- Preparo da alga CV Tratamento:** A alga, gentilmente cedida pelo Dr. Hasegawa (*Research Laboratories, Chlorella Industry Co. Ltd., Fukuoka, Japan*), foi diluída em água destilada (pH fisiológico) e administrada por via oral (*gavage*) a partir de 4 semanas de idade na dose de 50 mg/Kg/dia (concentração 6,25 mg/mL) em um volume total de 0,2mL por animal. O tratamento consistiu na administração de CV por 20, 35, 50 e 95 dias, sendo 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica.

**3.6- Determinação da massa corporal:** A massa corporal foi determinada pela balança de precisão, sempre no início de cada semana e ao final do experimento após anestesia dos animais.

**3.7- Cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC):** Neste sistema de cultura de longa duração as células da medula óssea com fenótipos representativos do estroma medular formam uma camada de células aderentes ao recipiente de cultivo criando condições indispensáveis para manutenção das células tronco-hematopoéticas e para a produção de progenitores e células diferenciadas da linhagem mielóide (Sponcer *et al.*, 1993). Com o objetivo de avaliar os efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre o estroma medular e sobre a diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos gerados nesse sistema, os fêmures dos animais submetidos aos referidos tratamentos (item 3.4) foram coletados assepticamente e as células hematopoéticas e estromais (aproximadamente  $10^7$  células/mL) foram removidas e transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) completo suplementado com 20 % de soro fetal eqüino (Sigma) e 1% de uma solução de hidrocortisona ( $10^{-4}$ M). Esta suspensão de células foi transferida para garrafas de cultura T25 (10 mL/garrafa, n=6), e estas foram mantidas por 4 semanas a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Uma vez por semana estas células foram alimentadas através da remoção de 50% do meio saturado e adição do mesmo volume de meio RPMI completo e suplementado. Semanalmente foi realizada a contagem em câmara hemocitométrica das células não aderentes presentes no sobrenadante das culturas. Após a quarta semana (tempo necessário para confluência das células do estroma), ao fazer a troca do meio as culturas foram repovoadas com células de medula óssea (aproximadamente  $10^7$  células/mL) de animais dos respectivos grupos (item 3.4). Este repovoamento celular é necessário para que as células hematopoéticas mais imaturas possam agora se alojar na capa de células aderentes e iniciar a hematopoese *in vitro*. A partir da quinta semana iniciaram-se os ensaios de CFU-GM. A cada sete dias, foram coletados 5 mL do meio de cultura de cada garrafa e centrifugado por 10 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi separado e congelado a -20°C para posterior dosagem das citocinas IL-6 e IL-1 $\alpha$  pelo método de ELISA. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI, contado em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripan 0,2 %. Preparamos o meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X

concentrado; 20% de SBF e 50% de ágar. A seguir, adicionamos o volume apropriado de células ( $1 \times 10^5$  células/mL) quando o meio mais ágar estava a 37°C. Ressuspendemos as células e distribuimos volumes de 2,0 mL em cada placa de Petri (35 mm), as quais já continham 100 µL de recombinante GM-CSF (0,5 ng/mL) (Sigma, Cód. G0282). Distribuimos o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixamos geleificar. Incubamos por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub> e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecção com aumento de 40X. Adicionalmente, no final do experimento (7ª semana) as células aderentes das culturas foram tripsinizadas (tripsina a 0,25%) e quantificadas em câmara hemocitométrica. As garrafas foram fotografadas na quarta e na sétima semanas da cultura.

3.7.1- Dosagem do sobrenadante de citocinas pelo método imunoenzimático (ELISA): As concentrações de IL-6 e IL-1 $\alpha$  foram dosadas no sobrenadante de LT BMC de animais pelo método ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e as especificações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos). Para dosagem das citocinas foram coletados os sobrenadantes das cavidades correspondentes da placa de cultura semanalmente a partir da 4ª semana. Nas cavidades da placa de ELISA (NUNC – “*Immuno plate Maxisorp*” – 96 wells) foram adicionados 100 µL do anticorpo monoclonal de captura. Após incubação “*overnight*” a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as cavidades lavadas com tampão de lavagem (Reagente Set B, BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos). Reações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de 200 µL de tampão diluente e incubando-se a temperatura ambiente por 1 h. Após lavagem, 100 µL dos padrões (citocina recombinante) e das amostras foram adicionadas às cavidades da placa e, após incubação, a placa foi lavada para adição de 100 µL do anticorpo monoclonal de detecção marcado em cada cavidade. Após incubação a temperatura ambiente por 1 h, a placa foi lavada e, a seguir, 100 µL de uma solução de avidina-peroxidase (1:250) adicionados às cavidades, incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem, 100 µL do substrato (tetrametilbenzidina-TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionados e a placa incubada a temperatura ambiente por um período de 30 minutos para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se 20 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N em cada cavidade. A leitura foi

realizada em leitor de ELISA a 450 nm. As concentrações de citocina presentes nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão e os resultados expressos em pg/mL.

**3.8- Avaliação dos níveis de Atividade Estimuladora Hematopoética do soro (CSA):** O sangue de animais tratados (item 3.4) com a CV foi obtido por punção venosa, sendo separado em *pools*, centrifugado para a obtenção do soro e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os níveis séricos de CSAs foram determinados pela sua atividade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos de animais normais (não tratados). A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir de curva de titulação. De acordo com Van Den Engh e Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento foi considerada como 1 unidade de CSA.

3.8.1- Cultura Clonal de precursores hematopoéticos: Após o sacrifício do animal, a pele foi limpa com álcool iodado ou 70%. Após a exposição do fêmur, a cartilagem foi removida sobre o orifício na extremidade distal e cortado o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640. As suspensões celulares foram mantidas no gelo. O número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripán 0,2%. Foi preparado o meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X concentrado, 20% de soro fetal bovino (SBF) e 50% de ágar. A seguir, foi adicionado o volume apropriado de células da medula ( $1.10^5$  células/mL) no meio mais ágar a  $37^{\circ}\text{C}$ . Foram ressuspensas as células e distribuídos volumes de 2,0mL em cada placa de Petri, as quais tinham 100 $\mu\text{L}$  do soro dos animais tratados (CSA) ou 100  $\mu\text{L}$  recombinante GM-CSF (Sigma 0,5ng/mL). O conteúdo foi distribuído por toda a superfície da placa de Petri para geleificar. A incubação foi a  $37^{\circ}\text{C}$  em presença de 5% de  $\text{CO}_2$  no ar durante sete dias. O número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X.

**3.9- Imunofenotipagem de células hematopoéticas da medula óssea:** Para a avaliação da imunofenotipagem, as células hematopoéticas foram coletadas e homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de SBF, centrifugadas por 10min a 1200rpm e contadas em câmara hemocitométrica. Um

total de  $1 \times 10^6$  células por amostra foi marcado com o anticorpo primário TER-119, B220, Gr1, CD11b, F4/80, CD19, CD90, Sca-1, cKit, CD34, CD16, Lin (B220, CD3, TER119, GR1, CD11b), IL-7R (BD Pharmingen™, EUA) conjugados aos fluorocromos. As aquisições foram realizadas em citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, CA, USA), após compensação da emissão da fluorescência dos fluorocromos para que não haja sobreposição das mesmas. Para tal finalidade, foram usados 5 tubos: 1 (células não marcadas) e mais 4 tubos com os fluorocromos marcados separadamente (FITC, PE, CY7/PE e APC) para realizar a otimização do aparelho, compensação da fluorescência e evitar background. As análises foram realizadas pelo programa WinMDI.

**3.10- Determinação da morte celular por citometria de fluxo:** Utilizou-se anexina-V e 7 amino actinomicina (7AAD) (BD Pharmingen™, EUA). As análises foram realizadas em triplicata. Após lavagem das células com PBS, as mesmas foram ressuspensas numa concentração de  $1.10^5$  células/ $\mu$ L. Adicionou-se 5  $\mu$ L de fluorocromo conjugado a Anexina-V e 5  $\mu$ L de 7AAD a 100  $\mu$ L dessa suspensão. As células foram gentilmente homogeneizadas e incubadas 15 minutos a temperatura ambiente protegidas da luz. Adicionou-se 400  $\mu$ L de tampão em cada tubo para análise por citometria de fluxo (FACsCalibur). As células viáveis são negativas para ambos os corantes, enquanto as células em estágio inicial de apoptose são positivas somente para Anexina-V, por outro lado quando positivas para Anexina-V e 7AAD apresentam estágio avançado de apoptose.

**3.11- Dosagem sérica dos níveis de glicose:** A concentração de glicose foi determinada com fitas reativas e glicosímetro (Optium Xceed – Abbot, Berkshire, Inglaterra).

**3.12- Análises bioquímicas dos níveis séricos de ácidos graxos livres, corpos cetônicos, triglicerídeos, colesterol total e frações:** Após jejum (12 h), uma amostra de sangue foi coletada da veia cava. O soro de cada animal foi separado por centrifugação (2,500g) por 15 min a 4° C e armazenado a -80 ° C para posterior análise. Os níveis séricos de ácidos graxos livres (AGLs) foram analisados utilizando NEFA-kit-U (Wako químicos, Neuss, Alemanha) com ácido oléico como padrão. A determinação de corpos cetônicos foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) com  $\beta$ -hidroxibutirato como padrão. Os triglicerídeos, colesterol total e

frações de colesterol foram analisados usando kits de ensaio colorimétrico (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil) segundo instruções do fabricante.

**3.13- Teste de tolerância glicose (GTT):** Após jejum de 12 horas a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0. Em seguida, glicose 25% (11,1 mmol/Kg de peso corporal) foi injetada via intraperitoneal (ip) nos camundongos e as amostras de sangue serão coletadas da cauda nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para determinação da glicose sérica (item 3.11). Tolerância à glicose foi avaliada pela área sob a curva análise (AUC).

**3.14- Teste de tolerância à insulina (ITT):** Após jejum de 6 horas a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0. Em seguida, a insulina (2 U/Kg de peso corporal) foi injetada ip nos camundongos e as amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da glicose sérica (item 3.11). A tolerância à insulina foi avaliada pelo *clearance* de glicose sobre os minutos iniciais do desafio de insulina.

**3.15- Dosagem sérica dos níveis de leptina:** Foram utilizados kits de ELISA (Crystal Chem. Inc., EUA) comerciais espécie-específicos para as determinações. Resumidamente para a análise de leptina (cat n° 90030), às cavidades da placa de ELISA foram adicionadas 5 µL das amostras e padrões (0,2 – 12,8 ng/mL). Após incubação *overnight* (16 a 20 horas) e lavagem (cinco vezes) das cavidades da placa, 100 µL do conjugado (anti-IgG de coelho marcada com enzima) foram acrescentados a cada cavidade. Após novo período de incubação (3 horas a 4°C) seguido de lavagem (sete vezes), foram adicionados 100 µL da solução do substrato. Após incubação por 30 minutos, no escuro, as reações foram bloqueadas com 100 µL de solução ácida e as absorbâncias lidas em leitora de ELISA a 450 nm e os resultados dados em ng/mL.

**3.16- Dosagem sérica dos níveis de insulina:** Foram utilizados kits de ELISA (Crystal Chem. Inc., EUA) comerciais espécie-específicos para as determinações. Para a análise de insulina (cat n° 90080), às cavidades da placa de ELISA foram adicionadas 5 µL das amostras e padrões. Após incubação (2 horas a 4°C) e lavagem (cinco vezes) das cavidades da placa, 100 µL do conjugado (anti-insulina marcada com enzima) foram

acrescidos a cada cavidade. Após novo período de incubação (30 minutos a temperatura ambiente) seguido de lavagem (sete vezes), foram adicionados 100 µL da solução do substrato. Após incubação por 10 a 40 minutos, no escuro, as reações foram bloqueadas com 100 µL de solução ácida e as absorbâncias lidas em leitora de ELISA a 450 nm e os resultados dados em ng/mL.

### **3.17- Expressão das proteínas totais e fosforiladas (IR $\beta$ , IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal:**

3.17.1- Eletroforese: Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliácridamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, C.A.). Metanohidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo). Insulina mista regular foi procedente da Biobrás. A membrana de nitrocelulose BA 85, 0,2µm foi proveniente de Schleider e Schuell. Os anticorpos anti-Akt, anti-p-Akt e anti-IRS-1 foram obtidos da Cell. Também foram utilizados anticorpo anti-IR-p-IR, p-IRS-1, p-IRS-1 Tyr e p-IRS-1 Ser 307 adquirido da Santa Cruz Biotechnology Inc.

As soluções a empregadas nos experimentos estão descritas abaixo.

- Tampão de extração: Continha: trisma base 100 mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, aprotimina 10 3% (0,1mg/mL). Esta solução foi mantida a 4°C. O ortovanadato, PSMF e aprotimina foram acrescidos no momento do uso.
- Tampão de Laemmli (5x): Foi utilizado para estocar o material extraído e para aplicação no gel de poliácridamida. Continha: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 20%.
- Solução tampão para eletroforese em gel (SDS-PAGE): Foi utilizada para a realização da eletroforese das proteínas extraídas no gel SDS-PAGE. A solução foi diluída 1:4. Continha: Trisma base 0,2M, glicina 1,52M, EDTA 7,18M e SDS 0,4%.

- Solução tampão para transferência: Foi utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Continha: Trisma base 25mM, glicina 129mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi ser estocada a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução ("resolving"): Foi utilizada para o preparo do SDS-PAGE, gel de resolução. Continha: EDTA 4 mM, SDS 25% e trisma base 1,5M. O pH da solução foi ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento ("stacking"): Foi utilizada no preparo do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Continha: EDTA 4 mM, SDS 2% e trisma base 10 mM. O pH foi ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução basal: Solução básica foi utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Continha: cloreto de sódio 0,12 M, trisma base 0,01 M, *Tween* 20 0,05%.
- Solução bloqueadora: Foi utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Continha: 5% de leite em pó desnatado (Molico®) e azida sódica 0,02% dissolvidas em solução basal.
- Solução para anticorpos: Solução onde foram diluídos os anticorpos específicos. Continha: 0,3% de soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02% diluídos em solução basal.

3.17.2- Extração dos tecidos: Após 8 horas de jejum, os camundongos foram anestesiados ip, com xilazina (5 a 15µg/Kg de peso corporal) e quetamina (80 a 100 µg/Kg de peso corporal) e a perda dos reflexos pedal e córneo foram utilizados como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi aberta, e 5,2 µmol no volume de 100 µL/10 g de insulina (Actrapid, Novo Nordisk) ou salina foram injetadas na veia porta. Após 30 s, o fígado foi removido, imediatamente homogeneizado em tampão específico e operado em máxima velocidade por 30 s (Polytron PTA 20 S, modelo PT 1035; Brinkmann Instruments). Aproximadamente 90 s depois da infusão de insulina ou salina, fragmentos do músculo gastrocnêmio e da gordura epididimal foram retirados e homogeneizados como

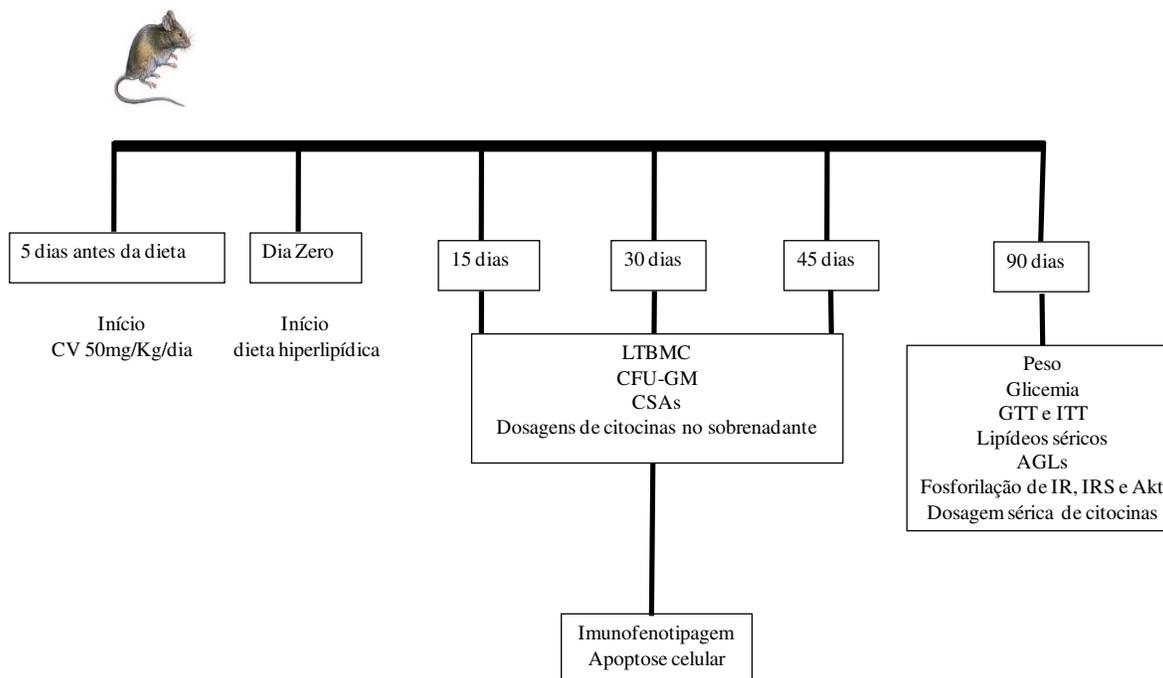
descrito acima. Em todas as amostras foi adicionado triton X-100 1% e as mesmas permaneceram no gelo por 40 minutos. O material extraído foi então centrifugado na velocidade de 11000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto e outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos. As técnicas de *immunoblotting* estão descritas a seguir.

3.17.3- *Immunoblotting* ou *Westernblotting*: Foram aplicados no SDS-PAGE de 2 mm, 200 µg de proteína por amostra, sendo o gel balizado por marcador de alto peso molecular comercial, para gel de poliacrilamida, da Bio Rad: PageRuler (Bio Rad). A eletroforese foi efetuada em cuba de minigel Mini- PROTEAN® II Cell da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi inicialmente submetido a 20 volts, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (“*stacking*”) e 100 volts até o final do gel de resolução (“*resolving*”). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad. Durante a transferência, a cuba foi mantida a 120 volts por 150 minutos. (Towbin *et al.*, 1979). Para evitar aumento excessivo da temperatura, foram efetuadas trocas sucessivas da forma de gelo durante a transferência. As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas à temperatura ambiente, e depois lavadas em solução basal por três sessões de dez minutos para subsequente incubação com anticorpo específico. Tal incubação foi feita *overnight* a 4°C por 14-16 horas, sob agitação constante e, novamente, as membranas foram lavadas com solução basal por quatro sessões de dez minutos. A seguir, utilizando-se a diluição 1:1 dos reagentes do kit comercial Pierce Western Blot Signal Enhancer (Thermo Scientific, Illinois, EUA) adicionou-se 2 mL por membrana e incubou-se 1 a 2 minutos. Após a incubação, foi montado o cassete e as membranas foram expostas em filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY), usando intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens – DuPont, Wilmington, DE). O filme foi revelado de forma convencional. Uma vez identificadas, as bandas das auto-

radiografias, a leitura foi feita por densitometria óptica (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD), quantificando suas áreas. A partir de então, foi realizada a análise dos dados, comparando o valor obtido no tecido do animal controle com o experimental, de forma que sempre haja controle dentro de um experimento.

**3.18- Dosagem sérica dos níveis de citocinas (TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, MCP-1, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-33):** As concentrações foram dosadas pelo método ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e as especificações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos). Nas cavidades da placa de ELISA (NUNC – “*Immuno plate Maxisorp*” – 96 wells) foram adicionados 100  $\mu$ L do anticorpo monoclonal de captura anti-citocina de camundongo (0,5-4  $\mu$ g/mL em tampão fosfato salina-PBS). Após incubação “*overnight*” a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as cavidades lavadas com tampão de lavagem ( Reagente Set A ou B, BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos). Reações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de 200  $\mu$ L de tampão diluente e incubando-se a temperatura ambiente por 1 h. Após lavagem, 100  $\mu$ L dos padrões (citocina recombinante) e das amostras foram adicionadas às cavidades da placa e, após incubação, a placa foi lavada para adição de 100  $\mu$ L do anticorpo monoclonal de detecção marcado em cada cavidade. Após incubação a temperatura ambiente por 1 h, a placa foi lavada e, a seguir, 100  $\mu$ L de uma solução de avidina-peroxidase (1:250) adicionados às cavidades, incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem, 100  $\mu$ L do substrato (tetrametilbenzidina-TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionados e a placa incubada a temperatura ambiente por um período de 30 minutos para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se 20  $\mu$ L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N em cada cavidade. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. As concentrações de citocina presentes nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão e os resultados expressos em pg/mL.

## Delineamento experimental



**3.19- Análise Estatística:** Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que houve diferença significativa, o Teste de Bonferroni foi utilizado para detectar diferenças existentes entre todos os grupos. Os resultados de *blots* foram apresentados como comparações diretas de bandas nas radiografias e quantificadas por densitometria óptica. Os gráficos apresentam as médias e desvios-padrão dos diferentes grupos. O nível de significância foi  $p \leq 0,05$ .



## **4- RESULTADOS**



## **4- RESULTADOS**

### **4.1- Parâmetros Imunohematopoéticos**

Para a análise dos parâmetros imunohematopoéticos foram selecionados os animais submetidos a 15, 30 e 45 dias de dieta hiperlipídica, pois a capacidade clonogênica das CTH diminui progressivamente e significativamente com o avanço da idade (Carlo-Stella *et al.*, 2005, Moresi *et al.*, 2005).

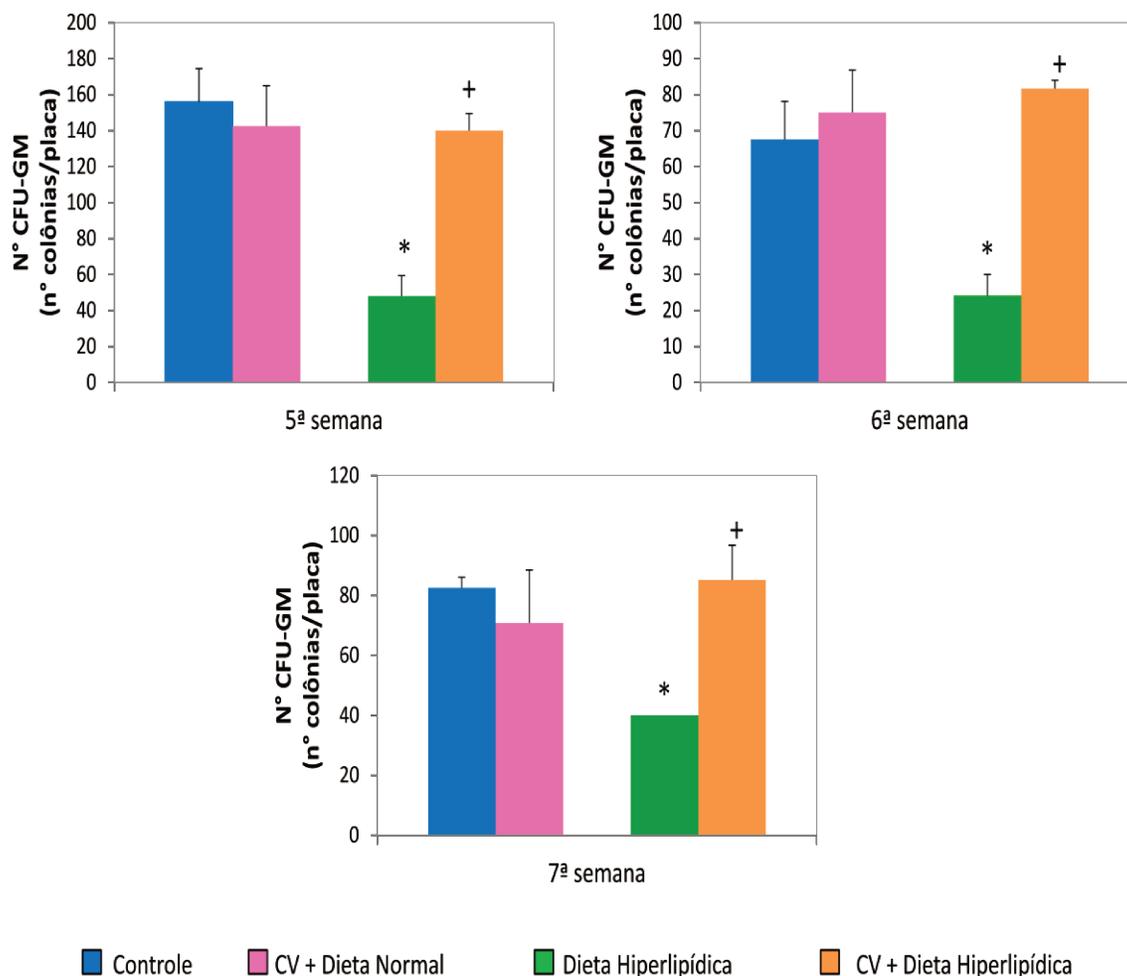
4.1.1- Cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC)

4.1.1.1- Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não-aderentes da LTBMC

Os números de CFU-GM no sobrenadante das LTBMCs (5<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup> semanas) de animais que receberam dieta normal ou hiperlipídica durante 15, 30 e 45 dias, tratados ou não com CV, estão representados nas Figuras 4 a 6.

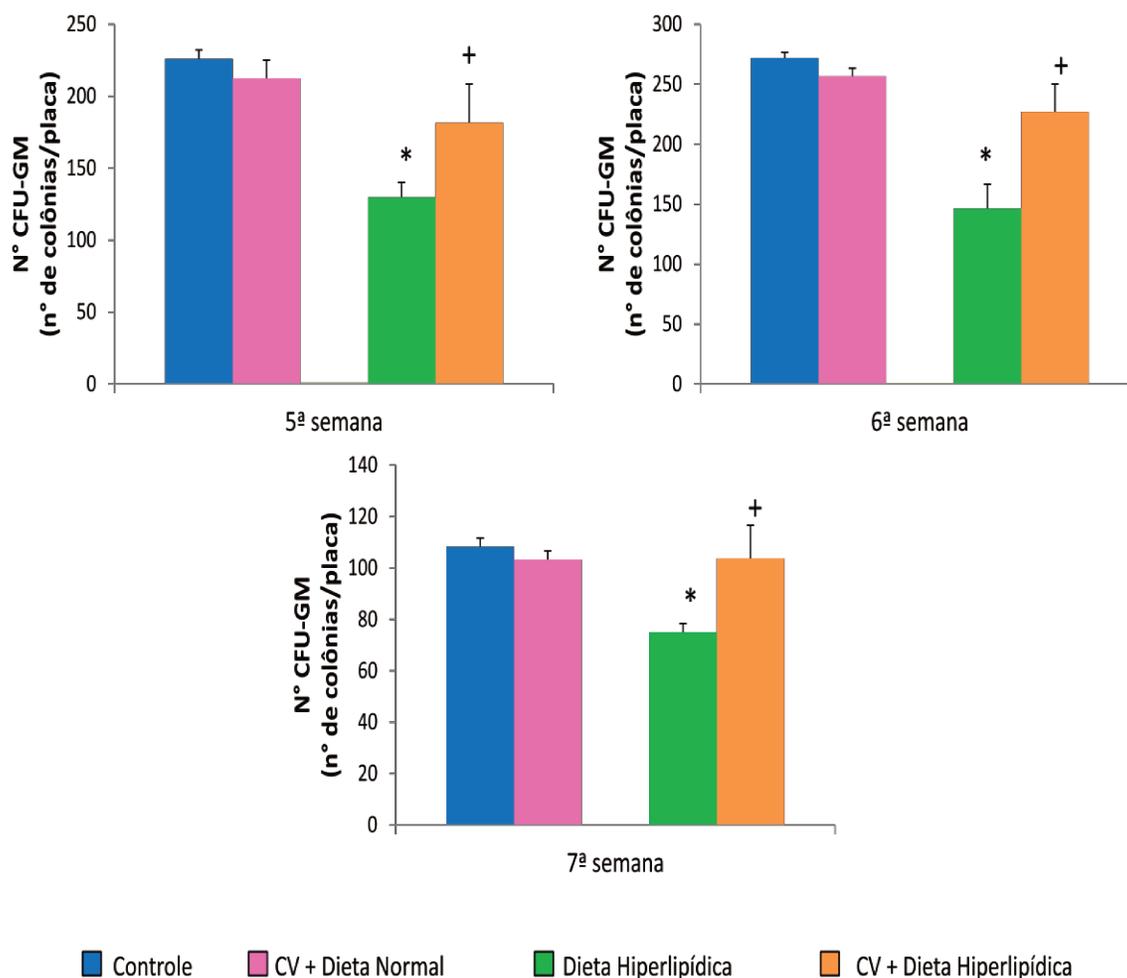
Um pico no número de CFU-GM foi observado em todos os grupos estudados na 5<sup>a</sup> semana de cultura como consequência da repopulação. Da 5<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup> semana de cultura, a administração de CV aos animais normais não promoveu alterações no número destes progenitores em todos os períodos avaliados. Por outro lado, nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica, uma redução na capacidade do estroma medular em promover o crescimento e diferenciação de CFU-GM foi observada em todas as semanas de cultura, atingindo valores de CFU-GM em média 1,8 vezes menores em relação aos controles, sendo este efeito revertido a valores próximos à normalidade pelo tratamento com CV.

## A- QUINZE DIAS



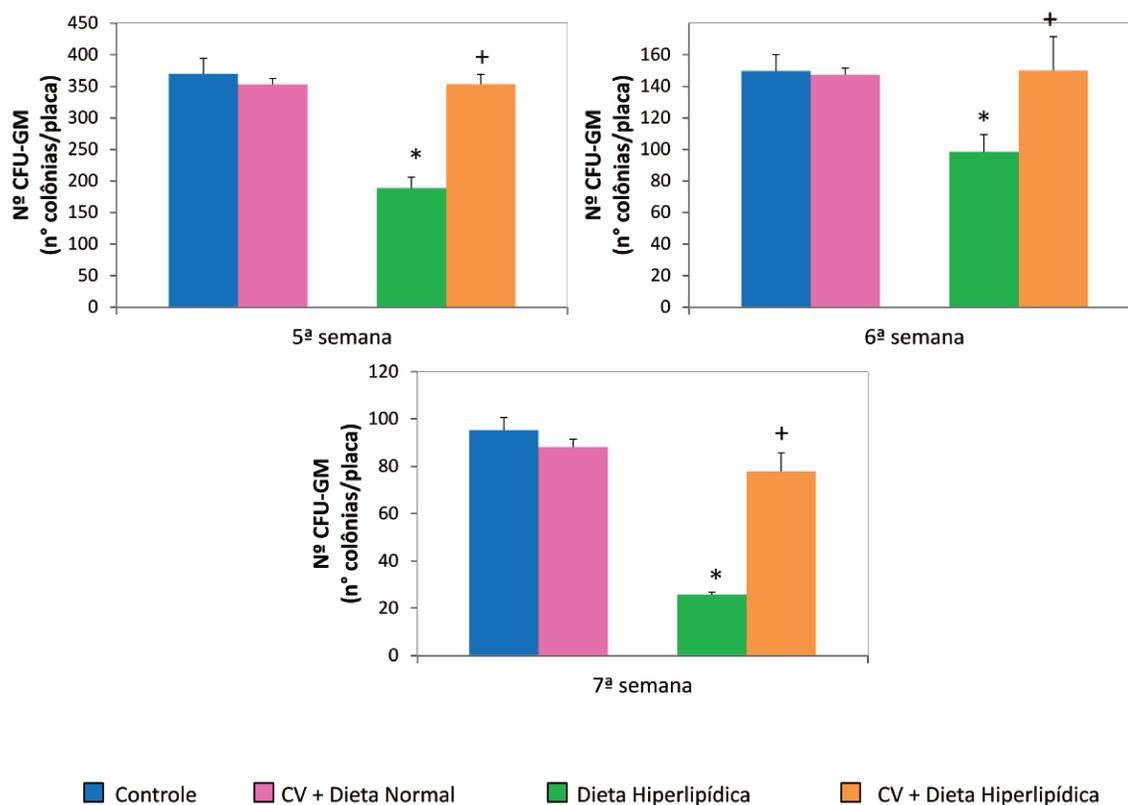
**Figura 4-** Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos coletados semanalmente no sobrenadante de culturas líquidas de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica e mantido até o 20º dia. A dieta hiperlipídica foi administrada durante 15 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 frascos de cultura. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

## B- TRINTA DIAS



**Figura 5-** Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos coletados semanalmente no sobrenadante de culturas líquidas de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica e mantido até o 35º dia. A dieta hiperlipídica foi administrada durante 30 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

## C- QUARENTA E CINCO DIAS



**Figura 6-** Crescimento e diferenciação de progenitores de granulócitos e macrófagos coletados semanalmente no sobrenadante de culturas líquidas de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica e mantido até o 50º dia. A dieta hiperlipídica foi administrada durante 45 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.1.1.2- Viabilidade de células não-aderentes e aderentes

Os efeitos do tratamento com CV no número total de células não-aderentes e aderentes das LTBM de animais que receberam dieta normal ou hiperlipídica durante 15, 30 e 45 dias, estão apresentados na Tabela 8.

Como esperado, após a repopulação (5ª semana) observamos um pico no número de células não-aderentes em todos os grupos estudados. Nas 6ª e 7ª semanas, um declínio natural progressivo no número destas células foi observado também em todos os grupos estudados. A administração de CV aos animais normais não alterou o número destas células em todas as semanas de cultura. Entretanto, nos animais que receberam a dieta hiperlipídica verificamos uma significativa redução ( $p < 0,05$ ) no número de células não-aderentes coletadas entre a 5ª a 7ª semanas. O tratamento destes animais com CV reverteu estes números atingindo valores semelhantes aos dos controles.

Em relação ao número de células aderentes, embora uma tendência à diminuição seja observada nas culturas dos animais que receberam dieta hiperlipídica, não verificamos diferenças significativas em todos os grupos estudados (Tabela 8). Portanto, este resultado sugere que o número reduzido de CFU-GM observado *in vitro* pode estar relacionado a alguma alteração na capacidade funcional do estroma em manter o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos.

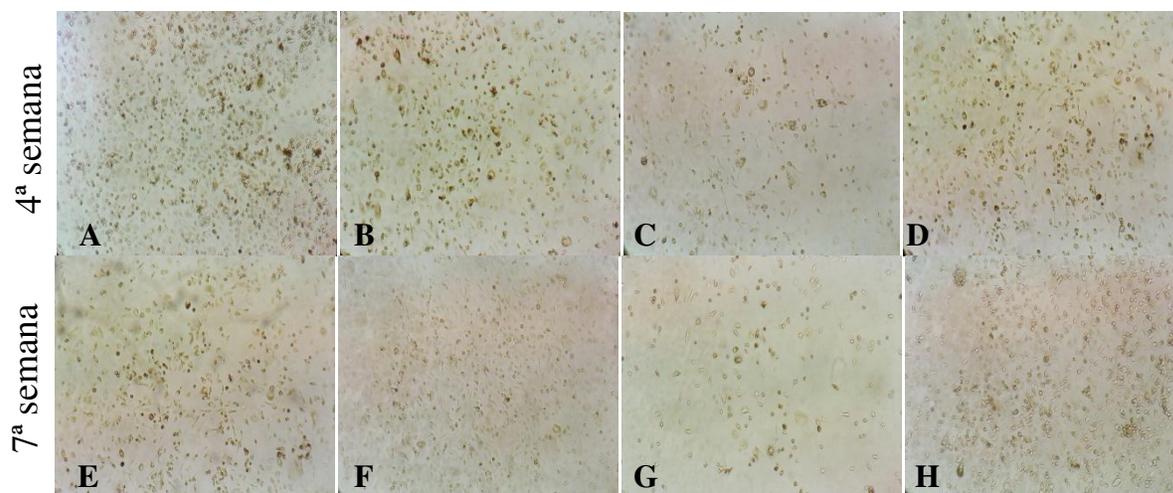
**Tabela 8-** Número de células não-aderentes e aderentes (células viáveis x 10<sup>5</sup>/mL) das culturas líquidas de longa duração de células de medula óssea (LTBMCs) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.

		CÉLULAS NÃO-ADERENTES			CÉLULAS ADERENTES
		5 <sup>a</sup> sem	6 <sup>a</sup> sem	7 <sup>a</sup> sem	7 <sup>a</sup> sem
LTBMC	C	39.10 <sup>5</sup>	15.10 <sup>5</sup>	9.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>5</sup>
15d	CV	35.10 <sup>5</sup>	12.10 <sup>5</sup>	10.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>
	DH*	24.10 <sup>5*</sup>	5.10 <sup>5*</sup>	5.10 <sup>5*</sup>	3.10 <sup>5</sup>
	CV+DH	40.10 <sup>5</sup>	11.10 <sup>5</sup>	10.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>5</sup>
LTBMC	C	23.10 <sup>5</sup>	11.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>
30d	CV	28.10 <sup>5</sup>	10.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>5</sup>
	DH*	15.10 <sup>5*</sup>	8.10 <sup>5*</sup>	3.10 <sup>5*</sup>	4.10 <sup>5</sup>
	CV+DH	20.10 <sup>5</sup>	11.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>
LTBMC	C	69.10 <sup>5</sup>	16.10 <sup>5</sup>	11.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>
45d	CV	65.10 <sup>5</sup>	20.10 <sup>5</sup>	10.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>5</sup>
	DH*	43.10 <sup>5*</sup>	19.10 <sup>5*</sup>	4.10 <sup>5*</sup>	2.10 <sup>5</sup>
	CV+DH	60.10 <sup>5</sup>	50.10 <sup>5</sup>	8.10 <sup>5</sup>	3.10 <sup>5</sup>

Legenda: C: controle, CV: *Chlorella vulgaris* e dieta normal, DH dieta hiperlipídica, CV + DH: *Chlorella vulgaris* e dieta hiperlipídica.. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 15 dias, 30 dias e 45 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os valores representam a média de 6 animais por grupo. \*p<0,05 comparado ao controle. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.1.1.3- Formação de estroma medular em LT BMC

A Figura 7 demonstra o aspecto morfológico das LT BMC de animais que receberam dieta normal ou hiperlipídica na 4<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semanas de cultura. A análise microscópica das culturas dos grupos controles mostrou estromas densos e confluentes após 4 semanas de incubação (Figura 11 A-B, E-F). Por outro lado, o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica apresentou estroma medular menos denso e pouco confluyente (Figura 11 C e G), quando foi administrado CV a este grupo os estromas mantiveram-se densos e confluentes (Figura 11 D e H).



**Figura 7-** Aspecto microscópico da LT BMC de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. A (grupo Controle), B (grupo CV + Dieta Normal), C (grupo Dieta Hiperlipídica) e D (grupo CV + Dieta Hiperlipídica) na 4<sup>a</sup> semana de cultura. E (grupo Controle), F (grupo CV + Dieta Normal), G (grupo Dieta Hiperlipídica) e H (grupo CV + Dieta Hiperlipídica) na 7<sup>a</sup> semana de cultura. Aumento de 20x.

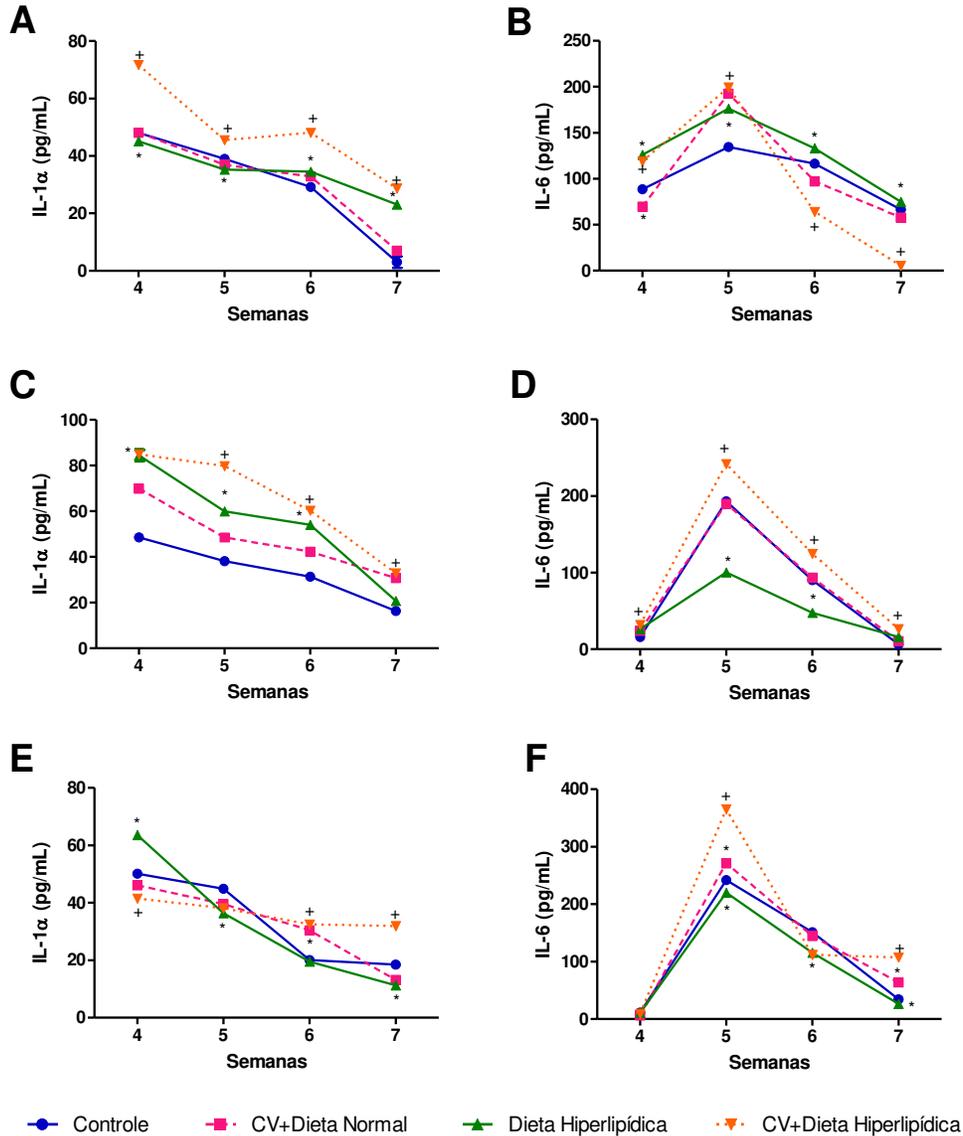
#### 4.1.1.4- Produção de citocinas (IL-1 $\alpha$ e IL-6) no sobrenadante de LT BMC

Os efeitos do tratamento com CV nos níveis de citocinas (IL-1 $\alpha$  e IL-6) no sobrenadante das LT BMC de animais que receberam dieta normal ou hiperlipídica durante 15, 30 e 45 dias, estão apresentados na Figura 8. A administração da CV e dieta hiperlipídica produziram alterações significativas nos níveis de IL-1 $\alpha$  e IL-6.

Desde a 4<sup>a</sup> semana de cultura, observamos um declínio gradativo nos níveis de IL-1 $\alpha$  em todos os grupos avaliados. Os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram diminuição significativa na síntese dessa citocina quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a administração de CV a esses animais preveniu tal redução (Figura 8 A, C, E).

Como esperado, na 5<sup>a</sup> semana de cultura observamos um aumento ( $p < 0,05$ ) nos níveis de IL-6, seguido de decréscimo gradual em todos os grupos estudados. A dieta hiperlipídica levou a uma redução significativa na síntese dessa citocina em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a administração de CV a esses animais preveniu tal redução (Figura 8 B, D, F).

Tais achados confirmam os resultados observados nos números de CFU-GM obtidos da suspensão de células não-aderentes da LT BMC. Portanto, a CV foi capaz de manter o balanço dos estímulos positivos e negativos que controlam a mielopoiese.



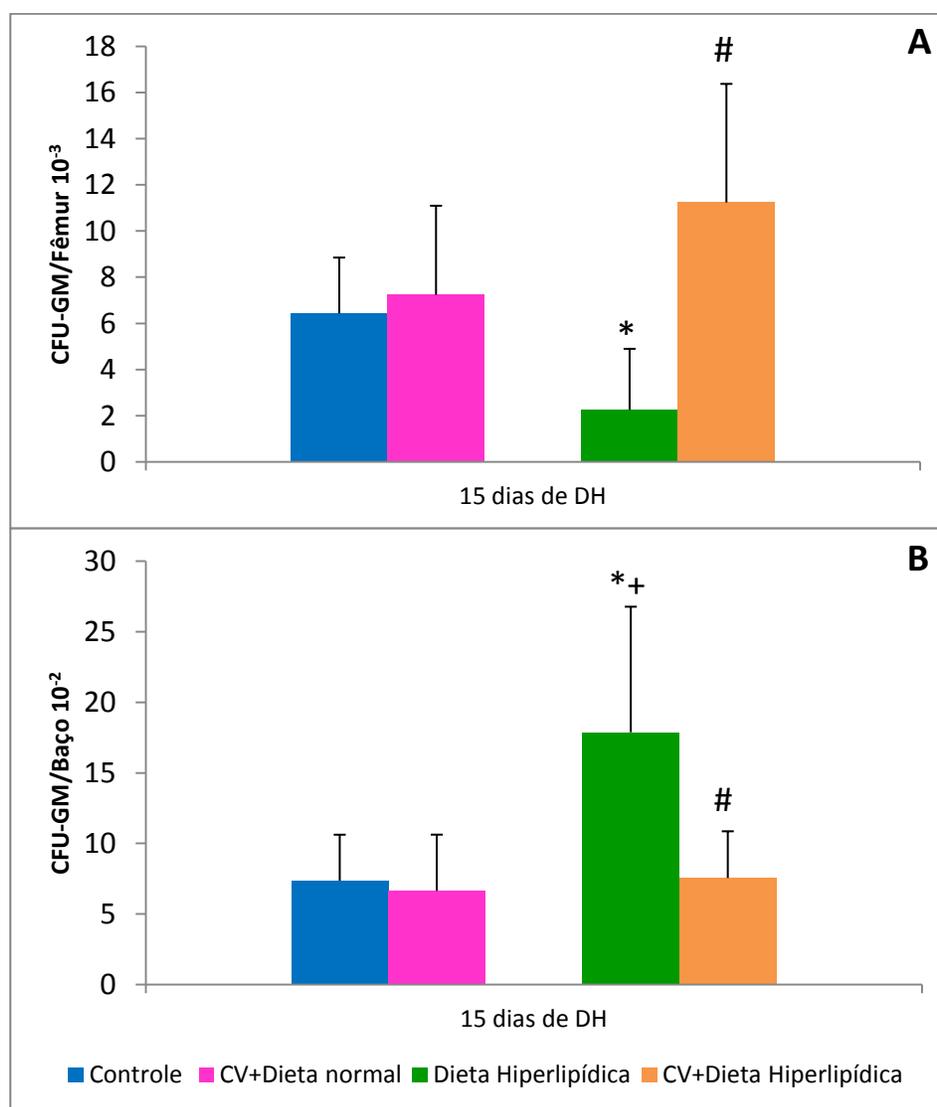
**Figura 8-** Níveis de interleucina (IL)-1 $\alpha$  e IL-6 no sobrenadante das culturas líquidas de longa duração de células de medula óssea (LTBMC) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 15 dias (A-B), 30 dias (C-D) e 45 dias (E-F). Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os valores representam a média de 6 frascos de cultura. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.1.2- Cultura Clonal de precursores hematopoéticos

Os efeitos da administração da CV sobre o número de CFU-GM da medula óssea e baço de camundongos submetidos a dieta normal ou hiperlipídica estão representados nas figuras 9 a 11, de acordo com os diferentes períodos de administração de dieta hiperlipídica (15, 30 e 45 dias).

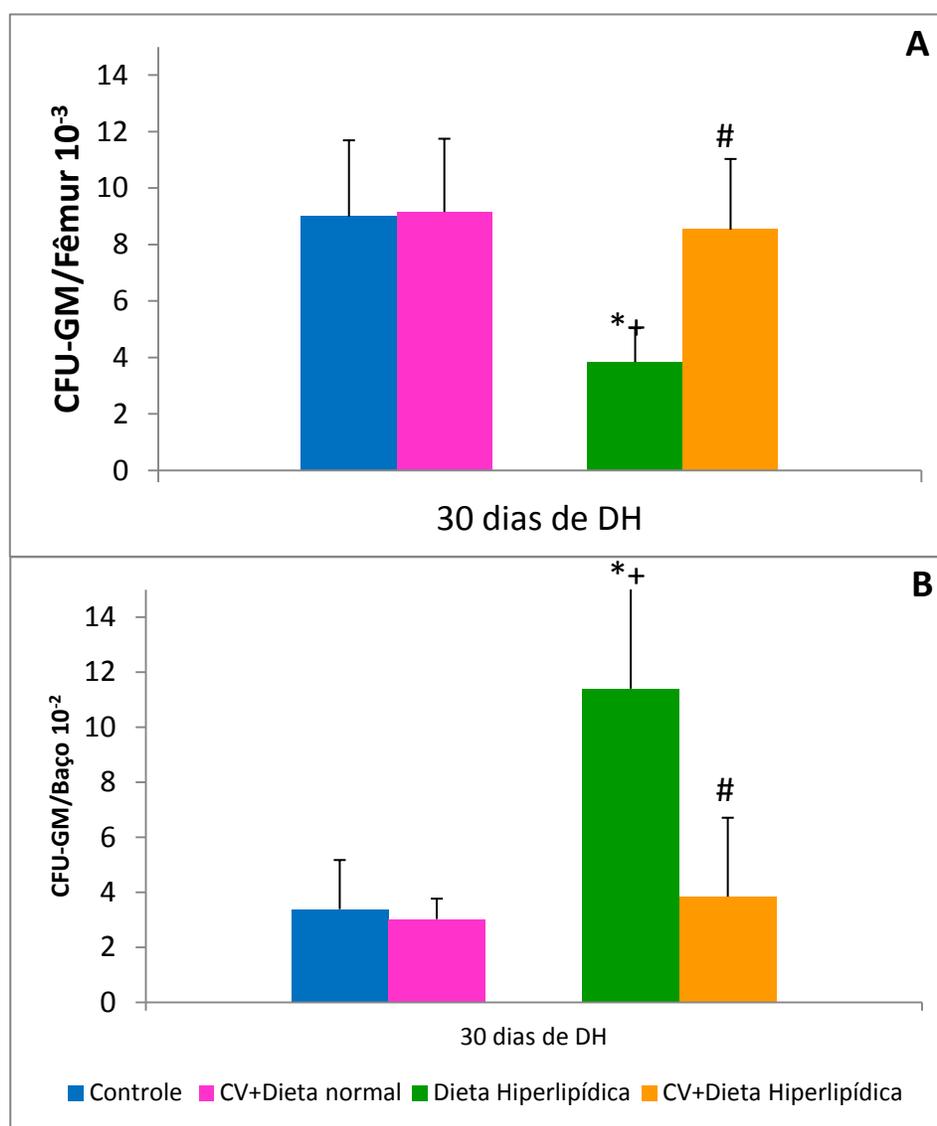
Em todos os períodos avaliados, os animais normais tratados com CV não apresentaram diferença significativa nos valores de CFU-GM da medula óssea e do baço em relação aos não-tratados. A administração da dieta hiperlipídica promoveu, nos diferentes períodos, uma redução significativa no número de CFU-GM da medula óssea com subsequente aumento no número de CFU-GM no baço. O tratamento com CV restaurou a resposta hematopoética medular e extramedular nestes animais, sendo que este efeito já foi observado desde o início do tratamento, na avaliação de 15 dias, e se manteve durante todo o período do estudo.

#### 4.1.2.1- QUINZE DIAS



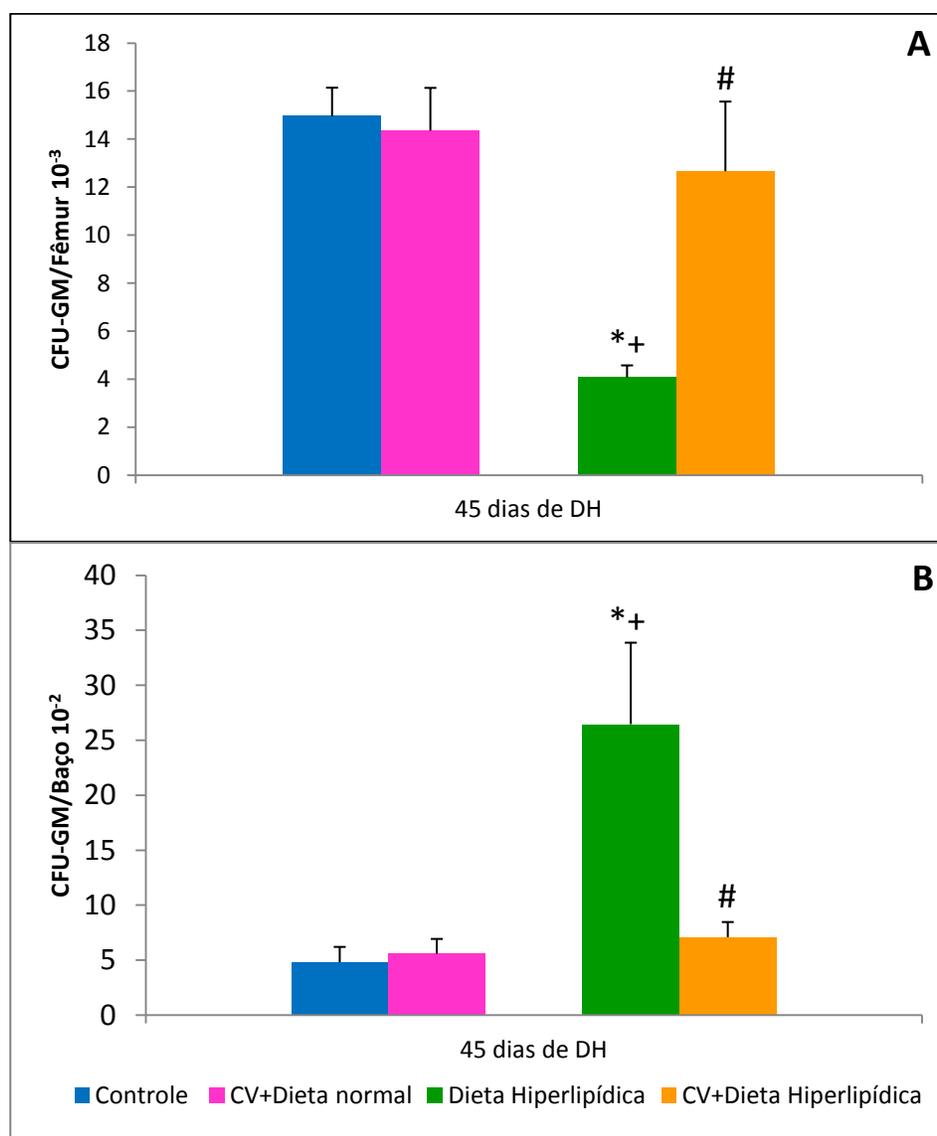
**Figura 9-** Número de progenitores granulócito-macrofágos (CFU-GM) da medula óssea (A) e do baço (B) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica (DH) e mantido até o 20<sup>o</sup> dia. A DH foi administrada durante 15 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. +  $p < 0,05$  comparando grupos CV e dieta hiperlipídica. #  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.1.2.2- TRINTA DIAS



**Figura 10-** Número de progenitores granulócito-macrofágos (CFU-GM) da medula óssea (A) e do baço (B) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica (DH) e mantido até o 35º dia. A DH foi administrada durante 30 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. +  $p < 0,05$  comparando grupos CV e dieta hiperlipídica. #  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

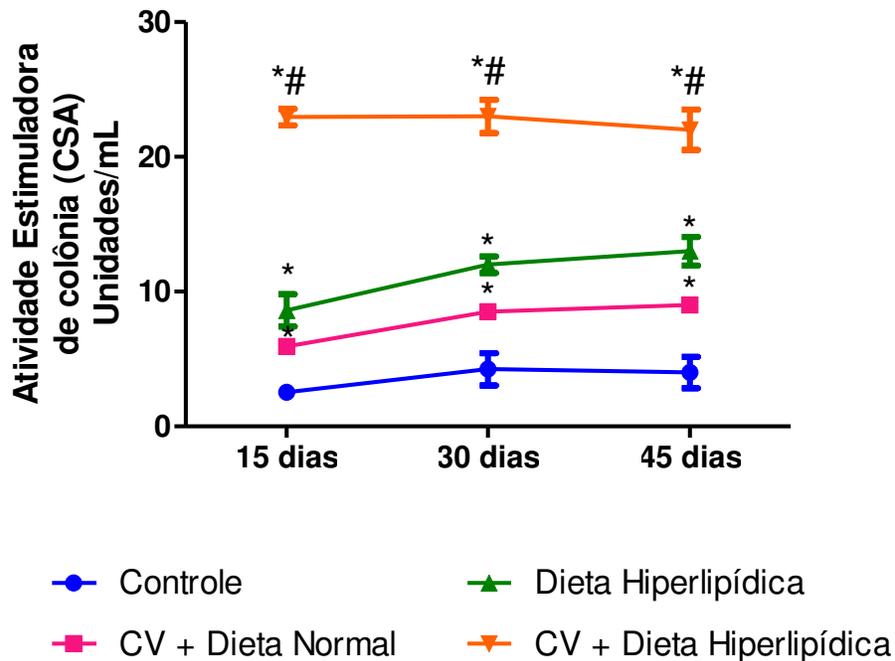
#### 4.1.2.3- QUARENTA E CINCO DIAS



**Figura 11-** Número de progenitores granulócito-macrofágos (CFU-GM) da medula óssea (A) e do baço (B) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica (DH) e mantido até o 50º dia. A DH foi administrada durante 45 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média ± DP de 6 animais/grupo. \* p < 0,05 em relação ao grupo controle. + p < 0,05 comparando grupos CV e dieta hiperlipídica. # p < 0,05 comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.1.3-Avaliação da atividade estimuladora de colônias do soro (CSA)

A presença de CSA no soro dos animais normais e tratados com dieta hiperlipídica, que receberam ou não CV, está demonstrada na Figura 12. Nos três grupos avaliados, as alterações observadas nos níveis de CSA foram mantidas constantes durante o estudo. A administração de CV aumentou em duas vezes esta atividade no animal normal. Importante observar que este efeito da alga ocorreu na ausência de hematopoese extramedular, da mesma forma que ocorre no animal normal não-tratado. A administração da dieta hiperlipídica aumentou os níveis de CSA ( $p < 0,05$ ) para valores 2,5 vezes maiores do que o controle não-tratado. O tratamento com CV dos animais que receberam a dieta hiperlipídica produziu um aumento de duas vezes adicionais ( $p < 0,05$ ) nos níveis de CSA em todos os períodos estudados.



**Figura 12-** Atividade estimuladora de colônias (CSA) nas amostras de soro (*pool*) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica e não tratados ou tratados por 5 dias prévios com 50mg/Kg/dia de CV. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 15, 30 e 45 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os valores representam a média de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao controle; # $p < 0,05$  comparando os grupos Dieta Hiperlipídica e CV/Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*).

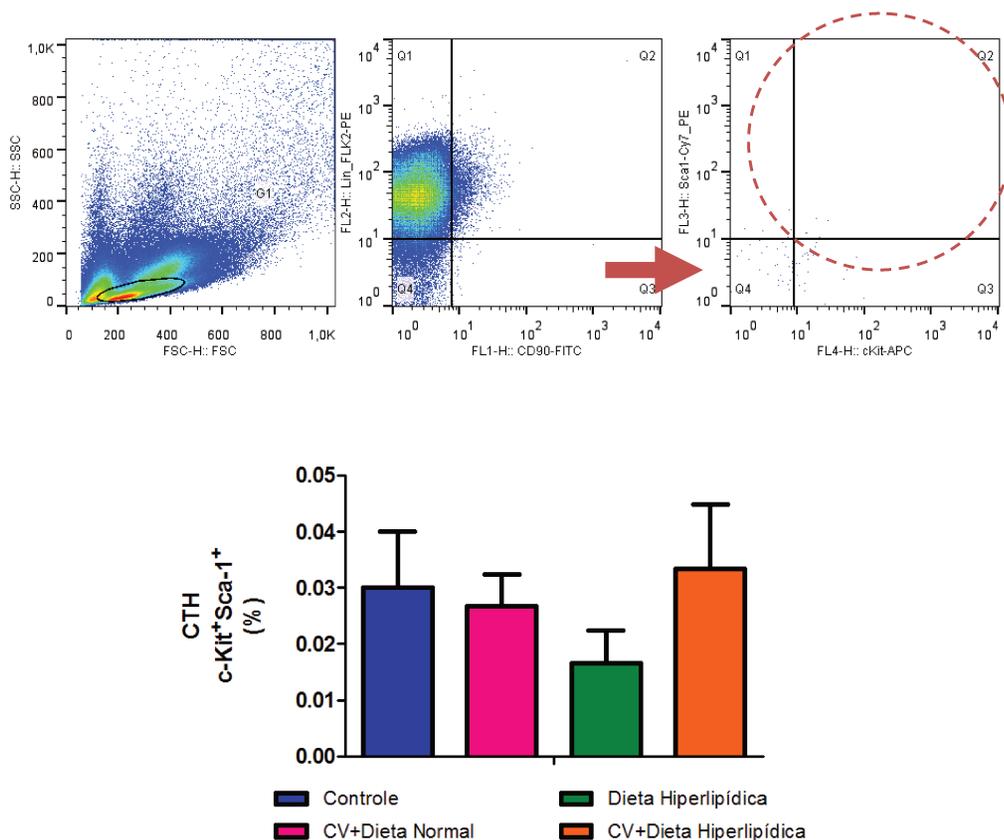
Baseado nos resultados obtidos na cultura clonal de precursores hematopoéticos (item 4.1.2) e na LT BMC (item 4.1.1) foi selecionado o grupo de 30 dias de dieta hiperlipídica para avaliação da número de CTH, progenitores, linhagens de células maduras e morte celular na medula óssea de animais que receberam dieta normal ou hiperlipídica.

#### 4.1.4- Imunofenotipagem de células hematopoéticas da medula óssea

4.1.4.1- Células progenitoras hematopoéticas primitivas (CTH) da medula óssea

Os efeitos da administração da CV sobre o número de CTH da medula óssea de camundongos que receberam dieta normal ou hiperlipídica estão representados na Figura 13.

Todos os grupos estudados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e/ou tratamentos. Portanto, a administração da CV, independente do tipo de dieta (normal ou hiperlipídica), não influenciou o número de CTH na medula óssea.

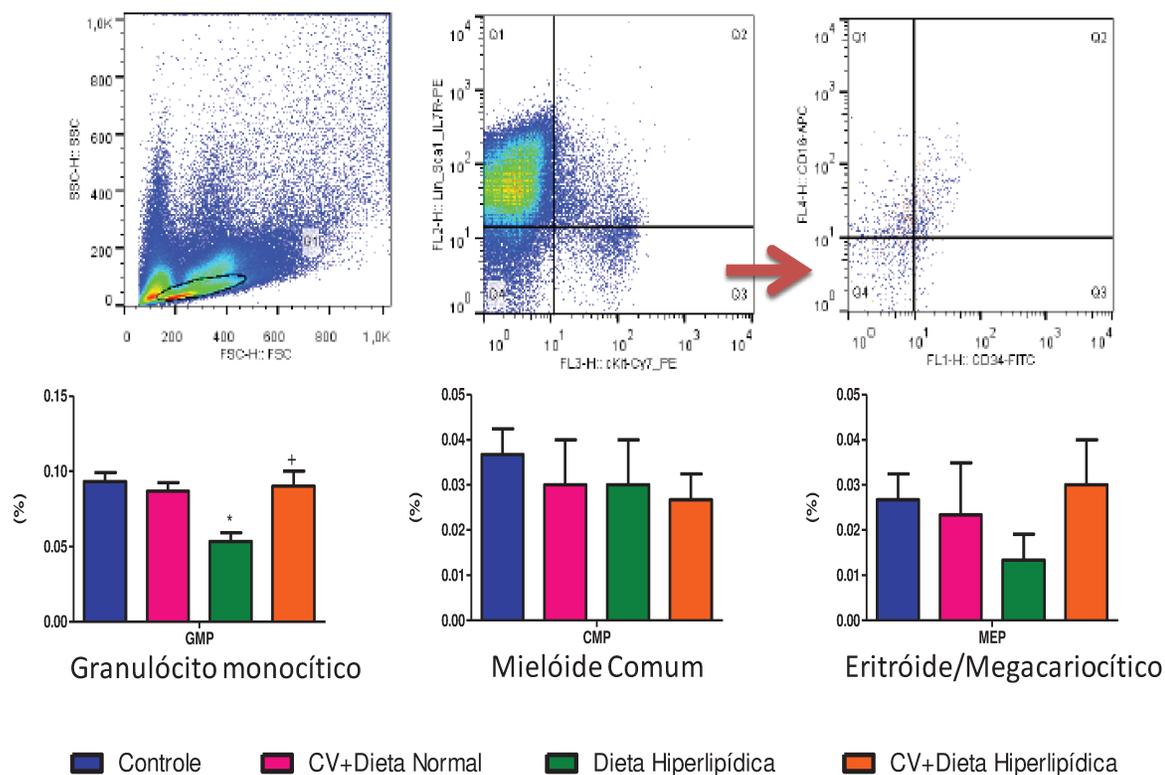


**Figura 13-** Porcentagem de células progenitoras hematopoéticas primitivas (CTH) da medula óssea coletada de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 30 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos. ANOVA; Teste de Bonferroni. Fenótipo: CD90<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>

#### 4.1.4.2- Células progenitoras hematopoéticas: granulócito-monocítico (GMP), mielóide comum (CMP) e eritróide/megacariocítico (MEP) da medula óssea

Os efeitos da administração da CV sobre o número de células progenitoras hematopoéticas (GMP, CMP, MEP) da medula óssea de camundongos que receberam dieta normal ou hiperlipídica estão representados na Figura 14.

A administração de CV aos animais em dieta normal não apresentaram diferença significativa no número dos diferentes progenitores (GMP, CMP, MEP) da medula óssea em relação aos controles. A dieta hiperlipídica promoveu uma redução significativa somente no número de GMP da medula óssea em relação ao controle. A CV foi capaz de restaurar o número desses progenitores nestes animais.

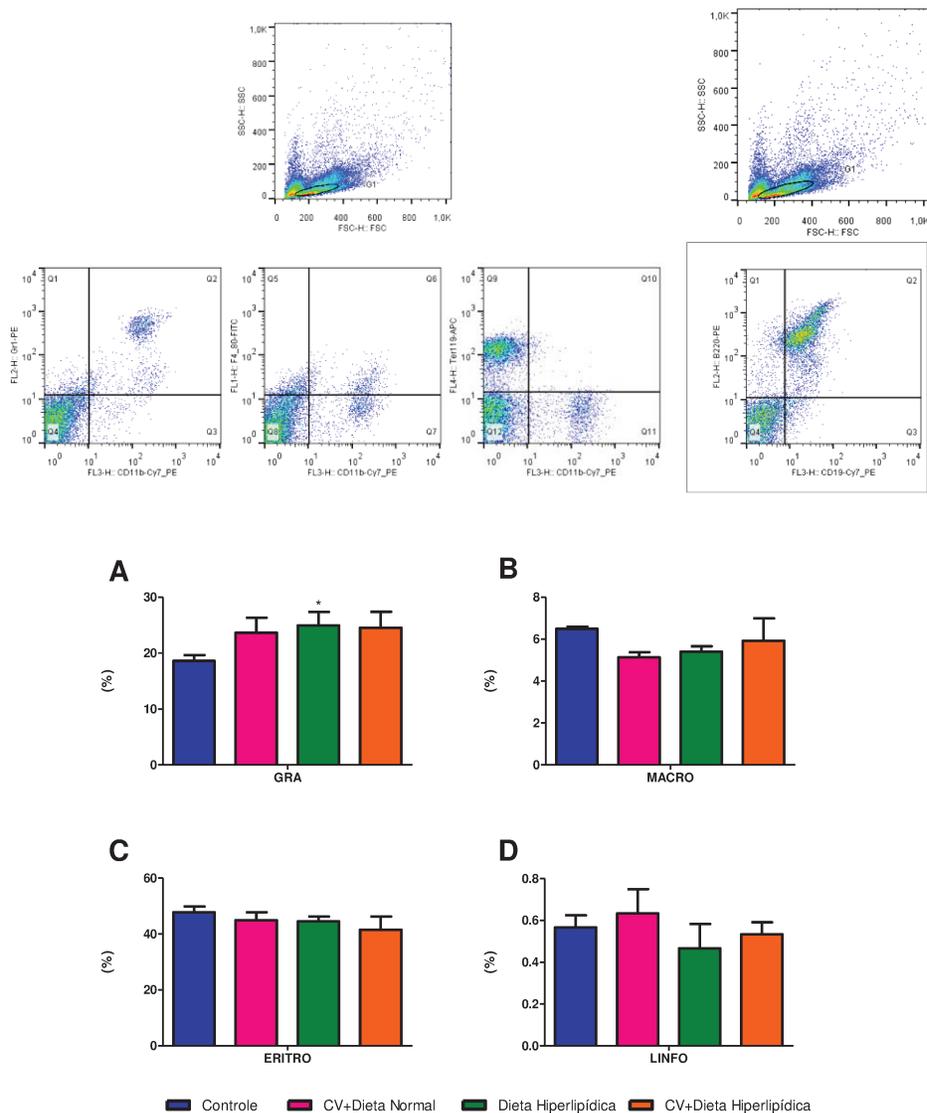


**Figura 14-** Porcentagem de progenitores: granulócito-monocítico (GMP), mielóide comum (CMP) e eritróide/megacariocítico (MEP) da medula óssea coletada de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 30 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CV+Dieta Normal. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. Fenótipos: GMP (Lin<sup>-</sup>IL7R<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD16<sup>high</sup>); CMP (Lin<sup>-</sup>IL7R<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup>); MEP (Lin<sup>-</sup>IL7R<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD16<sup>low</sup>).

4.1.4.3- Células hematopoéticas maduras: granulócitos (GRA), macrófagos (MACRO), eritrócitos (ERITRO) e linfócitos (LINFO) da medula óssea

Os efeitos da administração da CV sobre o número de células hematopoéticas maduras (GRA, MACRO, ERITRO, LINFO) da medula óssea de camundongos que receberam dieta normal ou hiperlipídica estão representados na Figura 15.

Os animais em dieta normal, mesmo recebendo CV, não apresentaram diferença significativa no número dos diferentes tipos celulares (GRA, MACRO, ERITRO, LINFO) da medula óssea. A dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo somente no número de GRA da medula óssea em relação ao controle. A CV foi capaz de restaurar o número dessas células nestes animais.



**Figura 15-** Porcentagem de granulócitos (GRA), macrófagos (MACRO), eritrócitos (ERITRO) e linfócitos (LINFO) da medula óssea coletada de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. Os animais foram tratados com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) durante 5 dias antes do início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 30 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. ANOVA; Teste de Bonferroni. Fenótipos: GRA ( $Gr1^+CD11b^+$ ); MACRO ( $F4/80^+CD11b^+$ ); ERITRO ( $TER119^+CD11b^-$ ); LINFO ( $CD3^+B220^+$ ). Valores absolutos apresentaram estatística semelhante.

#### 4.1.5- Determinação da morte celular em células hematopoéticas da medula óssea

Como esperado, todos os grupos estudados apresentaram valores dentro do limite fisiológico de apoptose (máximo 10%). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e/ou tratamentos (Tabela 9). A administração de CV tanto dos animais em dieta normal como daqueles que receberam a dieta hiperlipídica apresentou, embora não significativa, uma tendência a porcentagem menores de apoptose. Importante observar que este efeito da alga nos camundongos em dieta normal não alterou a hematopoese medular, sugerindo uma capacidade imunomoduladora da CV.

**Tabela 9**– Média e desvio padrão da porcentagem de morte e viabilidade celular na medula óssea de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica (n=6) utilizando anexina V e 7 AAD.

	Controle	CV+Dieta Normal	Dieta Hiperlipídica	CV+Dieta Hiperlipídica
Apoptose Inicial (%)	2,30 ± 1,41	1,07 ± 0,35	2,53 ± 1,79	1,27 ± 1,27
Apoptose Avançada (%)	1,47 ± 0,53	0,80 ± 0,44	0,97 ± 0,67	0,37 ± 0,38
Células Inviáveis (%)	4,97 ± 4,32	8,10 ± 2,43	10,13 ± 1,88*	9,63 ± 3,42
Células Viáveis (%)	90,77 ± 2,74	90,83 ± 2,76	87,33 ± 1,29	89,10 ± 4,69

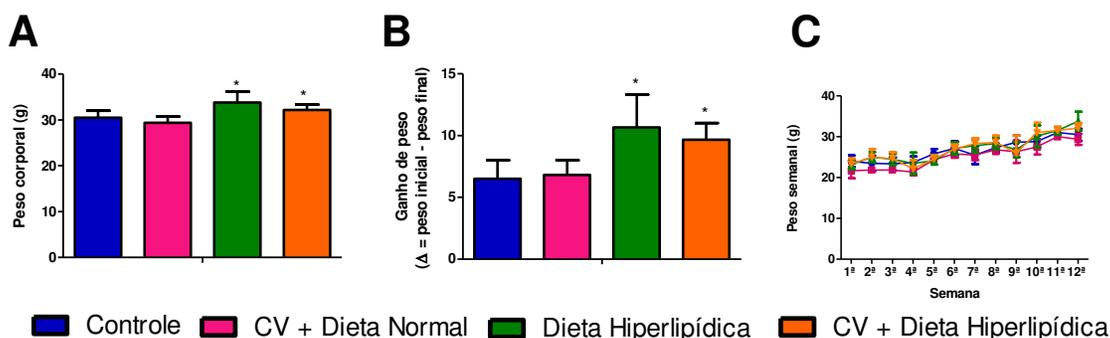
Legenda: O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 30 e 90 dias. Os resultados representam a média ± DP e representam o número de 6 animais/grupo. Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos e/ou tratamento.\* p < 0,05 em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*).

## 4.2- Parâmetros metabólicos e via de sinalização de insulina

Baseado no ganho de peso e período para desenvolvimento de resistência à insulina, os animais submetidos a 90 dias de dieta hiperlipídica foram selecionados para a análise dos parâmetros metabólicos e via de sinalização de insulina.

### 4.2.1- Determinação da massa corporal

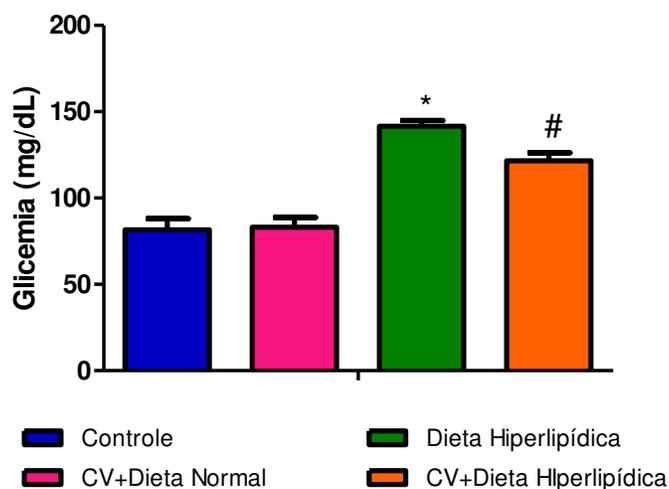
Quanto ao peso dos animais, todos os grupos sofreram ganho natural de massa de corporal, decorrente da duração do experimento (Figura 16). Os animais que receberam dieta hiperlipídica durante 90 dias, mesmo recebendo o tratamento com CV, apresentaram pesos significativamente aumentados quando comparados aos controles tratados e não tratados com CV ( $p < 0,05$ ). Estes resultados demonstram que, no presente contexto, o tratamento com CV não conseguiu prevenir o aumento de peso produzido pela dieta.



**Figura 16-** Peso (A), ganho de peso (B) e peso semanal (C) dos camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. O peso reflete o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. ANOVA; Teste de Bonferroni (CV *Chlorella vulgaris*).

#### 4.2.2- Dosagem sérica dos níveis da glicose

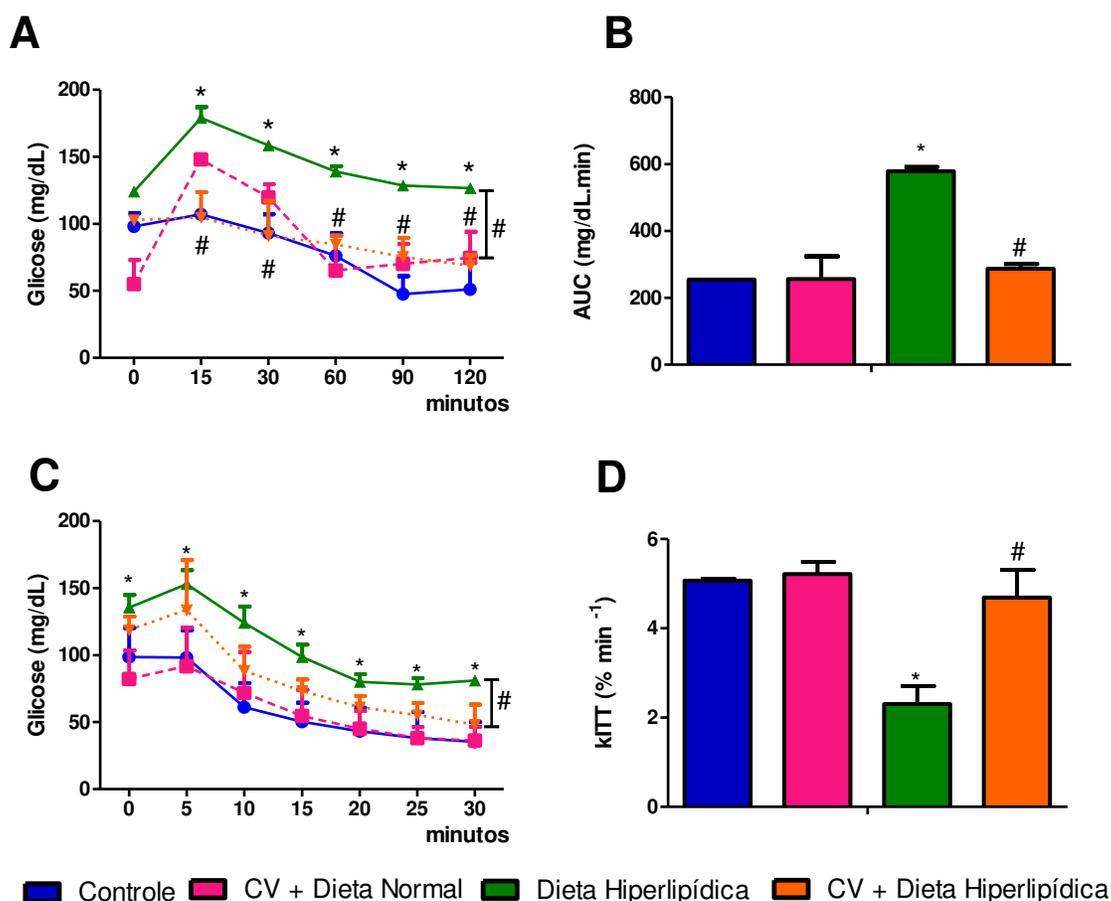
A média e desvio padrão (DP) da glicemia estão apresentados na Figura 17. A administração da dieta hiperlipídica por 90 dias levou a um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na glicemia, comparado aos animais em dieta normal tratados ou não com CV. Por outro lado, os camundongos tratados com CV e que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram uma diminuição parcial, mas significativa, nos valores de glicemia ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17-** Glicemia (mg/dL) dos camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. A glicemia reflete o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. O grupo controle recebeu somente veículo (água). \*  $p < 0,05$  glicemia em relação ao controle. #  $p < 0,05$  comparando grupos Dieta Hiperlipídica e CV/Dieta Hiperlipídica. ANOVA/Bonferroni.

#### 4.2.3- Testes de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT)

Os animais que receberam dieta hiperlipídica e foram tratados com CV apresentaram valores significativamente ( $p < 0,05$ ) menores de glicemia nos dois testes realizados, GTT e ITT (Figura 18). Tais resultados sugerem que a administração da alga aumenta a sensibilidade à insulina nestes animais.

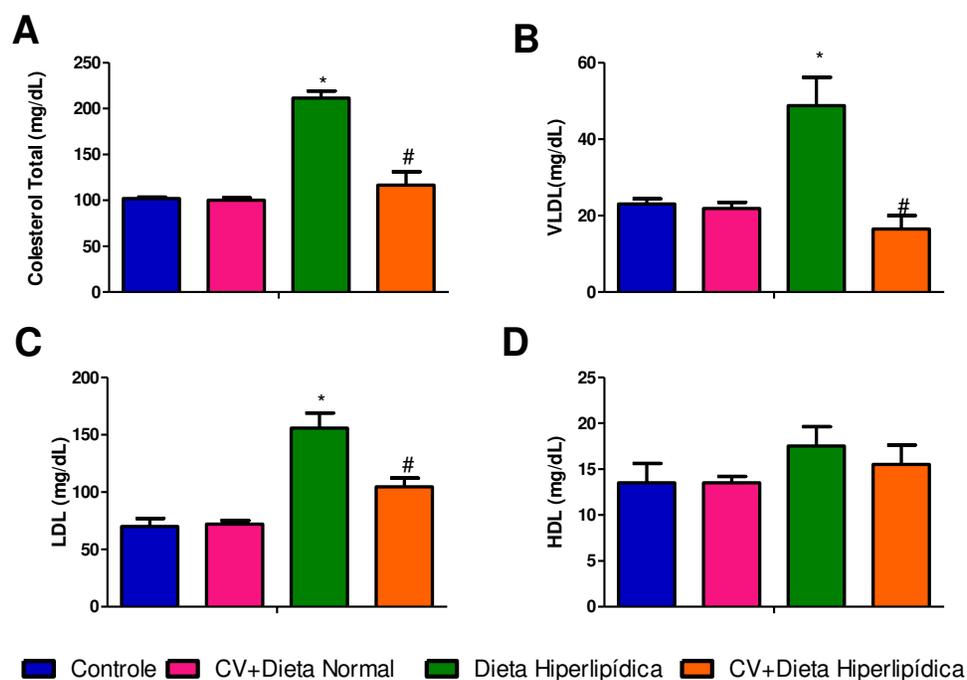


**Figura 18-** Alterações na glicemia através dos Testes de Tolerância à Glicose (GTT – A e AUC - B) e de Tolerância à insulina (ITT – C e kITT - D) em camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de *Chlorella vulgaris* (CV) ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. O grupo controle recebeu somente veículo (água). #  $p < 0,05$  glicemia comparada entre o grupo Dieta Hiperlipídica e CV+Dieta Hiperlipídica. ANOVA/Bonferroni.

#### 4.2.4- Dosagem sérica dos níveis de colesterol total e frações

As dosagens séricas dos níveis de colesterol total e suas frações de animais que receberam dieta normal ou hiperlipídica durante 90 dias, tratados ou não com CV, estão representados na Figura 19 (A-D).

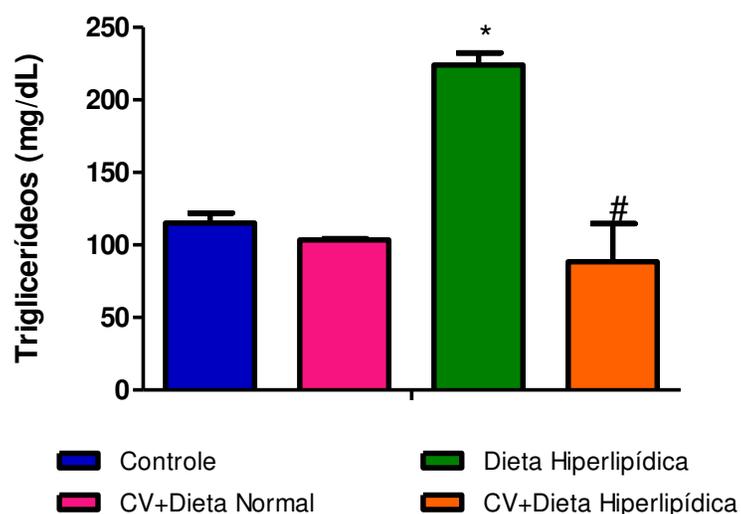
Os animais em dieta normal, mesmo quando tratados com CV, mantiveram os níveis de colesterol e suas frações dentro dos limites de normalidade. Por outro lado, a administração da dieta hiperlipídica promoveu aumento em média de 2 vezes dos níveis de colesterol total e suas frações, exceto HDL, quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o tratamento com CV foi capaz de normalizar esses níveis.



**Figura 19-** Níveis séricos de colesterol total (A) e frações (B-D) (mg/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. #  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*).

#### 4.2.5- Dosagem sérica dos níveis de triglicerídeos

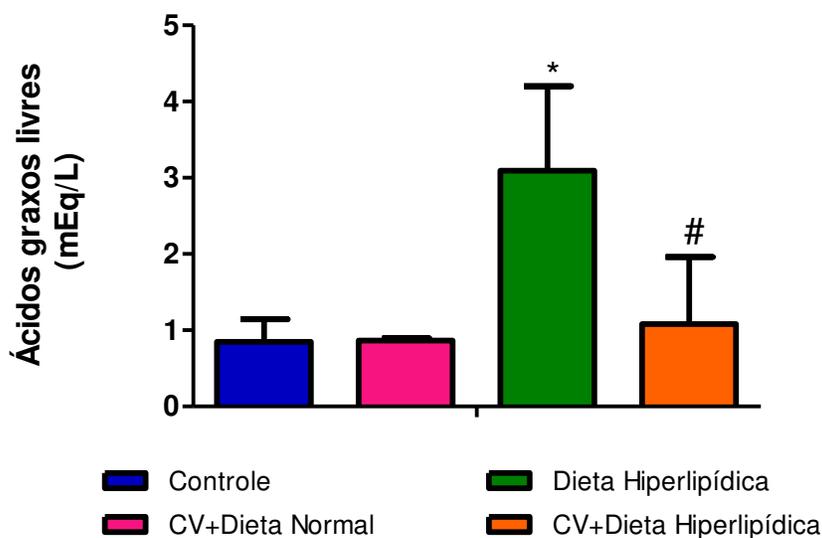
A média e desvio padrão (DP) dos níveis séricos de triglicerídeos estão apresentados na Figura 20. Os animais em dieta normal, mesmo quando tratados com CV, mantiveram os níveis de triglicerídeos dentro dos limites de normalidade. A administração da dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), em média 2 vezes, nos valores de triglicerídeos em relação aos controles, sendo que o tratamento com CV foi capaz de normalizar esses resultados.



**Figura 20-** Níveis séricos de triglicerídeos (mg/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. #  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*).

#### 4.1.6- Dosagem sérica dos níveis de ácidos graxos livres

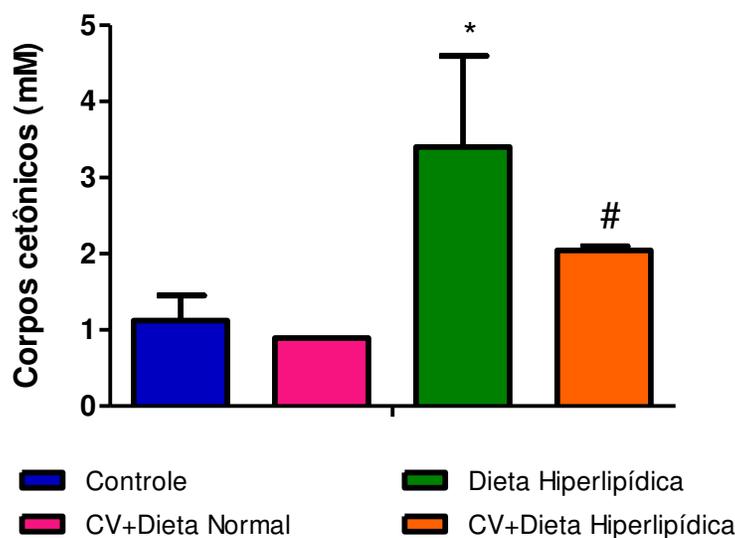
A média e desvio padrão (DP) dos níveis séricos de AGLs estão apresentados na Figura 21. Os animais em dieta normal, mesmo quando tratados com CV, mantiveram os níveis de AGLs dentro dos limites de normalidade. A administração da dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), em média 4 vezes, nos valores de AGLs em relação aos controles, sendo que o tratamento com CV foi capaz de reduzir parcialmente esses resultados.



**Figura 21-** Níveis séricos de ácidos graxos livres (mEq/L) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. #  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*).

#### 4.2.7- Dosagem sérica dos níveis de corpos cetônicos

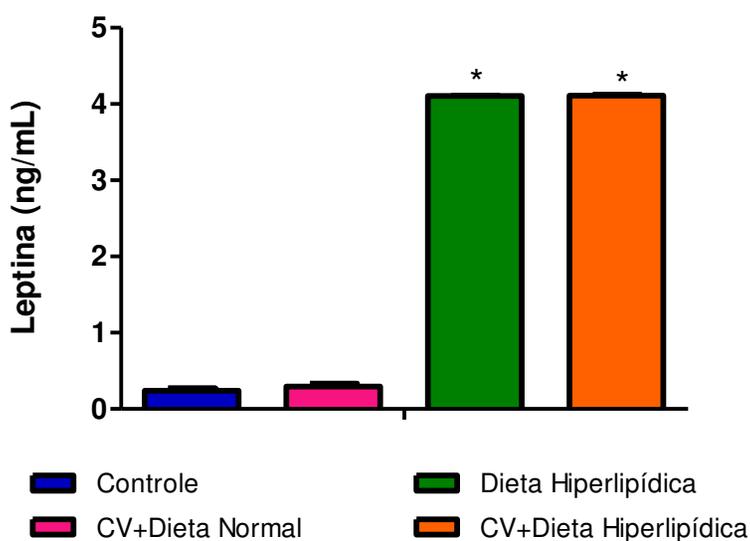
A média e desvio padrão (DP) dos níveis séricos de corpos cetônicos estão apresentados na Figura 22. Os animais em dieta normal, mesmo quando tratados com CV, mantiveram os níveis de corpos cetônicos dentro dos limites de normalidade. A administração da dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), em média 4 vezes, nos valores de corpos cetônicos em relação aos controles, sendo que o tratamento com CV foi capaz de reduzir parcialmente esses resultados.



**Figura 22-** Níveis séricos de corpos cetônicos (mM) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. #  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*).

#### 4.2.8- Dosagem sérica dos níveis de leptina

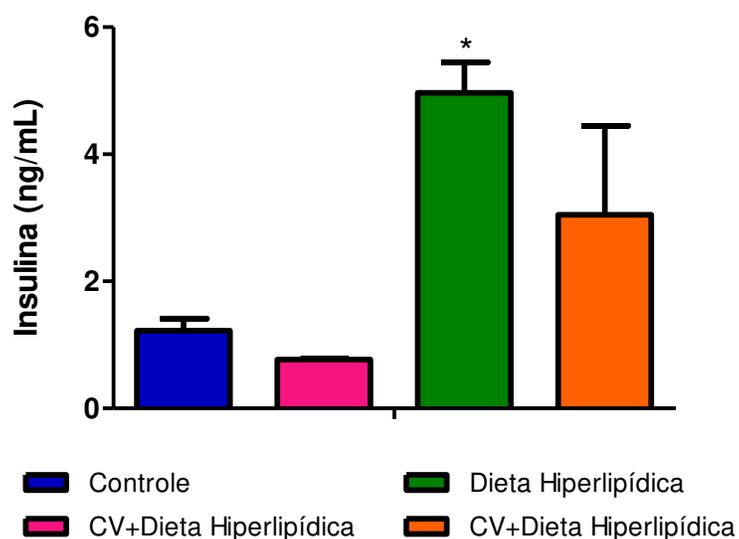
A média e desvio padrão (DP) dos níveis séricos de leptina estão apresentados na Figura 23. A administração de CV aos animais em dieta normal não promoveu alterações nos níveis séricos de leptina. Por outro lado, os camundongos que receberam a dieta hiperlipídica, independente do tratamento com CV, apresentaram níveis significativamente superiores, atingindo valores em média 15 vezes maiores em relação aos controles. Tais resultados demonstram que, no presente contexto, a CV não preveniu a hiperleptinemia.



**Figura 23-** Níveis séricos de leptina (ng/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. ANOVA; Teste de Tukey. (CV *Chlorella vulgaris*).

#### 4.2.9- Dosagem sérica dos níveis de insulina

A média e desvio padrão (DP) dos níveis séricos de insulina estão apresentados na Figura 24. A administração de CV aos animais em dieta normal não promoveu alterações nos níveis séricos de insulina. Por outro lado, os camundongos que receberam a dieta hiperlipídica, independente do tratamento com CV, apresentaram níveis significativamente superiores, atingindo valores em média 3 vezes maiores em relação aos controles. Tais resultados demonstram que, no presente contexto, a CV não preveniu a hiperinsulinemia.

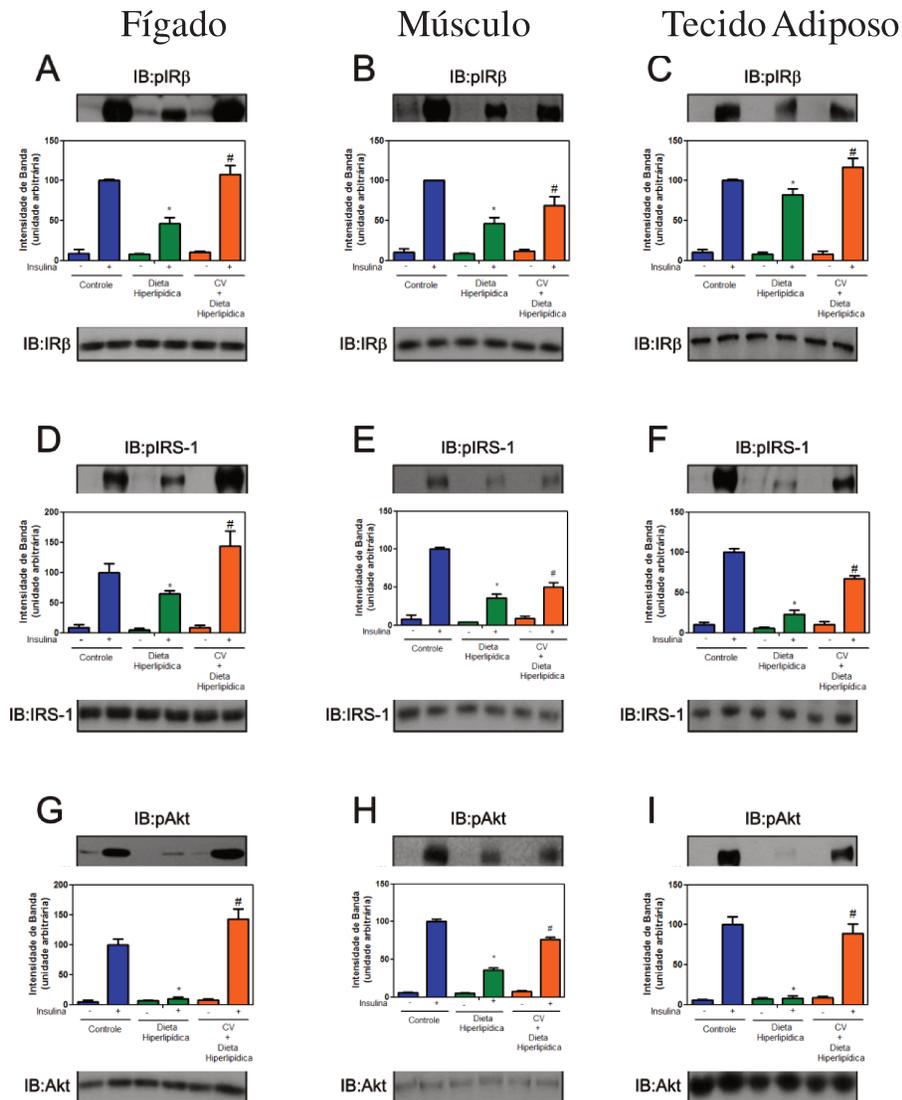


**Figura 24-** Níveis séricos de insulina (ng/mL) de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  DP e representam o número de 6 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles. ANOVA; Teste de Tukey. (CV *Chlorella vulgaris*).

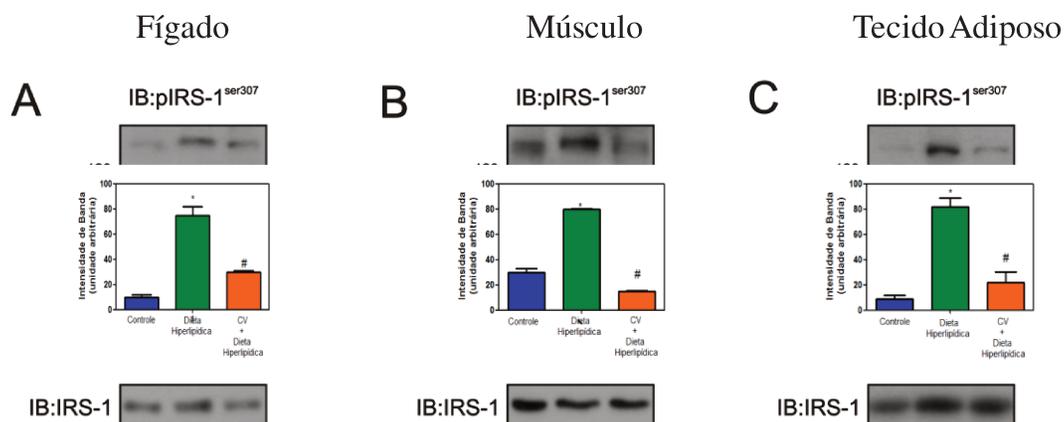
4.2.10- Expressão das proteínas totais e fosforiladas (IR $\beta$ , IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal

Como esperado, no fígado, músculo e tecido adiposo de animais que receberam a dieta hiperlipídica, os níveis de fosforilação em tirosina do IR $\beta$  e seu substrato (IRS-1) e em serina de Akt foram significativamente reduzidos quando comparados aos controles. Por outro lado, os camundongos tratados com CV apresentaram maior fosforilação dessas proteínas em todos os tecidos estudados quando comparados aos animais não tratados. Além disso, o tratamento de CV foi capaz de prevenir a fosforilação em serina 307 do IRS-1 nos tecidos analisados (Figuras 25 e 26).

Em conjunto, estes resultados mostram que o tratamento com CV foi capaz de prevenir o desenvolvimento da resistência à insulina induzido pela dieta hiperlipídica.



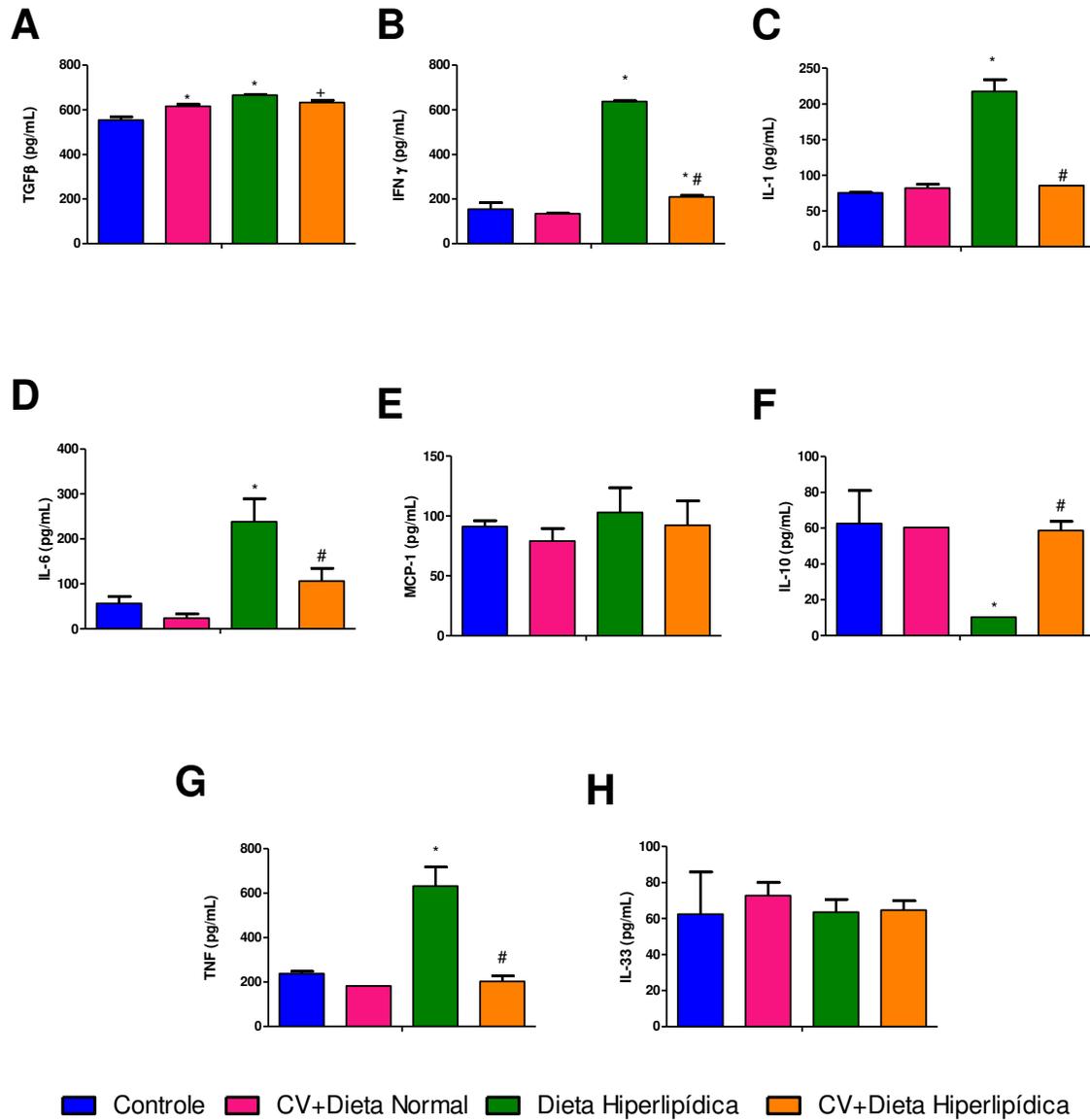
**Figura 25-** Efeitos da administração de CV na sinalização de insulina do fígado, músculo e tecido adiposo de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. Blots representativos demonstram nos tecidos a fosforilação em tirosina de IR $\beta$  (A-C) e IRS-1 (D-F), e a fosforilação em serina 473 de Akt (G-I). Expressão da proteína total. Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais/grupo. #  $p < 0,05$  em relação aos controles. \*  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*, IR $\beta$  receptor de insulina  $\beta$ , IRS-1 substrato do receptor de insulina-1, IB imunoblot).



**Figura 26-** Efeitos da administração de CV na fosforilação em serina 307 do IRS-1 do fígado (A), músculo (B) e tecido adiposo (C) de camundongos Balb/C recebendo dieta normal ou hiperlipídica. O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica por 90 dias. Blots representativos. Expressão da proteína total. Os resultados representam a média  $\pm$  DP de 6 animais/grupo. #  $p < 0,05$  em relação aos controles. \*  $p < 0,05$  comparando grupos dieta hiperlipídica e CV/dieta hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni. (CV *Chlorella vulgaris*, IR $\beta$  receptor de insulina  $\beta$ , IRS-1 substrato do receptor de insulina-1, IB imunoblot).

#### 4.2.11- Dosagem sérica dos níveis de citocinas (TGF- $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6, MCP-1, IL-10, TNF- $\alpha$ e IL-33)

A média e desvio padrão (DP) dos níveis séricos de citocinas (TGF- $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6, MCP-1, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-33) estão apresentados na Figura 27. A administração de CV aos animais em dieta normal não promoveu alterações nos níveis séricos da maioria das citocinas estudadas, exceto o TGF- $\beta$ , onde a CV ocasionou aumento de seus valores em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Como esperado, os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram um notável aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, TGF- $\beta$  e IFN $\gamma$  em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a administração de CV manteve os valores de IL-1 e TNF- $\alpha$  dentro da normalidade ( $p < 0,05$ ), enquanto os valores de TGF- $\beta$  e IL-6 foram parcialmente reduzidos ( $p < 0,05$ ). Em relação aos valores de MCP-1 e IL-33, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Contudo, uma considerável diminuição dos níveis séricos de IL-10 foi observada nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica ( $p < 0,05$ ), sendo que a administração de CV a esses animais manteve seus valores dentro da normalidade.



**Figura 27-** Níveis séricos de citocinas de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica. TGF- $\beta$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-1 (C), IL-6 (D), MCP-1 (E), IL-10 (F), TNF- $\alpha$  (G) e IL-33 (H). O início do tratamento com 50mg/kg/dia de CV ocorreu 5 dias prévios ao início da administração da dieta hiperlipídica. Os resultados refletem o efeito do tratamento simultâneo de CV e dieta hiperlipídica durante 90 dias. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. O grupo controle recebeu somente veículo (água). Os valores representam a média de 6 frascos de cultura. \* p < 0,05 em relação ao grupo controle. + p < 0,05 em relação ao grupo Dieta Hiperlipídica. ANOVA; Teste de Bonferroni.

## **5- DISCUSSÃO**



## 5- DISCUSSÃO

A prevalência global da obesidade e doenças relacionadas está aumentando. Em 2003, dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) mostravam que 20% do total de homens e um terço das mulheres apresentavam excesso de peso. A obesidade está associada ao desenvolvimento do DM2, alteração metabólica que primeiramente é caracterizada por resistência à insulina e hiperglicemia. Além disso, estes indivíduos são suscetíveis a problemas cardiovasculares, dislipidemia, apnéia, hepatopatias, nefropatias e hipertensão. Estudos têm identificado a inflamação e a resistência à insulina como pré-requisitos na patogênese da obesidade (revisado por Hoffler *et al.*, 2009). Portanto, a busca por alternativas terapêuticas, tais como ervas (Leite *et al.*, 2011, Chang *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2013) e algas (Lee *et al.*, 2012) que minimizem tais efeitos e sejam efetivos na regulação dos distúrbios observados na obesidade vem recebendo atenção crescente da comunidade científica (Narayan *et al.*, 2000, Rantes, 2001, Lee e Kim, 2009). Nesse contexto, a CV, uma alga verde unicelular microscópica de água doce, surge como alternativa terapêutica e profilática. A CV é considerada um alimento completo que apresenta composição nutricional balanceada composta por nutrientes essenciais para a manutenção da auto-defesa natural do organismo (Hasegawa *et al.*, 2000, Vijayavel *et al.*, 2007; Rodriguez-Garcia e Guil-Guerrero, 2008, An *et al.*, 2010, Morris *et al.*, 2011). Sua atividade adaptativa ou modificadora da resposta biológica é definida pela capacidade de reduzir os níveis de hormônios relacionados com o estresse no organismo. Resultados produzidos pelo nosso grupo demonstram que em presença de condições adversas, o hospedeiro que vem recebendo CV é capaz de reagir mais prontamente e com maior vigor na indução de mecanismos essenciais da defesa imunológica (Dantas e Queiroz, 1999; Justo *et al.*, 2001; Queiroz *et al.*, 2002, 2008, 2010, 2011; Souza-Queiroz *et al.*, 2004, 2008, 2013, Ramos *et al.*, 2008 e 2010).

A dieta e os hábitos alimentares estão diretamente associados ao controle e ao desenvolvimento da obesidade, e neste último caso com o aparecimento do DM2. De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA), em pacientes diabéticos, carboidratos e gorduras monoinsaturadas juntos devem perfazer 60%-70% da ingestão energética (Kelley, 2003). A ingestão de fibras é imprescindível pelos efeitos benéficos que

apresentam sobre o controle glicêmico e lipídico. As proteínas devem perfazer 15 a 20% da necessidade diária. No diabetes não-controlado há uma necessidade de maior ingestão protéica compensatória na produção energética, o que pode promover perda de peso e melhora no perfil glicêmico. Por outro lado, a ingestão de gorduras deve ser bastante controlada e composta preferencialmente por lipídeos saturados e poliinsaturados, não ultrapassando 10% da necessidade diária (ADA, 2004). Entre os ácidos poliinsaturados, o ômega-3 ( $\omega$ -3) destaca-se pelo seu efeito benéfico no tratamento da hipertrigliceridemia em pacientes com DM2. Neste contexto, a CV apresenta composição bastante adequada sendo rica em proteínas e fibras e apresentando baixo teor de lipídeos, destacando-se a presença de ômega-3. Segundo as análises realizadas, a CV utilizada neste estudo demonstrou uma proporção ideal de ácidos graxos poliinsaturados, isto é, a relação entre  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 é 1,34:1 (Simopoulos, 2002).

Em estudos bioquímicos realizados por Tanaka e colaboradores (1986) não foram detectados lipídeos nas análises realizadas com a CV. Por outro lado, estudos com a *Chlorella pyrenoidosa* demonstraram a presença de frações fosfolipídicas e glicolipídicas (Sano *et al.*, 1988) e de ácidos graxos (Radmann e Costa, 2008) na composição desta espécie. Além disso, análises da CV mostraram concentrações similares de proteínas e lipídios, corroborando nossos achados (Lee *et al.*, 2008, Lee e Kim, 2009, Jeong e Kim, 2009). De acordo com a literatura, a CV contém grande quantidade de beta caroteno, vitaminas (E, A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) e ácido fólico. Sua composição mineral contém cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês, ferro, iodo, fósforo, potássio, cobalto e selênio (Baianovo e Turbachev, 1981, Lee *et al.*, 2008, Lee e Kim, 2009, Jeong e Kim, 2009), sendo que muitos destacam-se como catalisadores enzimáticos e hormonais (Georgievskii *et al.*, 1982). Resultados semelhantes foram encontrados em nossas análises, sendo importante salientar a ausência de metais pesados, como chumbo, mercúrio, alumínio, entre outros. Tal fato poderia ser explicado pela forma de cultivo da alga, o qual é realizado em tanques específicos com água doce, constantemente controlado. Muitos dos componentes da CV apresentam capacidade antioxidante, como a vitaminas E (Hasegawa *et al.*, 1995, Shibata *et al.*, 2001), o que poderia explicar tal capacidade da alga. Além disso, o ferro é nutriente importante na hematopoese, principalmente na síntese de hemoglobina

(Hoffbrand *et al.*, 2006). Outro aspecto interessante é a presença de aminoácidos, importantes na síntese protéica e funções biológicas específicas (Lehninger *et al.*, 1998). Portanto, sua composição nutricional bem equilibrada, incluindo carboidratos, proteínas, ácidos nucléicos, aminoácidos essenciais, ácidos graxos essenciais ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6), vitaminas, fibras alimentares e antioxidantes faz desta alga uma opção alimentar interessante na recuperação da saúde (Vijayavel *et al.*, 2007, Rodriguez-Garcia e Guil-Guerrero, 2008, Panahi *et al.*, 2012).

Alimentação hipercalórica e rica em lipídeos é um dos fatores mais importantes que leva a obesidade (Carneiro, 2005). Sabe-se que camundongos submetidos à dieta hiperlipídica palatável mostram, a partir de três semanas, um aumento na quantidade de tecido adiposo, com tendências a alterações no perfil lipídico e nas etapas iniciais da sinalização da insulina (Estadella *et al.*, 2004). Estudos demonstram que o consumo de dietas ricas em gordura saturada promove resistência hipotalâmica aos hormônios anorexigênicos, à leptina e à insulina levando à perda progressiva no balanço energético, resultando em ganho de massa corpórea (Munzberg *et al.*, 2005, Milanski *et al.*, 2009). Nossos resultados mostram que os animais tratados com dieta hiperlipídica, mesmo recebendo o tratamento com CV, apresentaram aumento significativo no peso quando comparados aos controles tratados e não tratados com CV. Tais achados são corroborados por estudos na literatura (Cherng e Kim, 2005, Lee e Kim 2009). Da mesma forma, a CV não foi capaz de reduzir os níveis séricos de leptina nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica. O aumento dos níveis deste hormônio correlaciona-se com a quantidade total de tecido adiposo. (Friedman e Hallas, 1998, Frühbeck *et al.*, 2001). Sendo assim, os camundongos que receberam a dieta hiperlipídica independente do tratamento com CV apresentaram o mesmo acúmulo de tecido adiposo, o que sugere aumento na síntese de leptina e conseqüente aumento na sua concentração sérica.

Um dos efeitos mais notáveis da CV na resposta do hospedeiro imunossuprimido consiste na estimulação do *pool* de células hematopoéticas na medula óssea e a ativação funcional de leucócitos maduros. Nesse sentido, estudos do nosso laboratório têm demonstrado a capacidade da CV reverter a mielossupressão e a imunossupressão

produzidas por diferentes tipos de estresse (Dantas e Queiroz, 1999; Justo *et al.*, 2001; Queiroz *et al.*, 2002, 2008, 2010, 2011, 2013; Souza-Queiroz *et al.*, 2004 e 2008; Ramos *et al.*, 2008 e 2010). No presente estudo, uma redução significativa no número de CFU-GM da medula óssea foi observada nos animais que receberam dieta hiperlipídica, a qual foi acompanhada da migração destas células para o baço. O tratamento com CV restaurou a resposta hematopoética medular e extramedular nestes animais, sendo que este efeito já foi observado desde o início do tratamento, na avaliação de 15 dias, e se manteve durante todo o período avaliado. É importante mencionar que o tratamento com a alga não produziu alterações na resposta hematopoética do animal normal. Sabe-se que as células tronco-hematopoéticas e as células progenitoras podem migrar através da circulação para outros tecidos, como o baço, sendo parte da defesa do organismo, sustentando um segundo nível de resposta hematopoética compensatória (Blouin *et al.*, 1999). Portanto, a redução da atividade hematopoética extramedular nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica e tratados com CV é resultado dos mecanismos de defesa da alga.

Outro aspecto interessante dos nossos resultados foi a capacidade da CV estimular a atividade hematopoética do soro (CSA), tanto em animais em dieta normal como naqueles que receberam a dieta hiperlipídica, corroborando resultados anteriores do nosso laboratório em outros modelos experimentais (Ramos *et al.*, 2010, Souza-Queiroz *et al.*, 2008, Queiroz *et al.*, 2008). Nos quatro grupos avaliados, as alterações observadas nos níveis de CSA foram mantidas constantes durante o estudo. A administração de CV aumentou em duas vezes a atividade estimuladora do soro no animal normal. É importante salientar que este efeito foi observado na ausência de hematopoese extramedular, da mesma forma que ocorre no animal em dieta normal. Nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica, ocorreu aumento de duas e meia vezes nos níveis de CSA, comparado com o controle não-tratado. O tratamento com a alga produziu aumento adicional de duas vezes na atividade estimuladora do soro destes animais. Portanto, o tratamento com CV é capaz de regular a CSA, tal achado corrobora estudos prévios que mostram aumento dos níveis de mRNA específico para GM-CSF pela CV (Hasegawa *et al.*, 1997, 2000, Pariente *et al.*, 1999). O aumento persistente nos níveis de CSA em condições adversas relaciona-se a uma tentativa em manter adequada a proliferação, diferenciação e função de granulócitos e

macrófagos (Jin *et al.*, 2002). Dessa forma, a administração de CV contribui para reverter o impacto destas condições no *pool* de células progenitoras.

A avaliação dos efeitos da CV sobre a interação entre as células estromais e as CTH da medula óssea demonstraram redução na formação de CFU-GM a partir das células não-aderentes das culturas de longa duração da medula óssea, assim como número total das células não-aderentes, nos animais que receberam dieta hiperlipídica, sendo este efeito revertido pelo tratamento com a alga. Por outro lado, a dieta hiperlipídica não alterou o número de células aderentes nas LTBMCS, sugerindo que a redução do número de CFU-GM *in vitro* pode estar relacionada a uma falha na habilidade funcional e na produção dos fatores reguladores pelo estroma medular. Estes resultados demonstram que o tratamento com CV foi capaz de manter o balanço dos estímulos positivos e negativos que controlam a mielopoiese. Além disso, a apoptose das células da medula óssea não foi significativamente diferente entre os diversos grupos estudados, permanecendo dentro dos valores fisiológicos (Renehan *et al.*, 2001, Elmore, 2007), sugerindo que a redução do número de CFU-GM poderia estar relacionada a uma diminuição na síntese de citocinas hematopoéticas e não a um aumento da morte celular. Confirmando essa hipótese, o número de CTH não demonstrou diferença estatística entre os grupos avaliados. Por outro lado, os animais que receberam a DH apresentaram diminuição no número de progenitores granulócito-monócítico (GMP) na medula óssea, a administração de CV reverteu tal alteração, corroborando achados no CFU-GM observada *in vitro*. Em contrapartida, quando foi verificado o número de células hematopoéticas maduras, os mesmos camundongos demonstraram valores elevados de granulócitos (GRA) em relação ao controle. Sabe-se que em condições adversas os órgãos hematopoéticos possuem capacidade de aumentar a produção e maturação celular (Li *et al.*, 2000), portanto outros progenitores hematopoéticos, como o progenitor mielóide comum (CMP), submetidos aos estímulos adequados (Marx *et al.*, 1998; Miyayama *et al.*, 1998; Elenkov *et al.*, 1999), poderiam originar células, dentre elas os GRA (Hoffbrand *et al.*, 1998). Nossos resultados demonstraram que a atividade moduladora hematopoética da alga está relacionada à sua capacidade de induzir a produção de citocinas biologicamente ativas, como observado pelo aumento nos níveis de IL-1 e IL-6 no sobrenadante da LTBMCS. Tais achados corroboram trabalhos anteriores do

nosso laboratório (Queiroz *et al.*, 2003 e 2008, Souza-Queiroz *et al.*, 2008, Ramos *et al.*, 2010). Portanto, a IL-1 e IL-6 apresentam ação sinérgica com fatores estimuladores hematopoéticos (Eaves *et al.*, 1991).

Outro aspecto interessante da CV é a sua capacidade de regular os parâmetros metabólicos, entre eles os níveis séricos de colesterol total e glicose (Rodríguez-López e López-Quejada, 1971, Cherng e Shih, 2005 e 2006, Mizoguchi *et al.*, 2008, Lee e Kim, 2009). Nossos achados demonstraram que a administração da dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo na glicemia, comparado ao controle. O tratamento com CV aumentou a sensibilidade à insulina nos animais que receberam a dieta hiperlipídica, produzindo uma redução parcial significativa nos níveis de glicemia. Estudos anteriores relataram que uma espécie diferente do gênero *Chlorella*, a *Chlorella pyrenoidosa* (CP), tem potencial hipoglicêmico (Rodríguez-López e López-Quejada, 1971, Jong-Yuh e Mei-Fen, 2005, Jeong *et al.*, 2009, Senthilkumar *et al.*, 2012). Nossos resultados mostram que a CV foi capaz de evitar a hiperglicemia em camundongos obesos. Além disso, estudo envolvendo a *Chlorella sorokiniana* demonstrou que esta alga foi capaz de provocar ativação dupla de receptores do peroxissomo proliferador-ativado (PPAR  $\alpha/\gamma$ ). Está bem estabelecido que essa dupla ativação induz uma melhoria na glicose e níveis de insulina, bem como reduz a hiperlipidemia (Chou *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos têm sugerido que CV induz um aumento na expressão do GLUT-4, permitindo um influxo de glicose no fígado e músculos (Lee e Kim, 2009). Em conjunto, estes achados nos levam a concluir de que a CV tem um efeito hipoglicêmico.

Além da hiperglicemia, os animais que receberam a DH apresentaram um notável aumento nos níveis de insulina (Cherng, e Shih, 2006, Mehran *et al.*, 2012). Ao contrário dos níveis de glicose, a administração de CV não alterou os níveis de insulina nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica. Nossos resultados corroboram estudos anteriores que CP e CV não interferem na secreção de insulina (Rodríguez-Lopez e Lopez-Quejada, 1971, Cherng e Shih, 2006, Jeong *et al.*, 2009). Dando suporte a esses achados, estudos mostraram a relação entre a CP e glibenclamida (sulfoniluréia hipoglicemiante, conhecida por estimular a secreção de insulina), nos quais a alga não causou alterações nos níveis de insulina, sugerindo que a CV parece influenciar a glicemia por um mecanismo

diferente daquele usado pela glibenclamida (Jong-Yuh e Mei-Fen, 2005) Embora a administração de CV não tenha impedido o desenvolvimento de hiperinsulinemia, observamos uma melhoria na tolerância à glicose e à insulina, durante o GTT e ITT e, provável melhoria da sinalização da insulina nos camundongos que receberam a DH.

A resistência à insulina é o principal ponto de intersecção entre a obesidade, o DM2 e suas complicações (Shoelson *et al.*, 2006). É bem estabelecida sua associação com redução na fosforilação de IR $\beta$ , IRS-1 e Akt nos tecidos-alvo desse hormônio (Saltiel e Kahn, 2001, Saltiel e Pessin, 2002, Boura-Halfon e Zick, 2009). Pela primeira vez, nossos resultados demonstraram a influência da administração de CV na via de sinalização da insulina, pelo aumento dos níveis de fosforilação de proteínas, tais como IR $\beta$ , IRS-1 e Akt no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Paralelamente, também se observou baixos níveis de fosforilação de IRS-1<sup>ser307</sup>. Além disso, nossos dados ajudam a explicar o aumento dos níveis de GLUT-4, demonstrado por Lee e Kim (2009), ou seja, a melhoria na via de sinalização da insulina pode ser responsável pelo aumento da translocação de GLUT-4 e, por conseguinte, o influxo de glicose no fígado e músculo. Portanto, estes dados suportam a idéia que a CV atua aumentando a sensibilidade à insulina dos tecidos-alvo principais e, conseqüentemente, impede o efeito deletério sobre a sinalização de insulina induzida pela dieta rica em gordura.

Uma complexa rede de eventos está envolvida na fisiopatologia do desenvolvimento da resistência à insulina, entre elas a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Saltiel e Kahn, 2001, Shoelson *et al.*, 2006, Boden, 2011). Nossos resultados demonstraram que tais citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IFN $\gamma$ ) apresentaram-se significativamente elevadas nos camundongos que receberam a DH, confirmando a presença de inflamação subclínica nesses animais. Por outro lado, a administração de CV a esse grupo, ocasionou uma redução significativa dos níveis séricos dessas citocinas. Em relação a IL-10, citocina anti-inflamatória que encontra-se diminuída em obesos (revisado por Charles *et al.*, 2011), como esperado, os camundongos que receberam a DH apresentaram diminuição dos níveis dessa citocina, sendo que a administração de CV preveniu tal alteração. A IL-10 está relacionada ao aumento de sensibilidade à insulina (Blüher *et al.*, 2005), embora o

mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado (Charles *et al.*, 2011), sugere-se que esta citocina pode prevenir a resistência à insulina induzida pelo TNF- $\alpha$  (Lumeng *et al.*, 2007). Outra citocina envolvida na fisiopatologia da obesidade é a proteína quimiotática para macrófago (MCP-1), quimiocina responsável pelo aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo (Brunn *et al.*, 2005) o que agrava o processo inflamatório. No entanto, nossos dados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Resultados semelhantes foram encontrados com os níveis séricos de IL-33, nos quais não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos. Em conjunto, tais achados mostram que o uso de CV diminuiu a inflamação observada na obesidade, confirmando seu caráter anti-inflamatório.

A resistência à insulina é frequentemente correlacionada com dislipidemia (Saltiel e Pessin, 2002), caracterizada por aumento de triglicerídeos e colesterol (Howard *et al.*, 2003). A administração de CV foi capaz de manter os níveis de triglicérides e colesterol total sob valores fisiológicos nos animais obesos. O mesmo foi observado para frações de colesterol, exceto HDL. Da mesma forma, a concentração de AGLs foi mantida em níveis fisiológicos após a administração de CV nos camundongos que receberam a DH. Esses dados são consistentes com estudos anteriores, nos quais a administração de CV não só diminuiu a absorção e promoveu a excreção de gordura intestinal, como reduziu a síntese de AGLs (Okudo *et al.* 1975, Sano *et al.*, 1988, Chovaněíková e Simek, 2001, Shibata *et al.*, 2001, Cherng e Shih, 2006, Lee *et al.*, 2008). As características nutricionais da CV, seu teor de fibras solúveis em água, podem promover a excreção de gordura intestinal (Kay, 1991). Além disso, a CV contém ácidos graxos poliinsaturados, como o  $\omega$ -3, que demonstrou exercer efeitos anti-inflamatórios e melhorar a sensibilidade à insulina, bem como regulação dos genes implicados no transporte de glicose e a sinalização da insulina no tecido adiposo e no fígado (Gonzalez-Periz *et al.*, 2009).

Nos quadros de DM descompensado, as células não são mais capazes de utilizar a glicose como fonte de energia, uma das alternativas é utilizar o estoque de gordura, para tal, porém, a longo prazo leva ao acúmulo de corpos cetônicos, conseqüente cetoacidose, agravando o quadro clínico (Guyton e Hall, 2011). Nesse sentido, a administração de CV foi

capaz de prevenir o aumento dos níveis séricos de corpos cetônicos em animais obesos. Portanto, a CV impediu os efeitos deletérios induzidos pela DH em camundongos obesos.

As atividades protetoras da CV foram demonstradas em muitas doenças, incluindo infecções (Tanaka *et al.*, 1986, Dantas e Queiroz, 1999, Hasegawa *et al.*, 1994, 1997, 2000, Queiroz *et al.*, 2003), tumores (Konishi *et al.*, 1985, Tanaka *et al.*, 1998, Justo *et al.*, 2001, Ramos *et al.*, 2010) e toxicidade por exposição a metais (Singh *et al.*, 2004, Queiroz *et al.*, 2008), todas associadas a sua atividade anti-inflamatória e antioxidante. Com base em nossos resultados, sugerimos que a capacidade de manter o AGLs em níveis fisiológicos é um dos mecanismos possíveis para a melhoria da sensibilidade à insulina induzida pela CV. Além disso, a CV modulou o processo inflamatório, diminuindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias bloqueando a ativação de vias inflamatórias. E, finalmente, a CV pode também diminuir o estresse oxidativo aumentando os níveis de antioxidantes endógenos, como a catalase (Aizzat *et al.*, 2010) e, conseqüentemente aumentando a sensibilidade à insulina. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar precisamente quais os mecanismos de prevenção da resistência à insulina pela CV em animais obesos.

Dessa forma, podemos concluir que a CV possui importante papel modulador nos parâmetros hematopoéticos, metabólicos, bem como na sinalização da insulina em animais que receberam dieta hiperlipídica. Independente dos mecanismos envolvidos, a administração de CV protegeu estes animais da redução no número de CFU-GM ao mesmo tempo em que preveniu a hematopoese extramedular. Além disso, a administração da CV aumentou a fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização insulínica, melhorando expressivamente a sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo. A recuperação da ação da insulina nestes camundongos reflete em melhora na tolerância à glicose e queda na glicemia nos mesmos. Sendo assim, a alga *Chlorella vulgaris* surge como uma promissora alternativa terapêutica e/ou complementar no tratamento da obesidade e suas complicações.



## **6- CONCLUSÃO**



## **6- CONCLUSÃO**

A administração de CV foi capaz de modular os parâmetros hematopoéticos, metabólicos, bem como a sinalização da insulina em animais que receberam dieta hiperlipídica. Sendo assim, a alga *Chlorella vulgaris* surge como uma promissora alternativa terapêutica e/ou complementar no tratamento da obesidade e suas complicações.



## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahima, R.S. e Flier, J.S. "Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab v.11, n.8,p.327-332, 2000.

Aguirre, V. Werner, E. D. Giraud, J. Lee, Y. H. Shoelson, S. E., White, M. F. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action J Biol Chem, vol.277, no. 2, pp. 1531-7, 2002.

Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B 3rd, Johnson, R.S., Kahn, C.R. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature Nov 10, 372(6502):128-129, 1994.

Aizzat, O., Yap, S.W., Sopiah, H., Madiha, M.M., Hazreen, M., Shailah, A., Wan Junizam, W.Y., Nur Syaidah, A., Srijit, Das., Musalmah, M., Yasmin Anum, M.Y. Modulation of oxidative stress by *Chlorella vulgaris* in streptozotocin (STZ) induced diabetic Sprague-Dawley rats. Advances in Medical Sciencesv.55, n.2, p. 281-288, 2010.

American Diabetes Association (ADA). Nutrition Diabetes Care principles and recommendations in diabetes. v.27 Suppl 1: S36-S46, 2004.

An, H-J., Hong-Kun, R., Jeong, H-J., Hong, S-H., Um, J-Y., Kim, H-M. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. Immunopharmacology and Immunotoxicology, v.32, n.4, p.585–592, 2010.

Baianova, I, Trubachev, I.N. Comparative evaluation of vitamin composition of unicellular algae and higher plants Brown under artificial conditions. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia 17(3), 400-407, 1981.

Baker, J.M., Myers, M.G.Jr., Shoelson, S.E., Chin, D.J., Sun, X.J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J., White, M.F. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. Embo J 11:3469-3479, 1992.

Charles, B.A., Doumatey, A., Huang, H., Zhou, J., Chen, G., Shriner, D., Adeyemo, A., Rotimi, C.N. The Roles of IL-6, IL-10, and IL-1RA in Obesity and Insulin Resistance in African-Americans. J Clin Endocrinol Metab. December; 96(12): E2018–E2022, 2011.

Bastos, D.H.M., Rogero, M.M., Arêas, J.A.G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. *Arq. Br. Endoc. Met.*, v.53, n.5, p.646-656, 2009.

Bennett, B.D., Solar, G.P., Yuan, J.Q., Mathias, J., Thomas, G.R., Matthews, W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 6:1170, 1996.

Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* (9), 725-731, 1994.

Blouin, M.J., De Paepe, M.E., Trudel, M. Altered hematopoiesis in murine sickle cell disease. *Blood* v.94, n.4, Aug 15; p.1451-9, 1999.

Blüher M, Fasshauer M, Tönjes A, Kratzsch J, Schön MR, Paschke R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113:534–537, 2005.

Boden, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* v.18, Apr, n.2, p.139-43, 2011.

Bouloumie, A., Drexler, H.C., Lafontan, M., Busse, R. Leptin, the product of *ob* gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83:1059-1066, 1998.

Boura-Halfon, S., Zick, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* vol.296, no. 4, pp. E581-91, 2009.

Broxmeyer HE, Cooper S, Cacalano G, Hague NL, Bailish E, Moore MW Involvement of Interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J Exp Med.* Nov 1;184(5):1825-32, 1996.

Bush, B.M. *Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais.* São Paulo: Roca, 2004.

Calle, E.E., Kaaks, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Rev. Cancer.* 4, 579–91, 2004.

Campbell PJ, Mandarino LJ, Gerich JE. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 37:15-21, 1988.

Carlo-Stella C, Di Nicola M, Milani R, Longoni P, Milanese M, Bifulco C, Stucchi C, Guidetti A, Cleris L, Formelli F, Garotta G, Gianni AM. Age- and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone. *Exp Hematol.* Feb;32(2):171-8, 2004.

Carneiro, G. Patogênese. In: Claudino, A.M., Zanella, M.T. Transtornos alimentares e obesidade. Barueri, SP: Manole, 2005, 203p.

Carvalho, J.B.C., Zecchin, H.G., Saad, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46(4): 419-425, 2002.

Chandra, R. K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14304-14307, 1996.

Chandra, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 66(2): 460S-463S, 1997.

Chang CL, Lin Y, Bartolome AP, et al. "Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2013, p. 378-657, 2013.

Chehab, F.F., Qui, J., Mounzih, K., Ewart-Taland, A., Ogus, S. Leptin and reproduction. *Nutr Rev* 60:S39-S46, 2002.

Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A. *et. al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 84:491-495, 1996.

Cherng, J., Shih, M. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences* 77:980-990, 2005.

Cherng, J., Shih, M. Improving glycogenesis in Streptozotocin (STS) diabetic mice after administration of green algae *Chlorella*. *Life Sciences* 78:1181-1186, 2006.

Chou, Y. C. Prakash, E. Huang, C. F. Lien, T. W. Chen, X. Su, I. J. et al., Bioassay-guided purification and identification of PPARalpha/gamma agonists from *Chlorella sorokiniana* *Phytother Res*, vol.22, no. 5, pp. 605-13, 2008.

Chovaněšková, M., Simek, V. Effects of high-fat and *Chlorella vulgaris* feeding on changes in lipid metabolism in mice. *Biologia*, Bratislava v.56, n.6, p.661-666, 2001.

Chrousos, G.P. The HPA axis and the stress response. *End research*, Nov, v. 26 (4): p. 513-4, 2000.

Claycombe, K., King, L.E., Fraker, P.J. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. *PNAS* 105(6):2017-2021, 2008.

Clayton, P.E., Gill, M.S., Hall, C.M., Tillmann, V., Price, D.A. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clinical Endocrinology* v.46, p.727-733, 1997.

Connor, W.E., Witiak, D.T., Stone, D.B., Armstrong, M.L. Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition. *J Clin Invest* 48:1363-1375, 1969.

Craparo, A., Freund, R., Gustafson, T. A. 14-3-3 (γ) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J. Biol. Chem.*v.272, p.11663–11669, 1997.

Dantas, D.C.M., Queiroz, M.L.S. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 499-508, 1999.

Dantas, D.C.M., Kaneno, R., Queiroz, M.L.S. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of Natural Killer cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 21(3), 609-619, 1999.

De Feo, P., Volpi, E. *et al.* Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans." *Diabetes* v.42, n.7, p.995-1002, 1993.

Dinarelli CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87: 2095-147, 1996.

Donath, M.Y., Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease *Nat Rev Immunol*, vol.11, no. 2, pp. 98-107, 2011.

Dudek AZ, Nesmelova I, Mayo K, Verfaillie CM, Pitchford S, Slungaard A. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood*. Jun 15;101(12):4687-94, 2003.

Ducy, P., Amling, M., Takeda, S. *et al.* Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100:197-207, 2000.

Dybedal, I., Bryder, D., Fossum, A., Rusten, L.S., Eirik, S., Jacobsen, W. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* 98: 1782-1791, 2001.

Eaves, C.J., Cashman, J.D., Kay, R.J., Dougherty, G.J., Otsuka, T. *et al.* Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood* 78:110-117, 1991.

Elenkov, I.J., Webster, E.L., Torpy, D.J., Chrousos, G.P. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 876, 1-11, 1999.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death *Toxicol Pathol.* 2007 ; 35(4): 495–516.

Estadella, D., Oyama, L.M., Dâmaso, A.R., Ribeiro, E.B., Oller do Nascimento, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.*; 20(2):218-24, 2004.

Feve, B., Bastard, J.P. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus." *Nat Rev Endocrinol* 5(6): 305-311, 2009.

Fried, S.K., Bunkin, D.A. *et al.* Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* v.83, n.3, p.847-850, 1998.

Friedman, J.M., Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770, 1998.

Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F.J., Burrel, M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* v.280, p.E8427-E847, 2001.

Furuhashi, M., Fucho, R., Gorgun, C.Z., Tuncman, G., Cao, H., Hotamisligil, G.S. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding protein contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J. Clin. Invest.*, v.118, p.2640-2650, 2008.

Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., MCFarlane, C., NG, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S., Hilton, D.J. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation on hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, p.14564-14568, 1996.

Georgievskii, V. I.; Annekov, B. N.; Samokhin, V. T. Mineral nutrition of animals. London: Butterworth, p. 11-56, 1982.

Gonzalez-Periz, A. Horrillo, R. Ferre, N. Gronert, K. Dong, B. Moran-Salvador, E. *et al.*, Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins *FASEB J*, vol.23, no. 6, pp. 1946-57, 2009.

Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity" *Annu Rev Immunol*, vol.29, no. pp. 415-45, 2011.

Grimble, R. F. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* v.5, n.5, p.551-559, 2002.

Gutierrez, D.A., Puglisi, M.J. *et al.* Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 9(1): 26-32, 2009.

Guyton, A.C., Hall, J.E. Tratado de fisiologia médica, 12<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Harcourt, B.E., Penfold, S.A., Forbes, J.M. Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation Nat Rev Endocrinol, vol.9, no. 2, pp. 113-23, 2013.

Hartman, L.; Lago, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. London, Laboratory Practice, 22, 475-481, 1973.

Hasegawa T, Okuda M, Makino M, Hiromatsu K, Nomoto K, Yoshikai Y.. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. Int J Immunopharmacol. Jun;17(6):505-12, 1995.

Hasegawa, T., Kimura, Y., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Yamada, A., Makino, M., Okuda, M., Sano, T., Nomoto, K., Yoshikai, Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. Immunopharmacology, 35:273-282, 1997.

Hasegawa, T., Noda, K. Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., Yoshikai, Y. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. J. Immunopharmacol., 22: 877-885, 2000.

Hauser SP, Kajkenova O, Lipschitz DA. The Pivotal Role of Interleukin 6 in Formation and Function of Hematopoietically Active Murine Long-Term Bone Marrow Cultures Stem Cells 15, 125-132, 1997.

Haynes, W.G., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L., Sivitz, W.I. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. J. Clin. Invest. 100:270-278, 1997.

Hick, R.W. *et al.* Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. J Immunol 177:169-176, 2006.

Hilgers J., van Nie R., Ivanyi D., Hilkens J., Michalides R., de Moes J., Poort-Keesom R., Kroezen V., von Deimling O., Kominami R., and Holmes R. Genetic differences in BALB/c sublines. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 122, 19-30, 1985.

- Hirose, H., Saito, I., Kawai, T., Nakamura, K., Maruyama, H., Saruta, T. Serum leptin level: possible association with haematopoiesis in adolescents, adolescents, independent of body mass index and serum insulin. *Clinical Science*, v.94, p.633-636, 1998.
- Hirosumi, J. Tuncman, G. Chang, L. Gorgun, C. Z. Uysal, K. T. Maeda, K. et al., A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, vol.420, no. 6913, pp. 333-6, 2002.
- Hoffbrand, A.V. Moss, P.A.H., Pettit, J.E. *Essential Haematology*, 5<sup>a</sup> ed, Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- Hoffler, U., Hobbie, K., Wilson, R., Bai, R., Rahman, A., Malarkey, D., Travlos, G., Ghanayem, B.I. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine*.v.36, Oct, n.2, p.311-25, 2009.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* v.95, n.5, p. 2409-2415, 1995.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance, *Science* vol.271, no. 5249, pp. 665-8, 1996.
- Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, vol.444, no. 7121, pp. 860-7, 2006.
- Howard, B.V.. Ruotolo, G., Robbins, D. C. "Obesity and dyslipidemia", *Endocrinol Metab Clin North Am*, vol.32, no. 4, pp. 855-67, 2003.
- Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G. *et al.* Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice. *J. Clin. Invest.* 104:1051-1059, 1999.
- Ikebuchi K, Ihle JN, Hirai Y, Wong GG, Clark SC, Ogawa M. Synergistic factors for stem cell proliferation: further studies of the target stem cells and the mechanism of stimulation by interleukin-1, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 72: 2007-14, 1988.
- Jacobsen FW, Rothe M, Rusten L, Goeddel DV, Smeland EB, Veiby OP, Slørdal L, Jacobsen SE. Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 25;91(22):10695-9, 1994.

Jeong, H.J., Kwon, H.J., Kim, M.K. Hypoglycemic effect of *Chlorella vulgaris* intake in type 2 diabetic Goto-Kakizaki and normal Wistar rats. *Nutrition Research and Practice* v.3, n.1, p.23-30, 2009.

Jin, Y., Dons, L., Kristensson, K., Rottenberg, M.E. Colony-stimulating factor 1-dependent cells protect mice against systemic infection with *Listeria monocytogenes* but facilitate neuroinvasion. *Infect Immun* v.70, p.4682-6, 2002.

Jong-Yuh C., Mei-Fen, S. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice *Life Sci*, vol.77, no. 9, pp. 980-90, 2005.

Justo, G.Z., Silva, M.R., Queiroz, M.L.S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 23(1), 119-132, 2001.

Kahn, CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 27:1893-1902, 1978.

Kay, R. A. Microalgae as food and supplement *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol.30, no. 6, pp. 555-73, 1991.

Kelley, D.E. Sugars and starch in the nutritional management of diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* v.78, p.858S-64S, 2003.

Kern, P.A., Saghizadeh, M., Ong, J.M., Bosch, R.J., Deem, R., Simsolo, R.B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* v.95, p.2111-9, 1995.

Kerr, M.G. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2003.

Kobashi C, Asamizu S, Ishiki M, Iwata M, Usui I, Yamazaki K, Tobe K, Kobayashi M, Urakaze M. Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J Inflamm (Lond)*. 2009 Aug 27;6:25. doi: 10.1186/1476-9255-6-25.

Konishi, F. Tanaka, K. Himeno, K. Taniguchi, K., Nomoto, K. Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes *Cancer Immunol Immunother*, vol.19, no. 2, pp. 73-8, 1985.

- Konopleva, M., Mikhail, A., Estrov, Z., Zhao, S., Harris, D., Sanchezwilliams, G., Kornblau, S.M., Dong, J., Kliche, K., Jiang, S., Snodgrass, H.R, Estey, E.H., Andreeff, M. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood*, v.93, n.5, p.1668-1676, 1999.
- La Cava, A., Alviggi, C., Matarese, G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J. Mol. Med. (Berl)*, Jan v.82, n.1, p.4-11, 2003.
- La Cava, A., Matarese, G. The weight of leptin in immunity. *Nature Rev. Immunol.* 4, 371–9, 2004.
- Lee, H.S., Park, H.J., Kim, M.K. Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. *Nutrition Research and Practice*, v. 2, n.4, p. 204-210, 2008.
- Lee, H.S., Kim, M.K. Effect of *Chlorella vulgaris* on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet. *Journal of medicine food*, v. 12, n.5, p. 1029-1037, 2009.
- Lee SH, Min KH, Han JS, et al. "Effects of brown alga, *Ecklonia cava* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus," *Food Chem Toxicol*, vol. 50, no. 3-4, pp. 575-582, 2012.
- Leite AC, Araujo TG, de Melo Carvalho B, Maia MB, de Menezes Lima VL. "Characterization of the Antidiabetic Role of *Parkinsonia aculeata* (Caesalpineaceae)," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2011.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. *Princípios de bioquímica*, 2ª ed, São Paulo: Sarvier, 1998.
- Li, W.M., Huang, W.Q., Huang, H.Y., Jiamg, D.Z., Wang, Q. R. Positive and negative haematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. *Cytokine*, v. 12 (7), p. 1017-1023, 2000.
- Libregts SF, Gutiérrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, Ozgür Z, Philipsen S, Nolte MA. Chronic IFN- $\gamma$  production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood*. Sep 1;118(9):2578-88, 2011.
- Lopes, H.F. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. *Rev. Bras. Hipertens.* v.14, n.4, p.239-244, 2007.

Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901, 1998.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* Jan;117(1):175-84, 2007.

Marx, C., Ehrhart-Bornstein, M., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R. Regulation of adrenocortical function by cytokines – relevance for immune-endocrine interaction. *Horm. Metab. Res.* 30, 416-420, 1998.

Matarese, G. e La Cava, A. The intricate between immune system and metabolism. *Trends Immunol.*, Apr v. 25, n.4, p.193-200, 2004.

Mehran, A. E. Templeman, N. M. Brigidi, G. S. Lim, G. E. Chu, K. Y. Hu, X. et al., Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production *Cell Metab*, vol.16, no. 6, pp. 723-37, 2012.

Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111:485-491, 2008.

Meyer, D.J., Coles, E.H., Rich, L.J. *Medicina de Laboratório Veterinária*. São Paulo: Roca, 1995.

Mikhail, A.A., Beck, E.X., Shafer, A., Barut, B., Gbur, J.S., Zupancic, T.J., Schweitzer, A.C., Cioffi, J.A., Lacaud, G., Ouyang, B., Keller, G., Snodgrass, H.R. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood*, v. 89, n.5, p.1507-1512, 1997.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci.* Jan 14;29(2):359-70, 2009.

Miyan, J.A., Broome, C.S., Afan, A.M. Coordinated host defense through an integration of the neural, immune and hemopoietic systems. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 297-304, 1998.

Mizoguchi, T., Takehara, I., Masuzawa, T., Saito, T., Naoki, Y. Nutriogenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *Journal of Medicinal Food*, 11(3): 395-404, 2008.

Mizrahi K, Stein J, Yaniv I, Kaplan O, Askenasy N. TNF- $\alpha$  has tropic rather than apoptotic activity in human hematopoietic progenitors: involvement of TNF receptor-1 and caspase-8. *Stem cells* 31:156–166, 2013.

Mohamed-Ali, V., Goodrick, S. *et al.* Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* v.82, n.12, p.4196-4200, 1997.

Moresi R, Tesei S, Costarelli L, Viticchi C, Stecconi R, Bernardini G, Provinciali M. Age- and gender-related alterations of the number and clonogenic capacity of circulating CD34+ progenitor cells. *Biogerontology*. 6(3):185-92, 2005.

Morris, H.J., Carrillo, O.V., Alonso, M.E., Bermúdez, R.C., Almarales, A., Llauradó, G., Lebeque, Y., Fontaine, R. Oral Administration of an Enzymatic Protein Hydrolysate from the Green Microalga *Chlorella vulgaris* Enhances the Nutritional Recovery of Malnourished Mice. *J Med Food* v.14, n.12, p.1583–1589, 2011.

Muench MO, Schneider JG, Moore MA. Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 beta, IL-6 and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Exp Hematol* 20: 339-49, 1992.

Mullarky IK, Szaba FM, Kummer LW, Wilhelm LB, Parent MA, Johnson LL, Smiley ST. Gamma interferon suppresses erythropoiesis via interleukin-15. *Infect Immun*. May;75(5):2630-3, 2007.

Munzberg, H., Myers, M.G. Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8:566-570, 2005.

Narayan KM, Gregg EW, Fagot-Campagna A, Engelgau MM, Vinicor F. "Diabetes--a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem," *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 50 Suppl 2, pp. S77-84, 2000.

Okudo, M., Hasegawa, T., Sonoda, M. Okabe, T., Tanaka, M. The effects of *Chlorella* on the level of cholesterol in serum and liver. Jap. J. Nutrition, n.33, p. 3-8, 1975.

Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. Science, v.313, p.1137-1140, 2006.

Panahi Y, Tavana S, Sahebkar A, Masoudi H, Madanchi N. "Impact of Adjunctive Therapy with *Chlorella vulgaris* Extract on Antioxidant Status, Pulmonary Function, and Clinical Symptoms of Patients with Obstructive Pulmonary Diseases," Sci Pharm, vol. 80, no. 3, pp. 719-730, 2012.

Paracchini, V., Pedotti, P., Taioli, E. Genetics of leptin and obesity: a huge review. American Journal of Epidemiology 162(2):101-114, 2005.

Pariante, C.M., Orrú, M.G., Baita, A., Farci, M.G., Carpinello, B. Treatment with interferon-alpha in patients with chronic hepatitis and mood anxiety disorders. Lancet, v. 354 (9173), p. 131-132, 1999.

Patt, M.E., Kahn, C.R. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. J. Basic Clin Physiol Pharmacol v.9,p.89-109, 1998.

Pessin, J.E., Saltiel, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest 106:165-169, 2000.

Pickup, J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Diabetes Care v.27, n.3, p.813-823, 2004.

Pinheiro, A.R.O., Freitas, S.F.T., Corso, A.C. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. Revista de Nutrição 17(4):523-533, 2004.

Pitombo C, Araújo EP, De Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. J Endocrinol. 191(3):699-706, 2006.

Queiroz, M.L.S, Bincoletto, C., Valadares, M.C., Dantas, D.C.M., Santos, L.M.B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. Immunopharmacol. Immunotoxicol., 24:483-496, 2002.

Queiroz, M.L.S., Rodrigues, A.P.O., Bincoletto, C. Figueiredo, C.A.V., Malacrida, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. Int. Immunopharmacol., 3: 889-900, 2003a.

Queiroz, J.S., Queiroz, M.L.S., Justo, G.Z. Myelopoietic response in mice exposed to acute cold/restraint stress: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. Neuropharmacol., submetido, 2003.

Queiroz, M.L.S., Torello, C.O., Perhs, S.M.C., Rocha, M.C., Bechara, E.J.H., Morgano, M.A., Valadares, M.C., Rodrigues, A.P.O., Ramos, A.L. *Chlorella vulgaris* up-modulation of myelosuppression induced by lead: The role of stromal cells Food and chemical toxicology, v. 46, p. 3147-3154, 2008.

Queiroz, M.L.S., Torello, C.O., Constantino, A.T., Ramos, A.L., de Souza Queiroz, J. *Angelica sinensis* Modulates Immunohematopoietic Response and Increases Survival of Mice Infected with *Listeria monocytogenes*. Journal of Medicinal Food, v. 13, p. 1451-1459, 2010.

Queiroz, M.L.S.; Rocha, M.C.; Torello, C.O.; Souza-Queiroz, J.; Bincoletto, C.; Morgano, M.A.; Romano, M.R.; Paredes-Gamero, E.J.; Barbosa, C.M.V.; Calgarotto, A.K. *Chlorella vulgaris* restores bone marrow cellularity and cytokine production in lead-exposed mice. Food and Chemical Toxicology v.49, p.2934–2941, 2011.

Radmann, E.M., Costa, J.A.V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. Quim. Nova, v., 31, n.7, p. 1609-1612, 2008.

Ramos, A.L. Atividade imunomoduladora da alga *Chlorella vulgaris* em camundongos portadores de tumores ascítico de Ehrlich. Tese de doutorado em Farmacologia pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 2008, 98p.

Ramos, A.L., Torello, C.O., Queiroz, M.L.S. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. Nutrition and Cancer (Online), v. 62, p. 1170-1180, 2010.

Ranges, S.M.K. Plants as source of drugs. Toxicon v.39, p.603-13, 2001.

Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 2001;322:1536–8.

Rodriguez MC, Bernad A, Aracil M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood* 103: 3349- 54, 2004.

Rodríguez-López, M., López-Quijada, C. Plasma-glucose and plasma-insulin in normal and alloxanized rats treated with *Chlorella*. *Life Sci*, v.10, p. 57-60, 1971.

Rodriguez-Garcia, I., Guil-Guerrero, J.L. Evaluation of the antioxidant activity of the three microalga species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. , v. 108, p. 1023-1026, 2008.

Romero, C.E.M., Zanesco, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Revista de Nutrição* 19(1):85-91, 2006.

Saad, M.J., Carvalho, C.R., Thirone, A.C., Velloso, L.A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem*. v.271, Sep 6, n.36, p.22100-4, 1996.

Saltiel, A.R., Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* v.414, n.6865, p.799-806, 2001.

Saltiel A. R., Pessin, J. E. Insulin signaling pathways in time and space *Trends Cell Biol*, vol.12, no. 2, pp. 65-71, 2002.

Sano, T., Kumamoto, Y., Kamiya, N., Okuda, M., Tanaka, Y. Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. *Artery* 15:217-224, 1988.

Sato T, Selleri C, Young NS, Maciejewski JP. Hematopoietic inhibition by interferon-gamma is partially mediated through interferon regulatory factor-1. *Blood*. Nov 1;86(9):3373-80, 1995.

Scupoli MT, Donadelli M, Cioffi F, Rossi M, Perbellini O, Malpeli G, Corbioli S, Vinante F, Krampera M, Palmieri M, Scarpa A, Ariola C, Foà R, Pizzolo G. Bone marrow stromal cells and the upregulation of interleukin-8 production in human T-cell acute lymphoblastic

leukemia through the CXCL12/CXCR4 axis and the NF-kappaB and JNK/AP-1 pathways. *Haematologica*. Apr;93(4):524-32, 2008.

Seidell, J.C. Obesity and weight control: the evidence *Proc Nutr Soc*, vol.59, no. 3, pp. 419-20, 2000.

Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, Young NS. Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood*. May 15;87(10):4149-57, 1996.

Senthilkumar, T. Sangeetha, N., Ashokkumar, N. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and renoprotective effects of *Chlorella pyrenoidosa* in diabetic rats exposed to cadmium *Toxicol Mech Methods*, vol.22, no. 8, pp. 617-24, 2012.

Schaffer, A., Scholmerich, J., Salberger, B. Adipose tissue as an immunological organ: toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol.*, v.28, p.393-399, 2007.

Shibata, S., Oda, K., Onodera-Masuoka, N., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, F., Iwabuchi, A., Sansawa, H. Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella regularis* in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitamin* 47:327-377, 2001.

Shoelson, S.E., Lee, S. *et al.* Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* v.116, n.7, p.1793-1801, 2006.

Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C. *et al.* Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686, 1998.

Simopoulos AP. "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids," *Biomed Pharmacother*, vol. 56, no. 8, pp. 365-379, 2002.

Singh, A. Sharma, L., Mallick, N. Antioxidative role of nitric oxide on copper toxicity to a chlorophycean alga, *Chlorella* *Ecotoxicol Environ Saf*, vol.59, no. 2, pp. 223-7, 2004.

Singbrant Söderberg, S., Karlsson, G., Karlsson, S. Complex and Context Dependent Regulation of Hematopoiesis by TGF- $\beta$  Superfamily Signaling. *Hematopoietic Stem Cells VII: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1176: 55–69, 2009.

Spooner, E., Eliason, J., Dexter, T.M. Long-term mouse bone marrow cultures. Em: Haemopoiesis: A practical approach. Testa, N.G. e Molineux, G. (eds.), Oxford University Press, New York, pp 56-73, 1993.

Solinas G., Karin, M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction FASEB J, vol.24, no. 8, pp. 2596-611, 2010.

Souza-Queiroz, J., Malacrida, S.A., Justo, G.Z, Queiroz, M.L.S. Myelopoietic response in mice exposed to acute/cold restraint stress: Modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. Immunopharmacol and Immunotoxicol, v. 26, p. 455-467, 2004.

Souza-Queiroz, J., Torello, C.O, Palermo-Neto, J., Valadares, M.C., Queiroz, M.L.S. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with *Listeria monocytogenes*: Modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. Brain Behav and Immun, v. 20, p. 1056-1065, 2008.

Souza-Queiroz, J.S.; Rocha, M.C.; Barbosa, C.M.V.; da Rocha, M.C., Bincoletto, C., Queiroz, M.L.S., Paredes-Gamero, E.J., Palermo Neto, J. *Chlorella vulgaris* treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis. Brain, Behavior, and Immunity, v. 29, p. 39-50, 2013.

Straub, R.H., Hense, H.W., Andus, T., Scholmerich, J., Riegger, G.A., Schunkert, H. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukine-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. J. Clin. Endocrinol. Metab. v.85, p. 1340-4, 2000.

Stumvoll, M., Goldstein, B.J., van Haefen, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy Lancet, vol.365, no. 9467, pp. 1333-46, 2005.

Tanaka, K., Koga, T., Konishi, F., Nakamura, M., Mitsuyama, K., Namoto, K. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. Infect. Immun., 53: 267-271, 1986.

Tanaka, K. Yamada, A. Noda, K. Hasegawa, T. Okuda, M. Shoyama, Y. et al., A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotentiality Cancer Immunology, Immunotherapy, vol.45, no. 6, pp. 313-320, 1998.

Towbin, H., Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. v.76, Sep, n.9, p.4350-4, 1979.

Umemoto, Y. et. al. Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. Blood 90:3438-3443, 1997.

Van Den Engh, G.J., Bol, S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. Cell Tissue Kinet. 8:579-587, 1975.

Vijayavel, K., Anbuselvan, C., Balasubramanin, M.P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. Mol Cell Biochem, v. 303 (1-2), p. 39-44, 2007.

Visscher, T.L., Seidell, J.C. The public health impact of obesity Annu Rev Public Health, vol.22, no. pp. 355-75, 2001.

Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. Cell 133, 693-703, May 16, 2008.

Wang Z, Wang J, Chan P. "Treating Type 2 Diabetes Mellitus with Traditional Chinese and Indian Medicinal Herbs," Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, p. 17, 2013.

Weisberg, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J. Clin. Invest. 116, 115-24, 2006.

Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress and diabetes. J. Clin. Invest. v.115, p.1111-1119, 2005.

White, M.F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. Mol. Cell Biochem. v.182, p.3-11, 1998.

WHO. Obesity and overweight. Fact Sheet; 311:[Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 2012.

Wilding, J.P.H. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes Diabet Med v.24, p.934-945, 2007.

Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. J Clin Invest. 115: 951-8, 2005.

Yamazaki, N.S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H., aHiromitsu. TGF- $\beta$  as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. Blood 113: 1250-1256, 2009.

Zenebone, O.; Pascuet, N.S. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4.ed. Brasília: Ministério da Saúde/ANVISA; São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

Zhang, Y Harada, A Bluethmann, H Wang, JB Nakao, S Mukaida N, Matsushima, K. Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro. Blood 86: 2930-2937, 1995.



## **8- ANEXOS**



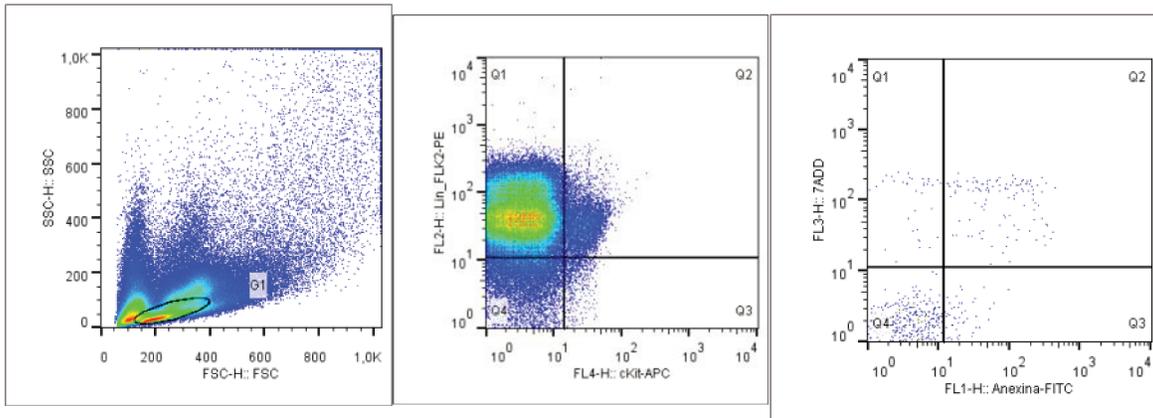
## ANEXO I

**Tabela 10**– Quantificação e valores nutricionais das substâncias componentes da dieta normal e hiperlipídica.

	RAÇÃO NORMAL (g/Kg)	Kcal/Kg	DIETA HIPERLIPÍDICA (g/Kg)	Kcal/Kg
Amido de milho (QSP)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	–	–	312	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	–	50	–
Mistura/Minerais	35	–	35	–
Mistura/Vitaminas	10	–	10	–
L-cistina	3	–	3	–
Colina	2,5	–	2,5	–
Total	1000	3948	1000	5358



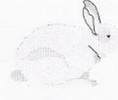
## ANEXO II



**Figura 28-** Definição do *gate* para determinar a presença de apoptose inicial e tardia, e viabilidade de células (Lin<sup>-</sup>FLK<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup>) da medula óssea de camundongos Balb/C sem tratamento ou tratados com CV e recebendo dieta normal ou hiperlipídica.



## ANEXO III



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

#### CERTIFICADO

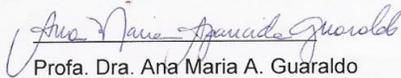
Certificamos que o Protocolo nº **1987-1**, sobre "**Efeito modulador da *Chlorella vulgaris* sobre a hematopoese e sinalização da insulina em animais obesos**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz / Juliana Falcato Vecina**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **05 de outubro de 2009**.

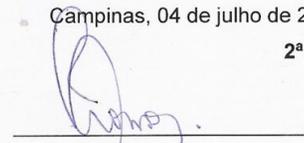
#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1987-1**, entitled "**Modulation by *Chlorella vulgaris* of hematopoiesis and insulin signaling in obese animals**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **October 5, 2009**.

Campinas, 04 de julho de 2011.

2ª. VIA

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



## ANEXO IV

Participações em eventos científicos com apresentação de pôster referente ao projeto realizado:

- Participação na IV Semana da Pesquisa da FCM realizada em maio de 2010 em Campinas na forma de pôster: “Atividade moduladora da alga *Chlorella vulgaris* sobre a hematopoese e a produção de citocinas de animais expostos ao chumbo”.
- Participação no 29º congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia – Endócrino 2010 – realizado de 04 a 07 de setembro de 2010 em Gramado-RS na qualidade de ouvinte e na apresentação sob forma de pôster: “Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a glicemia e mielossupressão observada em animais obesos”.
- Participação na V Semana da Pesquisa da FCM realizada de 09 a 12 de maio de 2011 em Campinas na forma de pôster: “*Chlorella vulgaris prevents insulin resistance in mice fed with high-fat diet*”.
- Participação na V Semana da Pesquisa da FCM realizada de 09 a 12 de maio de 2011 em Campinas na forma de pôster: “Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a glicemia e mielossupressão observada em animais obesos”.
- Participação no XV Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica (CBOSM) realizado de 30 de maio a 01 de junho de 2013 em Curitiba na forma de pôster: “*Chlorella vulgaris* previne a resistência à insulina em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica” e “*Chlorella vulgaris* previne a mielossupressão observada em animais submetidos a diferentes períodos de dieta hiperlipídica”.

- Participação no ENDO 2013 (The Endocrino Society's 95<sup>th</sup> Annual Meeting & Expo) realizado de 15 a 18 de junho de 2013 em San Francisco (CA – EUA) na forma de pôster: “*Chlorella vulgaris* improves insulin signaling in tissues of diet-induced obesity mice”.
- Participação do Prêmio Pemberton Coca-Cola com o trabalho intitulado: “*Chlorella vulgaris* previne a resistência insulina induzida por dieta hiperlipídica em camundongos”.

## ANEXO V

Carta de Submissão do artigo (07 de junho de 2013):

Dear Dr. Julina Falcato Vecina,

I am writing to let you know that your Research Article titled "Chlorella vulgaris prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice," by Julina Falcato Vecina, Alexandre Gabarra Oliveira, Tiago Gomes Araújo, Sueli Regina Baggio, Mario Jose Abdalla Saad and Mary Luci de Souza Queiroz has been submitted to Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine by Mary Luci de Souza Queiroz and it has been assigned the manuscript number 375791.

You will be receiving a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the Manuscript Tracking System.

In order to view the status of your manuscript, we have created an account for you in the journal's Manuscript Tracking System at <http://mts.hindawi.com/>, which you may access after resetting your password using the link below:

<http://mts.hindawi.com/reset.password/8b8ae518-3078-445f-a3e9-74aceef72c91/>

Please feel free to contact me with any inquiries you may have.

Best regards,

Doaa Salah  
Editorial Office  
Hindawi Publishing Corporation  
<http://www.hindawi.com>



## ANEXO VI



### GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: **CQ 2590/2013**

MATERIAL: **Chlorella ( LOTE: E1848 7035JP )**

INTERESSADO: **Mary Luci de Souza Queiroz**

ENDEREÇO: **Rua Carlos Chagas, 480 - Hemocentro - Campinas - SP**

DATA DE RECEBIMENTO DA AMOSTRA: **10/04/2013**

DATA DA EMISSÃO DO RELATÓRIO: **02/05/2013**

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): **FÍSICO-QUÍMICA**

RESPONSÁVEL(EIS): **E. S. B. Parra, M. G. da Silva, P. R. N. Carvalho, A. S. de Souza, M. T. B. Pacheco, V. S. N. Silva, M. A. Morgano**

#### 1. MÉTODO(S)

##### **Triptofano**

MA-CQ.098 baseado em:

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemists*, v.39, p.1412-1415, 1967.

##### **Vitamina B6 - Piridoxina**

MA-CQ.038 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 45, met. 961.15, p. 67-69.

GREGORY, J.F.; KIRK, J.R. Assessment of storage effects on vitamin B6 stability and bioavailability in dehydrated food systems. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 43, p. 1801-09, 1978.

##### **Beta-caroteno**

MA-CQ.325 baseado em:

CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, Wiesbaden, v. 33, p. 133-37, 1992.

##### **Vitamina E**

MA-CQ.034 baseado em:

BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. Methods for the determination of vitamins in food - recommended by COST 91. New York: Elsevier, 1985. p.97-106.

##### **Vitamina B1 - Tiamina**

MA-CQ.036 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 45, met. 942.23, p. 11-13.

VAN DE WEERDHOFF, T.; WIERSUN, M.L.; REISSENWEBWEBER, H.. Application of liquid chromatography in food analysis. *Journal Chromatography*, Amsterdam, v. 83, p. 455-60, 1973.

##### **Vitamina B2 - Riboflavina**

MA-CQ.037 baseado em:



CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS  
Av. Brasil, 2880 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil  
Tel. 19 3743-1781/1810/1786 • Fax 19 3242-4585  
email: ccqa@ital.sp.gov.br  
<http://www.ital.sp.gov.br>





## GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 45, met. 970.65, p. 14-16.

VAN DE WEERDHOFF, T.; WIERSUN, M.L.; REISSENWEBWEBER, H. Application of liquid chromatography in food analysis. Journal Chromatography, Amsterdam, v. 83, p. 455-60, 1973.

### **Carotenóides totais expressos como beta-caroteno**

MA-CQ.046 baseado em:

CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography. Chromatographia, Wiesbaden, v. 33, p. 133-37, 1992.

### **Fibra alimentar insolúvel**

MA-CQ.029 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 32, met. 991.43, p. 7-10.

PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fibers in foods and food products. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, v.75, n.2; p.360-367, 1992.

### **Fibra alimentar solúvel**

MA-CQ.029 baseado em:

HORWITZ, W.; LATIMER JR., GEORGE W. (Ed.). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 32, met. 991.43, p. 7-10.

PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fibers in foods and food products. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, v.75, n.2; p.360-367, 1992.

### **Ácido ascórbico**

MA-CQ.087 baseado em:

ARAKAWA, N.; OTSUKA, M.; KURATA, T.; INAGKI, C. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high-performance liquid chromatography. Journal Nutritional Science Vitaminology, Japan, v. 27, p. 1-7, 1981.

### **Aminoácidos totais**

MA-CQ. 324 baseado em:

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters Pico-Tag System for the aminoacids analysis of food materials. Journal of Automatic Chemistry 8(4): 170-177, Oct-Dec., 1986

HAGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre-column Phenylisothiocyanate derivatization and Liquid-Chromatography of Aminoacids in Food. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 72(6): 912-916, Nov.-Dec., 1989.

### **Mercúrio, Arsênio, Cálcio, Cádmiio, Chumbo, Cobre, Ferro, Fósforo, Magnésio, Manganês, Potássio, Sódio, Zinco**

MA-CQ.188 baseado em:

Relatório de Ensaio CQ 2590/2013

2/4

MF