



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

**FOSFATIDILCOLINA EM ADIPÓCITOS EPIDIDIMIAIS
ISOLADOS DE RATOS – ESTUDO IN VITRO.**

Caren Fernanda Navarro da Fonseca

Campinas, 2009

**FOSFATIDILCOLINA EM ADIPÓCITOS EPIDIDIMIAIS
ISOLADOS DE RATOS – ESTUDO IN VITRO.**

Caren Fernanda Navarro da Fonseca

Orientador: Dr. Celio Kenji Miyasaka

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição . Área de Nutrição Experimental.

**Campinas, SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F733f Fonseca, Caren Fernanda Navarro da
Fosfatidilcolina em adipócitos epididimais isolados de
ratos - Estudo in vitro / Caren Fernanda Navarro da
Fonseca. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Celio Kenji Miyasaka
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Gordura. 2. Fosfatidilcolina. 3. Adipócitos.
4. Determinação do glicerol. I. Miyasaka, Célio
Kenji. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Phosphatidylcholine adipocyte epididymis alone in the rats
- Study in vitro

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fat, Phosphatidylcholine,
Adipocytes, Glycerol determination.

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de
Alimentos

Título: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Celio Kenji Miyasaka
Maria Rita Marques de Oliveira
Miguel Arcanjo Áreas

Data de defesa: 27/02/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição.

FOSFATIDILCOLINA EM ADIPÓCITOS EPIDIDIMIAIS ISOLADOS DE RATOS – ESTUDO IN VITRO.

Caren Fernanda Navarro da Fonseca

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
Orientador/FEA-UNICAMP

Prof. Dra. Maria Rita Marques de Oliveira
Membro

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas
Membro

Prof. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Prof. Dra. Elisangela Farias Silva

Campinas, 27 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

**Aos meus queridos pais, Marli e Jurandir Navarro;
E meu marido Roney Fonseca.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS.

Aos amigos Elisangela, Danilo Crege, Maria Inês, e Michele pela presteza e atenção com que me ajudaram nas análises.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pelos momentos de descontração e apoio técnico, durante a execução dos ensaios biológicos.

Aos professores do Departamento de alimentos e Nutrição (DEPAN) e a Universidade Católica de Campinas (PUCC), cujos cursos foram muito valiosos para minha formação.

Aos meus pais e familiares, que torcem por mim em todos os instantes.

Ao meu orientador, Professor Celio Kenji Miyasaka, pelo carinho com que me recebeu, me acompanhou e me ajudou durante todo o Mestrado, pela orientação sempre voltada para a abordagem dos processos de maneira integrada e pelo estímulo para que eu desenvolvesse esse trabalho com liberdade.

E finalmente, a Roney José da Fonseca, que paciente e carinhosamente, me ajudou na formalização deste trabalho.

RESUMO

A Fosfatidilcolina (PC) exerce vários efeitos no organismo humano. Este fosfolípido é encontrado em abundância nas membranas celulares e, juntamente com a fosfatidiletanolamina, somam mais de 75% do total de fosfolípidos presentes nestas. A PC vem sendo utilizada em clínicas dermatológicas, de estética e emagrecimento, pois, parece ser eficaz para eliminar gordura localizada, em especial no abdome, quadril, joelhos, pescoço e pálpebras inferiores. Este trabalho teve por objetivo, estudar os efeitos da PC solubilizada em diferentes compostos (deoxicolato de sódio, etanol, detergente Tween[®] 80 e albumina) sobre os adipócitos epididimais isolados de ratos machos da linhagem Wistar. Atualmente, não há estudos científicos conclusivos liberando o seu uso farmacológico e, portanto, há a necessidade de mais pesquisas que definam seus mecanismos de ação. Para atingirmos o objetivo proposto, utilizou-se o método de isolamento e contagem dos adipócitos e também a determinação do glicerol no meio de incubação. Sendo assim, o tratamento que obteve maior quantidade de

glicerol produzido foi o Tween® 80 e Tween® 80 + PC no tempo de incubação de 15 minutos e o DS + PC no tempo de incubação de 30 minutos.

Palavras chave: Gordura, Fosfatidilcolina, Adipócitos, Estudo Experimental, determinação do glicerol.

ABSTRACT

The phosphatidylcholine (PC) has several effects on the human body. This phospholipid is found in abundance in cell membranes and, together with phosphatidylethanolamine, up over 75% of total phospholipids present in these. The PC has been used in clinical dermatology, weight loss of aesthetics and therefore appears to be effective for removing localized fat, especially in the abdomen, hips, knees, neck and lower eyelids. This work was aimed at, to study the effects of PC solubilized in different compounds (sodium deoxycholate, ethanol, Tween ® 80 detergent and albumin) on adipocytes isolated epididymis of male rats of Wistar strain. Currently, there is no conclusive scientific studies drug releasing its use and therefore there is a need for more research to define its mechanisms of action. To achieve the proposed objective, we used the method of isolation and counting of adipocytes and the determination of glycerol in the middle of incubation. Thus, the treatment they received higher amount of glycerol produced was the Tween ® 80 and Tween ® 80 + PC in the incubation period of 15 minutes and DS + PC in the incubation time of 30 minutes.

Keywords: Fat, phosphatidylcholine, adipocytes, Experimental Study, determination of glycerol.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01 – ANIMAIS CRIADOS EM GAIOLAS INDIVIDUAIS.....	27
FIGURA 02 – EM DETALHE O ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS.	28
FIGURA 03 – REMOÇÃO DO EPIDÍDIMO.....	28
FIGURA 04 – FILTRAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR ATRAVÉS DE MALHA DE NYLON.	30
FIGURA 05 – AGITAÇÃO DOS TUBOS EM BANHO MARIA.....	32
FIGURA 06 – AMOSTRAS MANTIDAS EM GELO PARA POSTERIOR OBSERVAÇÃO EM MICROSCÓPIO.	32
FIGURA 07–CÂMARA DE MALASSEZ CONTENDO ADIPÓCITOS ISOLADOS PARA REALIZAÇÃO DE CONTAGEM (TRATAMENTO DE ETANOL – 15 MINUTOS). IMAGEM OBTIDA EM MICRÓSCOPIO ÓPTICO EM AUMENTO DE 50 VEZES.....	33
FIGURA 08–CÂMARA DE MALASSEZ CONTENDO ADIPÓCITOS ISOLADOS PARA REALIZAÇÃO DE CONTAGEM (TRATAMENTO DE DS + PC (0,05G DE DS, 0,95 ML DE KR E 0,05G DE PC) – 30 MINUTOS). IMAGEM OBTIDA EM MICRÓSCOPIO ÓPTICO EM AUMENTO DE 50 VEZES.	34
FIGURA 09 – EQUIPAMENTO UTILIZADO NA LEITURA DAS AMOSTRAS – ESPECTROFOTÔMETRO.....	35
FIGURA 10 – GLICEROL (MMOL) LIBERADO POR ADIPÓCITOS EPIDIDIMIAIS ISOLADOS DE RATOS. OS ADIPÓCITOS FORAM INCUBADOS DURANTE 15 MINUTOS COM DEOXCICOLATO DE SÓDIO (DS); DS + FOSFATIDILCOLINA (PC); ETANOL; ETANOL + PC; TWEEN [®] 80; TWEEN [®] 80 + PC; ALBUMINA E	

ALBUMINA + PC (* DIFERENTE ESTATÍSTICAMENTE EM RELAÇÃO AO BASAL).	38
FIGURA 11 – GLICEROL (MMOL) LIBERADO POR ADIPÓCITOS EPIDIDIMAIIS ISOLADOS DE RATOS. OS ADIPÓCITOS FORAM INCUBADOS DURANTE 30 MINUTOS COM DEOXICOLATO DE SÓDIO (DS); DS + FOSFATIDILCOLINA (PC); ETANOL; ETANOL + PC; TWEEN® 80; TWEEN® 80 + PC; ALBUMINA E ALBUMINA + PC (* DIFERENTE ESTATÍSTICAMENTE EM RELAÇÃO AO BASAL).	40
FIGURA 12 – GLICEROL (MMOL) LIBERADO POR ADIPÓCITOS EPIDIDIMAIIS ISOLADOS DE RATOS. OS ADIPÓCITOS FORAM INCUBADOS DURANTE 60 MINUTOS COM DEOXICOLATO DE SÓDIO (DS); DS + FOSFATIDILCOLINA (PC); ETANOL; ETANOL + PC; TWEEN® 80; TWEEN® 80 + PC; ALBUMINA E ALBUMINA + PC.	42
FIGURA 13 – CONTAGEM DE CÉLULAS NÃO CORADAS (GELO / BASAL 15, 30 E 60 MINUTOS).	43
FIGURA 14 – CONTAGEM DE CÉLULAS NÃO CORADAS (DS / DS + PC NOS TEMPOS 15, 30 E 60 MINUTOS).....	44
FIGURA 15 – CONTAGEM DE CÉLULAS NÃO CORADAS (ETANOL / ETANOL + PC NOS TEMPOS 15, 30 E 60 MINUTOS).	45
FIGURA 16 – CONTAGEM DE NÃO CORADAS (TWEEN / TWEEN + PC NOS TEMPOS 15, 30 E 60 MINUTOS).....	46
FIGURA 17 – CONTAGEM DE CÉLULAS NÃO CORADAS (ALBUMINA / ALBUMINA + PC NOS TEMPOS 15, 30 E 60 MINUTOS).	47

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 – CLASSIFICAÇÃO DE SOBREPESO E DA OBESIDADE BASEADO IMC, ONDE O IMC= PESO / (ALTURA) ²	3
TABELA 02 – GLICEROL (MMOL) LIBERADO EM MEIO DE INCUBAÇÃO DE 15 MINUTOS E VALORES DE P (TESTE T DE STUDENT).....	38
TABELA 03 – GLICEROL (MMOL) LIBERADO EM MEIO DE INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS E VALORES DE P (TESTE T DE STUDENT).....	39
TABELA 04 – GLICEROL (MMOL) LIBERADO EM MEIO DE INCUBAÇÃO DE 60 MINUTOS E VALORES DE P (TESTE T DE STUDENT).....	41
TABELA 05 – VALORES DE P (TESTE T DE STUDENT) PARA O TRATAMENTO BASAL	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

DS	Deoxicolato de sódio
PC	Fosfatidilcolina
g	Gramas
KRB	Krebs Ringer Bicarbonato
KR-HEPES	Krebs Ringer Hepes
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µmol	Micromol
mg	Miligramas
mL	Mililitros
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

Página

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO VI	
ABSTRACT VIII	
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 O TECIDO ADIPOSEO E OBESIDADE	6
3.2 A FOSFATIDILCOLINA	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 DETERMINAÇÃO DO GLICEROL NO MEIO DE INCUBAÇÃO	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37

6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é um órgão com várias funções: isolamento térmico, barreira física ao trauma, armazenamento energético e secreção de proteínas e peptídeos bioativos. A capacidade de armazenamento energético resulta do aumento das reservas de cada adipócito e da replicação e diferenciação de pré-adipocitos. A ausência de limite representa vantagem adaptativa, em curto prazo, e desvantagem em longo prazo, traduzida em disfunção endócrina/metabólica (COSTA & DUARTE, 2006).

A função primordial do armazenamento de gordura é servir como reserva energética do organismo, mas também pode atuar como isolante térmico, (ajudando na manutenção da temperatura do corpo) e como proteção contra choques mecânicos, posicionando-se entre a pele e os órgãos internos.

Apesar de possuir uma função biológica importante, o tecido adiposo é indesejável em excesso. Em animais sedentários, quando o gasto de energia com

atividades diárias é menor do que sua ingestão, o organismo transfere a energia em excesso para a formação de lipídios, depositados no tecido adiposo. Esse depósito aumenta o peso e o volume corporal, implicando em alterações morfológicas e sobrecarga do coração e dos pulmões, responsáveis pela oxigenação de um volume corporal maior do que o esperado.

Como órgão secretor, o tecido adiposo apresenta várias particularidades. Encontra-se disperso pelo organismo, em depósitos sem ligação física entre si, cuja atividade secretora é regulada por mecanismos humorais e hormonais, não totalmente esclarecidos. Nesses depósitos individuais, encontram-se vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos) com atividade secretora variável. As adipocinas são também produzidas por outros tecidos, sendo difícil determinar a contribuição do tecido adiposo para os níveis de adipocinas circulantes. Os mecanismos moleculares de síntese e exocitose não estão ainda totalmente esclarecidos (COSTA & DUARTE, 2006).

A gordura localizada é o acúmulo de tecido adiposo (gorduroso) em algumas regiões do corpo. É aquela gordura que se mantém quando o indivíduo engorda e depois emagrece.

Sendo assim, o índice de massa corporal (IMC) é um método simples e amplamente usado para estimar a gordura corporal. Ele é calculado dividindo o peso da pessoa pela sua altura ao quadrado: $IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$ (Tabela 01).

Tabela 01 – Classificação de sobrepeso e da obesidade baseado IMC, onde o $IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$

Classificação	IMC (Kg / m²)
Baixo peso	Menor de 18,5
Eutrofia	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade grau I	30 – 34,9
Obesidade grau II	35 – 39,9
Obesidade grau III	Maior de 40

A pessoa também pode ser classificada como tendo obesidade do tipo mórbida com um IMC maior que 35 e presença de um outro problema de saúde significativo (co-morbidade). A interpretação do IMC também pode levar em conta a etnia, massa muscular, idade, sexo e outros fatores. O IMC superestima o gordura corporal de pessoas musculosas e subestimam a de indivíduos que perderam massa corporal como os idosos.

Outra forma de determinar a obesidade é medindo o percentual de gordura corporal. Geralmente é aceito que homens com mais de 25% e mulheres com mais de 30% de gordura corporal são obesos.

A obesidade (do latim *obesus*, *ob* = muito, *edere* = comer) definida como aumento da quantidade de gordura corporal é uma doença universal de prevalência crescente, e certamente, hoje assume caráter epidêmico, como o principal problema de saúde pública na sociedade moderna (HALPERN & MANCINI, 1998). É, provavelmente, o mais antigo distúrbio metabólico, havendo

relatos da ocorrência desta desordem em múmias egípcias e em esculturas gregas (BLUMENKRANTZ, 1997; FRANCISCHI et al., 2000).

Ao longo dos anos, foi evidenciado um importante incremento no consumo de alimentos, especialmente daqueles mais calóricos e menos nutritivos.

Torna-se evidente as mudanças dos hábitos alimentares e o fenômeno de transição nutricional no Brasil (MONDINI, MONTEIRO & COSTA, 2000).

A perda e ganho excessivo de peso estão associados primariamente a uma mudança no tamanho de depósitos de gordura. Sendo assim, a obesidade é uma doença de difícil controle.

Existem alguns tratamentos para o controle da obesidade: 1) dietético; 2) comportamental; 3) atividade física; 4) farmacológico; 5) cirúrgico; 6) estético.

Nesse trabalho avaliaremos o efeito da fosfatidilcolina em adipócitos de ratos adultos da linhagem Wistar no tratamento estético, para eliminação de pequenos depósitos de gordura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

2.1.1 Estudar os efeitos da fosfatidilcolina (PC) solubilizada em diferentes compostos sobre os adipócitos de ratos Wistar.

2.2 Objetivo específico

2.2.1 Determinar a concentração de PC suficiente para induzir a lipólise;

2.2.2 Verificar a ação dos compostos utilizados para solubilização da PC sobre os adipócitos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O tecido adiposo e obesidade

O tecido adiposo é o reservatório energético do organismo e está localizado primariamente sob da pele. Existem dois tipos de tecido adiposo: o marrom e o branco.

O tecido adiposo marrom (TAM) é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes em adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. Já o tecido adiposo branco (TAB) serve como um repositório para triacilgliceroís; oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos; por ser um excelente isolante térmico, tem papel importante na manutenção da temperatura corporal; outra função, refere-se a sua capacidade de armazenar energia com necessidade de pouca água, fornecendo mais calorias por grama (9 kcal.g^{-1}) em comparação ao carboidrato (4 kcal.g^{-1}), o que dá ao TAB o status de importante sistema tamponante para o

balanço energético (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triacilglicerol em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico.

A lipogênese ocorre quando ingerimos carboidratos, estes são transformados em glicose, e esta, entra na corrente sanguínea.

Quando a concentração de glicose depositada no sangue ultrapassa o seu limite máximo, seu excesso é removido pelo fígado, e este, o armazena em seu interior sob a forma de glicogênio.

Diante disso, é correto afirmar que ao ingerirmos glicose, conseqüentemente aumentaremos a concentração de glicogênio dentro do fígado.

Por sua vez, quando em excesso, o glicogênio é quebrado pelo fígado tendo seu excedente eliminado no sangue e, conseqüentemente, a concentração de ácidos graxos na corrente sanguínea será aumentada.

O excesso de ácidos graxos no sangue é removido pela pele, e esta, o armazenará dentro de células conhecidas como adipócitos (células

armazenadoras de gordura). Este armazenamento ocorrerá sob a forma de gordura.

A lipólise é exatamente o processo contrário da lipogênese. Quando o sangue está com concentração de glicose abaixo do normal, ele recebe glicose do fígado resultante da quebra do glicogênio.

O fígado, por sua vez, para manter seu nível de glicogênio estável, retira ácidos graxos do sangue, transformando-os em glicogênio.

Quando o sangue, que teve os ácidos graxos removidos pelo fígado, chega até a pele, esta, quebra a gordura armazenada em seus adipócitos e a introduz no sangue sob a forma de ácidos graxos.

A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A totalidade de depósitos de gordura em adipócitos é capaz de extensa variação, conseqüentemente permitindo mudanças de necessidade do crescimento, reprodução e envelhecimento, assim como flutuações nas circunstâncias ambientais e fisiológicas, tais como a disponibilidade de alimentos e as necessidades do exercício físico (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

O tecido adiposo aumenta ou por hipertrofia ou por hiperplasia, sendo que o ganho de peso pode ser o resultado de cada um desses isoladamente ou uma

combinação dos dois. Os depósitos de gordura podem expandir até 1.000 vezes somente pela hipertrofia, um processo que pode ocorrer em qualquer período enquanto o espaço estiver disponível no adipócito. A hiperplasia ocorre, primariamente, como uma parte do processo de crescimento durante a lactância e a adolescência, mas também pode ocorrer na fase adulta quando o conteúdo de gordura das células existentes tiver alcançado o limite de sua capacidade (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Recentemente, a obesidade está sendo considerada a mais importante desordem nutricional nos países desenvolvidos, tendo em vista o aumento de sua prevalência (FRANCISCHI et al., 2000).

Segundo Sawaya (1997), três hipóteses são objetos de estudo para tentar explicar o aumento da obesidade. A primeira refere-se aos fatores genéticos associados a determinados fatores ambientais. A segunda hipótese está associada ao declínio do gasto energético em conjunto com a diminuição do consumo de fibras e o aumento do consumo de gorduras e açúcares e a terceira e última hipótese discorre que a obesidade ocorreria como uma consequência da desnutrição.

Os principais fatores que contribuíram para esse aumento foram: 1) a automação dos afazeres básicos induzindo ao aumento do sedentarismo com a diminuição da atividade física espontânea e da atividade de lazer e 2) as mudanças inadequadas nos hábitos dietéticos. Com um aumento da oferta de

alimentos, principalmente os ricos em lipídios saturados e no número de refeições e de porções (BOUCHARD, 2000).

No caso específico de países em desenvolvimento, como o Brasil, é considerável o fenômeno da urbanização e o seu impacto sobre os padrões de atividade física e as características da alimentação (PINHEIRO, FREITAS & CORSO, 2004).

Entre outros fatores, a expansão do setor de serviços, com a predominância de ocupações que demandam baixo gasto energético, sugere que o desenvolvimento e a modernização do país associam-se a alterações significativas e negativas na atividade física, sendo estas relevantes para explicar a ascensão da obesidade. Além disso, podemos citar a alimentação fora do domicílio, o maior consumo de enlatados, dos lanches e dos refrigerantes, nem sempre equilibrados do ponto de vista nutricional (PINHEIRO, FREITAS & CORSO, 2004).

A obesidade pode ser definida primariamente como o acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. Devido à sua etiologia multifatorial é difícil mensurar a força de cada uma das variáveis envolvidas no processo do ganho excessivo de peso (VASQUES, MARTINS & AZEVEDO, 2004; BERNARDI, CICHELERO & VITOLO, 2005).

A perda de peso pode ser alcançada com dietoterapia, exercícios físicos regulares, mudança de comportamento, entre outros. Porém, isso exige esforço e disciplina (HALPERN & MANCINI, 1998; FRANCISCHI et al., 2000).

Com o passar dos anos surgiram novos medicamentos, cirurgias e algumas intervenções estéticas para a correção do peso ideal de forma rápida e sem muito esforço.

Entre elas, podemos citar a lipoaspiração que consiste na remoção cirúrgica de gordura subcutânea, por meio de cânulas submetida a uma pressão negativa e introduzida por pequenas incisões na pele. A lipoaspiração corresponde atualmente a uma técnica simples, rápida, pouco dispendiosa e, quando bem indicada, isto é, em adultos saudáveis com gordura localizada, apresenta excelentes resultados (COLEMAN et al., 2001).

Já a lipoescultura consiste na retirada de gordura de determinadas zonas e reinjeção em outras zonas deprimidas. A gordura reinjetada sofre um processo de absorção. Aproximadamente 30% desta gordura injetada é absorvida pelo organismo, de maneira que é necessária uma correção exagerada (em 30%), para que o resultado final seja adequado (COLEMAN et al., 2001).

Porém essas intervenções estéticas só são eficazes em regiões de depósito de gordura localizada; onde somente com dietas e exercícios não conseguimos um resultado satisfatório. Além disso, elas custam caro e são muito invasivas ao contrário do tratamento estético com o uso do Lipostabil®

(Fosfatidilcolina). Segundo Mole (2006), a lipólise não substitui uma lipoaspiração, por exemplo, mas promove uma redução nos depósitos de gordura localizada.

3.2 A fosfatidilcolina

Os fosfolipídios são os principais constituintes das membranas biológicas, que formam barreiras de permeabilidade altamente seletiva, desempenhando um papel importante no transporte de substâncias específicas através das membranas (CAMPBELL, 2000).

A Fosfatidilcolina (PC) é um fosfolipídio que pode ser extraído da lecitina de soja presente em abundância nas membranas celulares, tem ativa participação na estrutura e no metabolismo das células, e é precursor da acetilcolina. Além disso, atua como um protetor das células do sistema nervoso, melhorando a memória e a função cognitiva; protege e auxilia na recuperação das células hepáticas expostas aos vírus, à ingestão abusiva de álcool e a outras substâncias tóxicas e por fim, melhora a resposta das células musculares à insulina (HEXSEL et al., 2003; ROTUNDA & KOLODNEY, 2006).

A PC foi isolada primeiramente em Odessa, Ucrânia em 1955. Foram realizadas novas pesquisas na Alemanha e Rússia, e no momento a PC é registrada em 53 países (HASENGSCHWANDTNER, 2005).

A utilização cosmética da PC teve origem na Itália no final dos anos 80, e foi anunciada pelo médico italiano Dr. Sergio Maggiori na 5ª Reunião Internacional

de Mesoterapia realizada em Paris, França (HEXSEL et al., 2003; ROTUNDA et al., 2004; HASENGSCHWANDTNER, 2005; ROTUNDA & KOLODNEY, 2006).

Lipostabil® é o nome comercial da PC. Embora não aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para nenhum uso médico nos Estados Unidos, este vem sendo utilizado por mais de três décadas na Europa, América do Sul e África do Sul em inúmeros tratamentos. No Brasil em 9 de janeiro de 2003, foi proibido o seu uso pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) devido a ausência de estudos clínicos que comprovem sua eficácia e segurança. O laboratório que fabricava o Lipostabil (Aventis Pharma) comercializava o produto em ampolas que continham 250 mg/5mL de PC (YOUNG, 2003).

As injeções de PC são associadas com queimadura imediata, eritema, urticária e prurido (ROTUNDA & KOLODNEY, 2006).

O mecanismo de ação da PC inclui emulsificação e transporte de triglicérides a partir de células de gordura, ação detergente e estimulação da atividade de lipase. O preciso mecanismo pelo qual a PC causa redução de gordura localizada ainda é objeto de estudo (ROTUNDA et al., 2004).

Porém, alguns pontos permanecem sem uma explicação: como essa gordura é eliminada do organismo? A utilização do Lipostabil® poderia afetar outros tecidos além do adiposo? Qual a dosagem adequada? Como a PC causa redução do tecido adiposo?

Este capítulo descreve os trabalhos realizados na área em estudo que são importantes para o desenvolvimento e compreensão do trabalho.

Em 2001, Rittes usou injeções de fosfatidilcolina (PC) para reduzir o tamanho de depósitos de gordura localizada abaixo dos olhos. Ao todo, 30 pacientes entre 30 e 70 anos de idade participaram desse estudo, sendo 22 mulheres e 8 homens. Foram aplicados 0,4 mL de PC (250mg/5 mL) em três pontos (central, medial e lateral) da saliência. Desses pacientes, dois receberam um total de 4 aplicações, 5 deles um total de 3 aplicações, 12 receberam 2 aplicações, e 11 deles um total de 1 aplicação. Houve um intervalo de 15 dias entre as aplicações. Após as aplicações, todos os pacientes queixaram-se de leve ardor, notando-se edema e eritema localizado. O edema era notado durante as primeiras 6 horas e persistia por aproximadamente 72 horas. Foi utilizado anestésico nesse estudo e o pré e pós-operatórios incluíram o exame do tamanho da gordura localizada e fotografias obtidas antes e após as aplicações com PC. Segundo a autora esse estudo ofereceu uma alternativa não cirúrgica para a redução dos depósitos de gordura localizada e os resultados cosméticos observados foram satisfatórios do ponto de vista dermatológico (RITTES, 2001).

Já em 2003, Hexsel et al, publicaram um estudo realizado com 213 pacientes dos quais 8 eram HIV positivo. Dos pacientes selecionados, 205 foram submetidos ao tratamento com PC. Eles fizeram de 1 a 5 sessões com um intervalo médio de 15 dias entre as aplicações. A PC (250mg/mL) foi injetada pura

ou diluída em solução salina (0,9%), dependendo da extensão da área a ser tratada (HEXSEL et al., 2003).

As injeções foram aplicadas no tecido subcutâneo, usando-se uma seringa. A profundidade das aplicações foi de 1 a 2 cm abaixo da superfície cutânea ; 0,2 mL foram aplicados em cada ponto, respeitando-se a distância de 2 cm entre os pontos. O volume total de PC utilizada variou de acordo com a quantidade de depósitos de gordura de cada paciente, mas em todos os casos não mais que dois frascos (10 mL) foram aplicados por sessão. Cada sessão de tratamento foi registrada com fotos digitais e em alguns casos, a espessura da gordura foi mensurada com o auxílio de uma régua. Os oito pacientes HIV positivo foram submetidos de 2 a 5 sessões de tratamento; com um intervalo de 30 dias entre elas. A área a ser tratada foi traçada de modo que a distância entre os pontos fosse de 1,5 cm e 0,2 mL de PC foram aplicados em cada ponto. O volume total utilizado variou de acordo com a quantidade de lesões a serem tratadas, mas a autora revelou que não excedeu a dose segura recomendada (HEXSEL et al, 2003).

Algumas recomendações foram feitas aos pacientes, exceto aos HIV positivo, para reduzir os sintomas causados pelas injeções de PC. A primeira recomendação foi de comprimir a área tratada, a segunda foi de tomar analgésico e a terceira e última sugestão foi de fazer drenagem linfática. Dos 205 pacientes que participaram desse estudo, 13 deles passaram por testes laboratoriais (glicose, colesterol, HDL, LDL, triglicérides), sendo que os exames foram

realizados antes do tratamento com PC, 48 horas depois e 14 dias mais tarde. Os resultados não mostraram alterações significativas na função hepática ou no perfil lipídico dos pacientes (HEXSEL et al, 2003).

Nas primeiras 24 a 48 horas, a região onde foram feitas as aplicações, apresentou edema de moderado a grave; eritema e ardor localizado. O desconforto relatado era leve e foi minimizado com a administração de analgésicos. Os anti-inflamatórios foram prescritos para alguns pacientes nas primeiras 48 horas. Alguns pontos mostraram regressão espontânea de hematomas de 7 a 10 dias após as aplicações. Alguns pacientes relataram coceira de leve a moderada em alguns pontos das aplicações. A regressão dos edemas era evidente em todas as áreas tratadas. A maioria dos pacientes teve redução de medidas em 5 aplicações, com intervalo médio de 15 dias entre elas. No caso dos pacientes HIV positivos, as lesões começaram a retroceder depois da primeira sessão. Depois da terceira sessão uma considerável melhora era notada e após a quinta sessão o progresso era de aproximadamente 80 % e em alguns casos, a completa remissão de algumas lesões era observada (HEXSEL et al, 2003).

No ano de 2003, Rittes publicou um novo estudo sobre o uso da PC. Participaram desse estudo, 40 mulheres e 10 homens com idades entre 25 e 60 anos. As injeções foram aplicadas com intervalos de 15 dias. Este intervalo foi necessário para que os edemas causados pelas injeções desaparecessem completamente. O método utilizado foi a aplicação de 5 mL (250 mg/ 5mL) de PC, distribuída em uma área de 80 cm². A PC era injetada na gordura, localizada no

abdômen, pescoço, braços ou coxas, baseado na necessidade individual; não foi necessário o uso de anestesia local segundo a autora. Imediatamente após as aplicações, notava-se edema e eritema; e os pacientes relatavam leve sensação de ardor. Inchaço e vermelhidão localizados eram notados entre 6 e 72 horas após as aplicações. O autor revelou que poderia ocorrer a formação de nódulos e hematomas e que estes levariam entre 15 e 30 dias para desaparecerem os sintomas. Em 35 das 50 pessoas participantes do estudo, foram feitas 4 aplicações com PC; em outras 10 pessoas foram feitas 2 aplicações e nos 5 participantes restantes foram feitas 1 única aplicação. O número de injeções adicionais, segundo a autora, era determinado pelo volume do depósito de gordura. A área a ser tratada era dividida em 6 partes, e aproximadamente 0,8 mL era injetado; e o 0,2 mL restante era distribuído em áreas com maior depósito de gordura. Os pacientes foram fotografados antes e após o tratamento para que houvesse uma comparação e comprovação dos resultados alcançados. A autora fez um acompanhamento por cerca de 4 anos com esses pacientes e pode observar que não houve o retorno dos depósitos de gordura, eliminados com o tratamento descrito acima (RITTES, 2003).

Em 2004, Rotunda et al tinham por objetivo, pesquisar o componente ativo e mecanismo de ação da PC no uso clínico; para isso, eles utilizaram cultura de células. Os autores mensuraram a viabilidade celular por espectrofotometria (490nm) e todo o estudo foi realizado em triplicata.

Eles também investigaram os efeitos da fórmula de PC e do deoxicolato de sódio (DS) isolado na cultura de células. Um dos primeiros resultados obtidos nesse estudo foi que na concentração 0,05 e 0,5 % houve uma significativa e similar queda na viabilidade celular de ambas PC e DS, revelando um aumento progressivo da morte celular com a elevação da concentração de ambos os componentes (ROTUNDA ET AL, 2004).

Para investigar se o efeito detergente é mecanismo de morte celular, os autores mensuraram após a incubação com PC e DS, a lise celular; para isso eles utilizaram a análise de lactato desidrogenase. Como resultado, eles observaram uma mínima liberação de lactato desidrogenase nas células controle e naquelas incubadas com diluição de 0,005 % de ambos os componentes. Havia progressivamente mais lactato, liberado em 0,05 e 0,5 % em ambos (PC e DS), demonstrando aumento da lise celular com a elevação de concentração de ambos os componentes (ROTUNDA ET AL, 2004).

Os autores também utilizaram pele fresca para determinar se o efeito dessa substância detergente, na cultura de células, era similar ao do tecido. A fórmula injetável de PC (PC-5%, DS-4,75%, Etanol-0,9 % e Água-100 ml) e 5% de DS demonstraram morte celular em torno de 5%. Este achado foi comparado com o efeito do detergente Triton a 5%, na amostra de gordura. Os autores também quantificaram a diferença da viabilidade de células de gordura entre as soluções, mensurando a absorbância (490 nm). Todos os reagentes tiveram efeito

significativo na viabilidade de células de gordura do tecido fresco (ROTUNDA ET AL, 2004).

Em 2004, Ablon e Rotunda realizaram um estudo com 13 pacientes, sendo 10 mulheres e 3 homens com idades entre 42 e 71 anos. Esse estudo teve o objetivo de avaliar a eficácia e segurança da injeção de PC aplicada na gordura localizada na parte inferior da pálpebra.

Antes do procedimento, foi examinado o local a ser tratado e mensurado o tamanho da gordura infraorbital, além disso, foi investigado se os pacientes possuíam algum tipo de patologia periocular e doenças sistêmicas. Nesse estudo foi utilizado a PC injetável na concentração de 50 mg/mL. O procedimento consistia em sentar o paciente, puxar a pele infraorbital para baixo com o dedo, e pressionar o globo ocular para realçar a visualização da gordura. Decorrido cinco minutos após a aplicação da PC, foram feitas compressas a fim de minimizar os possíveis efeitos colaterais causados pela injeção de PC. Foram aplicados 0,4 mL de PC, usando o critério da distribuição individual de gordura. Sendo assim, as injeções de PC foram distribuídas entre o centro, meio e lateral dos depósitos de gordura. Os pacientes foram instruídos a permanecerem na posição vertical nas primeiras 4 horas após o procedimento, a não realizar atividade física e a dormir com a cabeça elevada na noite em que foi realizado o tratamento. Em um intervalo de 14 dias, 7 pacientes receberam 5 injeções de PC; um paciente recebeu 4 injeções; dois pacientes receberam 3 injeções; um paciente recebeu 2 injeções e 2 pacientes receberam 1 injeção. Os três pacientes que receberam de uma a duas

injeções foram excluídos do estudo. Um deles, os autores referiram ter perdido o contato, o outro segundo os autores, perdeu o interesse pelo tratamento e o último, mudou-se para um lugar muito distante. Permaneceram nesse estudo, 7 mulheres e 3 homens.

Os resultados do tratamento foram avaliados de três formas: a primeira, avaliou a evolução da gordura localizada antes e após o tratamento; nesse caso, os médicos notaram a melhora em 8 pacientes (80%). Já na avaliação dos pacientes, somente 7 (70%) relataram melhora da gordura localizada. Entre os efeitos adversos foram notados no local das injeções: queimação, eritema e inflamação; e para finalizar foi realizado um questionário com duas perguntas: a primeira era se o paciente recomendaria a injeção de PC a um amigo, 80 % disse que sim e a segunda pergunta era se as pessoas que participaram do estudo, pagariam pelas injeções se tivessem condição, 70% respondeu que pagariam (ABLON E ROTUNDA, 2004).

Em 2005, Duncan publicou um estudo realizado com 43 pacientes adultos com idades entre 19 e 73 anos que segundo a autora foi baseado no protocolo de tratamento de duas organizações (European Network Lipodissolve (ENL) e a American Society For Aesthetic Lipodissolve (ASAL)).

No protocolo de estudo, haviam fotos tiradas antes do tratamento com PC e um termo de consentimento. Os pacientes combinaram de retornar para uma seqüência de tratamento, se indicado, e foram advertidos que de 2 a 4 injeções seriam necessárias para um melhor resultado. Um intervalo de 4 a 8 semanas foi

mantido entre as sessões. Nesse estudo, segundo o autor, a dose máxima utilizada foi de 100 mL de PC (2500 mg de PC). As áreas a serem tratadas incluíam a face, a parte superior do torso e abaixo do torso. Dos 43 pacientes tratados, 13 relataram melhora dramática de seus depósitos de gordura, e 29 disseram que tiveram melhora de leve a moderada. Um deles relatou que não teve mudança visível. Os pacientes não relataram complicações do tipo: hematoma, reação alérgica, infecção, pele com contornos irregulares, etc. Quando utilizado, altas dosagens para áreas maiores os menores efeitos relatados incluíam: náuseas ou diarreia que persistiram por menos de 24 horas. Coceira, queimadura, eritema, hematoma e vermelhidão faziam parte do processo de tratamento e persistiram de 3 a 10 dias. Três pacientes relataram sensibilidade prolongada na área tratada por aproximadamente um mês. A redução dos depósitos de gordura foram notadas em 42 dos 43 pacientes tratados (DUNCAN, 2005).

Há várias teorias a respeito do exato mecanismo de ação dos componentes da PC usados na redução de depósitos de gordura subcutânea. Para testar a histologia em vivo, o autor injetou em um voluntário uma fórmula padrão para dissolver a gordura da região abdominal. O exame microscópico mostrou a arquitetura normal dos adipócitos. As paredes das células não estavam rompidas e, não havia inflamação. Este achado sugere que o mecanismo de ação da solução de PC são quatro: a primeira seria a parede da célula rompida; a segunda seria o transporte enzimático e lipoprotéico de triglicérides e ácidos graxos para fora dos adipócitos, resultando em adipócitos menores; o terceiro seria uma inflamação, causando retração dos tecidos; e a quarta a formação de

novos colágenos, causando retração da pele e uma pele com característica firme e densa. Uma biópsia em vivo com uma longa duração pode ser necessária para entender melhor os efeitos dos componentes da PC na gordura subcutânea sobre um período de um mês (DUNCAN, 2005).

Bons resultados segundo o autor, dependem da seleção dos pacientes e da habilidade, experiência e decisão do injetor. A fórmula apropriada, injetada no local correto, usando a técnica e a dosagem apropriada é crucial para o sucesso do tratamento (DUNCAN, 2005).

O artigo em questão relata que a Network Lipolysis está ganhando destaque por estar realizando um estudo com 5000 pacientes que terá duração de 10 anos. Está falando também que até o final de 2004 mais 400 médicos de 29 países foram treinados pela Network Lipolysis. Esta organização mostrou os efeitos colaterais mais comuns e a duração desses em dias de aproximadamente 753 tratamentos realizados entre 2004 e 2005. Os mais duradouros foram: os hematomas que costumam durar 5 dias, seguidos de sensibilidade ao toque, com duração de 4,2 dias, vermelhidão com 3,3 dias e etc. Segundo o artigo, a lipólise não substitui a plástica, mas faz parte de uma terapia efetiva para reduzir pequenas áreas de gordura na face e no corpo (DUNCAN, 2005).

Em 2006 Rittes et al, dirigiram um estudo com coelhos para investigar através da histologia, a ação local da fórmula de PC no tecido adiposo.

Foi um estudo randomizado no qual os coelhos foram divididos em dois grupos com 10 animais em cada um deles. No grupo A foi injetado 0,8 mL de PC mais 0,2 mL de lidocaína e no grupo B foi injetado 0,8 mL de solução fisiológica mais 0,2 mL de lidocaína (RITTES et al, 2006).

O procedimento descrito era sempre repetido no mesmo local e as injeções eram aplicadas quatro vezes por dia durante quatro dias; quatro dias depois da última injeção, os animais foram anestesiados intramuscularmente; a área foi marcada e cortada com uma tesoura para a melhor visualização da gordura, a região foi fotografada e uma amostra foi removida para o estudo histológico. O grupo controle foi tratado de maneira similar. Todos os animais foram mortos com uma injeção de cloreto de potássio. Os autores concluíram que imediatamente após as injeções, ocorreu intensiva necrose no tecido gorduroso seguida por um processo inflamatório. A evolução desse processo levou a fibrose quando utilizada a PC ao passo que com as injeções de solução fisiológica resultaram em mínima fibrose do tecido gorduroso (RITTES et al, 2006).

Já em 2006, Salles et al apresentaram um estudo experimental também com coelhos, a sua evolução histológica e os efeitos da PC no tecido adiposo, baseado em evidências de necrose, inflamação e fibrose em aplicações localizadas. Para a realização do experimento foram utilizados coelhos brancos dessecados a fim de encontrar um depósito constante de gordura que poderia ser usado em um modelo experimental. O depósito de gordura foi identificado na região dorsal cervical torácica, denominado corpo adiposo interscapular, a parte

central pode ser encontrada na junção dos pontos de duas escapulas no meio da linha dorsal. Esta estrutura anatômica estava presente como uma constante em 15 coelhos dissecados. A análise histológica dos depósitos de gordura de três coelhos identificou um tecido adiposo normal após o uso desses animais como grupo controle. A média de peso desses coelhos era de 401,62 g +/- 2,374 e a média de peso dos depósitos de gordura era de 4,89 g +/- 10,84.

Para o início do estudo, os coelhos foram divididos em dois grupos: grupo 1 com 7 animais recebendo injeções com PC e o grupo 2 com 5 animais recebendo injeções com solução salina a 0,9 %. A PC usada era disponível na concentração de 50 mg/mL . Os coelhos eram pesados nos dias das injeções e antes da biópsia. Não foi aplicado anestesia durante os tratamentos. Depois das injeções, o grupo 1 recebeu 125 mg da mesma substância dividida em 5 vezes de 25 mg cada, enquanto que o grupo 2 recebeu 5 aplicações de solução salina. Para a biópsia, dos 5 coelhos do grupo controle, 1 coelho foi morto respectivamente no terceiro, sétimo e vigésimo primeiro dia e 2 coelhos no décimo quarto dia enquanto que no grupo PC, 2 coelhos foram mortos no terceiro, sétimo e décimo quarto dia e 1 coelho no vigésimo primeiro dia. O corpo adiposo interscapular foi isolado para o estudo e em seguida fragmentado para análise. A análise histológica foi baseada na evolução da inflamação e da fibrose. Foi utilizada uma escala semiquantitativa na qual o zero (0) significa ausência, 1 (leve), 2 (moderado), 3 (intenso) e 4 (grave). Em relação ao peso dos animais, nenhuma diferença estatística foi observada entre os dois grupos em nenhum momento. Para comparar o peso do depósito de gordura entre os dois grupos, os autores

usaram a relação peso do depósito de gordura com o peso do coelho em gramas. A comparação entre os dois grupos mostrou uma diferença não significativa estatisticamente ($p = 0,167$); não foi observada necrose em nenhum grupo. No grupo com solução salina, não foi observada inflamação enquanto que no grupo PC observou-se. A diferença encontrada foi considerada estatisticamente significativa ($p= 0,026$) (SALLES et al, 2006).

A presença de inflamação no grupo PC aumentou progressivamente do terceiro ao décimo quarto dia, mas não foi observada após o vigésimo primeiro dia. Alguns graus de fibrose foram observados em todas as biópsias, de todos os coelhos. O grupo controle apresentou a média (comparação da inflamação e fibrose entre dois grupos) de $1,87 \pm 4$ quando comparado com a média de $2,81 \pm 4$ do grupo PC. Essa diferença foi então considerada estatisticamente significativa. Quanto a fibrose, a biópsia de diferentes dias foram comparadas dentro de um mesmo grupo e só o grupo PC teve uma diferença no décimo primeiro dia (menos fibrose). No entanto, esta redução foi considerada estatisticamente significante somente quando comparado o terceiro e décimo quarto dia ($p= 0,028$ e $0,016$, respectivamente) (SALLES et al, 2006).

Em 2007, ODO et al estudaram a ação do Deoxicolato de sódio no tecido subcutâneo de humanos. Participaram desse experimento, 30 voluntários; estes foram divididos em 3 grupos: No primeiro grupo foi aplicado o DS a 1%, no segundo grupo a 2,5% e no terceiro grupo 0 % (placebo). Ao todo foram feitas 4 aplicações. Os autores concluíram que em ambas as dosagens, o DS induz a uma

resposta inflamatória. A microscopia revelou a existência de necrose no tecido adiposo, dissolução de gordura e reações inflamatórias. No grupo placebo as injeções não induziram a mudanças histológicas.

Assim, o presente trabalho visa investigar a ação (lipólise) da PC solubilizada em DS, Etanol, Tween® 80 e Albumina em diversas concentrações sobre os adipócitos dos ratos da linhagem Wistar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 30 ratos machos adultos da linhagem Wistar recém-desmamados (21 a 23 dias), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP). O primeiro passo foi pesá-los, os ratos que tinham atingido no mínimo 150 gramas, foram mortos por deslocamento cervical e o tecido adiposo (epidídimo) foi removido e pesado (Rodbell, 1964) (Figura 03).



Figura 01 – Animais criados em gaiolas individuais.

Esse procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB- UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007 sob o protocolo nº 1197-1.



Figura 02 – Em detalhe o acondicionamento dos animais.



Figura 03 – Remoção do epidídimo.

O tecido adiposo coletado foi colocado em um recipiente estéril contendo solução fria de KREBS-RINGER-HEPES (KR-HEPES), pH 7,4. O preparo do tampão KR-HEPES, envolve duas etapas. A primeira delas é a preparação do tampão KREBS-RINGER, que é constituído por 300 mL de NaCl (0,154M), 12 mL de KCl (0,154M), 9 mL de CaCl₂.2H₂O (0,110M), 3 mL de KH₂PO₄ (0,154M), e 3 mL de MgSO₄.7H₂O (0,154M). Em seguida, é feito uma mistura deste tampão KR com 9 mL de NaHCO₃ (0,154M). Para completar o tampão é adicionado 0,108 gramas de glicose e 0,238 gramas de Hepes, esse novo tampão recebeu o nome de KRB (KREBS-RINGER BICARBONATO).

A digestão do tecido foi realizada em tubos de polietileno (50 mL) tipo *falcon*, contendo cada um, tecido adiposo, 6 mL de KRB e 0,006 gramas de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*).

Os tubos foram agitados em 60 ciclos por minuto a 37 °C, durante 45 minutos. A suspensão celular resultante foi filtrada através de uma malha de *nylon* para um novo tubo com auxílio de uma cânula acoplada a uma seringa de vidro, o sobrenadante foi removido, permanecendo no interior do tubo apenas as células (Figura 04). Em seguida adicionamos o tampão KRB e esperamos 2 minutos até que a maioria das células adiposas flutuasse. Seguiu-se uma nova aspiração do precipitado (PPT) e uma nova lavagem das células. Este procedimento foi repetido por três vezes. Após a última lavagem das células, diluímos a suspensão celular, com o KRB, em seis vezes (CREGE, 2007).



Figura 04 – Filtração da suspensão celular através de malha de nylon.

Após a preparação dos adipócitos, uma alíquota da suspensão celular final foi observada no microscópio a fim de constatar a integridade e realizar a contagem das células adiposas em câmara de Mallassez para ajuste da concentração celular, descrito por Faintrenie & Géloën (1996).

Após o isolamento e contagem dos adipócitos as células foram incubadas em duplicata; solubilizou-se a fosfatidilcolina (PC) em diferentes compostos, para verificar seu efeito sobre os adipócitos. Nos dois primeiros tubos *Eppendorfs* incubamos a PC com a albumina a 10 % (0,1 g de albumina, 1 mL de KR e 0,05g de PC); em outro tubo colocou-se somente a albumina a 10 % (0,1g de albumina,

1 mL de KR) repetiu-se o procedimento com o etanol (1 mL e 0,05g de PC), com o detergente Tween[®] 80 a 4,75% (0,05 g de Tween[®] 80, 0,95 mL de KR e 0,05g de PC) e com o Deoxicolato de sódio (DS) a 4,75 % (0,05g de DS, 0,95 mL de KR e 0,05g de PC), nesse experimento foram utilizados mais dois tubos: um deles, chamou-se de gelo e o outro de basal. O tratamento gelo teve por objetivo verificar a quantidade de glicerol produzida devido à manipulação dos adipócitos durante as etapas que precedem à incubação dos mesmos.

Os tubos foram agitados em 60 ciclos por minuto a 37°C, durante os tempos 15, 30 e 60 minutos (Figura 05). Ao final do período de incubação, colocaram-se os tubos *Eppendorf* em gelo por no mínimo 40 minutos. Após isso, retirou-se 200 µL do infranadante e armazenou-se em tubos tipo *Eppendorfs* enumerados e estes foram armazenados em freezer a - 20°C para análise posterior de glicerol. A parte restante foi mantida em gelo e levada para observar em microscópio de captura imagem (Figura 06).

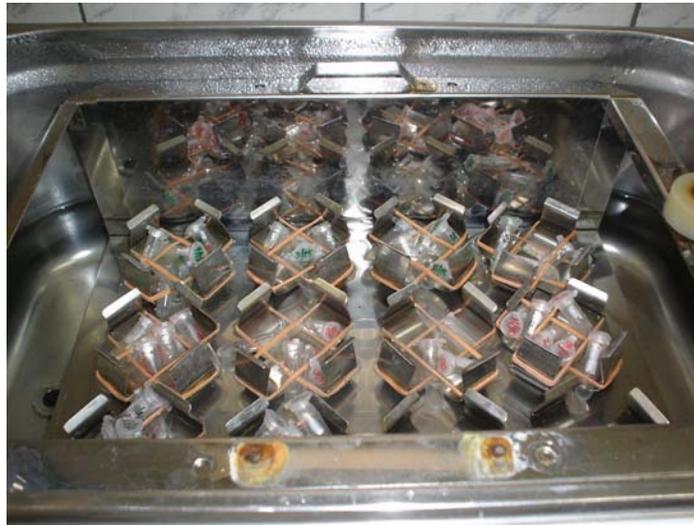


Figura 05 – Agitação dos tubos em banho maria.

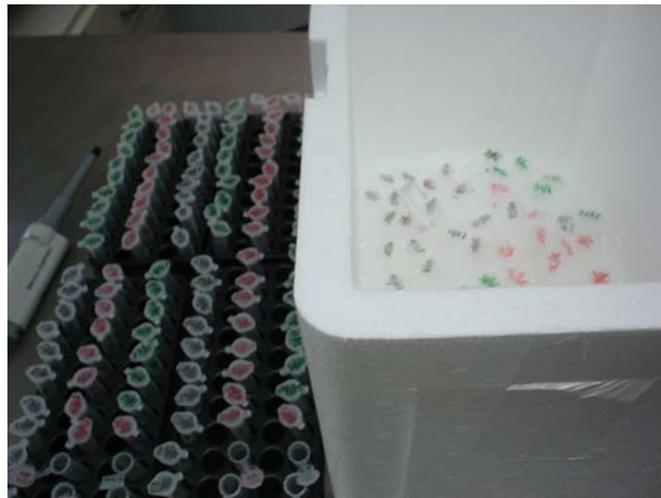


Figura 06 – Amostras mantidas em gelo para posterior observação em microscópio.

Para conseguir observar o número de células coradas e não coradas ao microscópio, foi utilizado o corante Tripán blue a 1% , solubilizado em água (DEMARCO et al., 1998) (Figura 07 e 08).

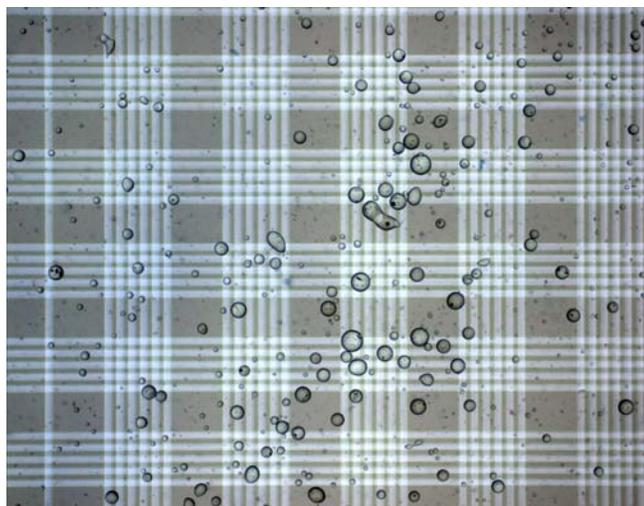


Figura 07–Câmara de Malassez contendo adipócitos isolados para realização de contagem (tratamento de Etanol – 15 minutos). Imagem obtida em microscópio óptico em aumento de 50 vezes.

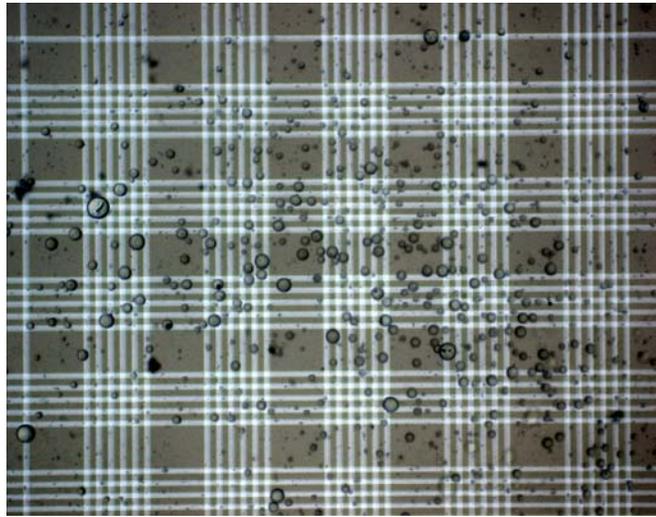


Figura 08—Câmara de Malassez contendo adipócitos isolados para realização de contagem (tratamento de DS + PC (0,05g de DS, 0,95 mL de KR e 0,05g de PC) – 30 minutos). Imagem obtida em microscópio óptico em aumento de 50 vezes.

4.1 Determinação do Glicerol no meio de incubação

Ao final dos cinco experimentos foi realizada a determinação do glicerol no meio de incubação, pois o índice de lipólise avalia a quantidade de glicerol produzida.

Este glicerol foi quantificado por meio de reações catalisadas pelas enzimas glicerol quinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase (kit Laborlab de triacilgliceróis, adaptado por CREGE, 2007).

Em seguida foi preparado o reativo de trabalho (kit), medindo 30 mL do reativo tampão e adicionamos ao reativo enzimático.

Antes da análise do glicerol o espectrofotômetro foi zerado com água deionizada; em seguida foi feita a leitura do padrão 1 e 2 (100 μ L reativo padrão (RP) : 500 μ L reativo de trabalho (RT)); depois do branco 1, 2 e 3 (600 μ L RT); e do zero 1, 2 e 3 (100 μ L KRB : 500 μ L RT); depois disso foram feitas curvas com concentração conhecida de glicerol. Para isso, preparou-se quatro tubos *Eppendorf* contendo o reativo padrão e o tampão KRB (25 μ g, 50 μ g, 75 μ g e 100 μ g para um volume final de 400 μ L). Em seguida foram preparados dois tubos contendo 100 μ L do concentrado de 25 μ L : 500 μ L de RT e este procedimento foi repetido para concentrações de 50 μ g, 75 μ g e 100 μ g. Logo depois foram feitas as leituras das amostras seguindo o seguinte padrão 100 μ l de cada amostra: 500 μ L de RT (Figura 09).



Figura 09 – Equipamento utilizado na leitura das amostras – Espectrofotômetro.

Os tubos tipo *Eppendorfs* foram incubados por 30 minutos em banho-maria a 37°C com agitação leve (60 ciclos por minuto). Decorrido este tempo a reação foi interrompida adicionando 500 μ L de água deionizada gelada em todas as escavações, e imediatamente após a adição da água, foi realizada a leitura da concentração de glicerol através de um espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (CREGE, 2007).

4.2 Análise Estatística

Foi realizado o teste t de Student, Anova seguido de Tukey, Bonferroni e Dunnett afim de comparar as amostras com nível de significancia de 5 %. Para tais análises foi utilizado o software Prisma (Graphpad Software Inc.,USA). A diferença foi considerada significativa quando os valores de p foram menores que 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados para a liberação de glicerol foi feita da seguinte forma: em primeiro lugar, observou-se a quantidade desse marcador liberada em cada um dos tratamentos realizados, descritos na metodologia; em seguida foi feito à média e desvio padrão agrupando as amostras por tempo (15, 30 e 60 minutos).

Ao todo foram realizados cinco experimentos com +/- 6 ratos cada e o volume final de cada amostra foi acertado para 1 mL.

Tabela 02 – Glicerol (mmol) liberado em meio de incubação de 15 minutos e valores de p (Teste t de Student).

Tratamento 15 minutos	Média	Desvio Padrão	Basal x tratamento (p)	Efeito PC* (p)
Basal	1,63	0,73	-	-
DS	3,01	1,76	0,2440	
DS + PC	5,13	0,36	0,5860	0,2863
Etanol	1,91	0,47	0,7015	
Etanol + PC	2,59	0,04	0,2178	0,4563
Tween® 80	6,28	0,56	0,0498	
Tween® 80 + PC	3,84	0,54	0,0240	0,2791
Albumina	2,20	0,51	0,5951	
Albumina + PC	2,38	1,80	0,4820	0,8955

*Efeito de lipólise causado pela PC no mesmo agente de solubilização (DS x DS + PC; etanol x etanol + PC; Tween x Tween + PC e albumina x Albumina +PC). Os valores estão expressos em média mais desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student.

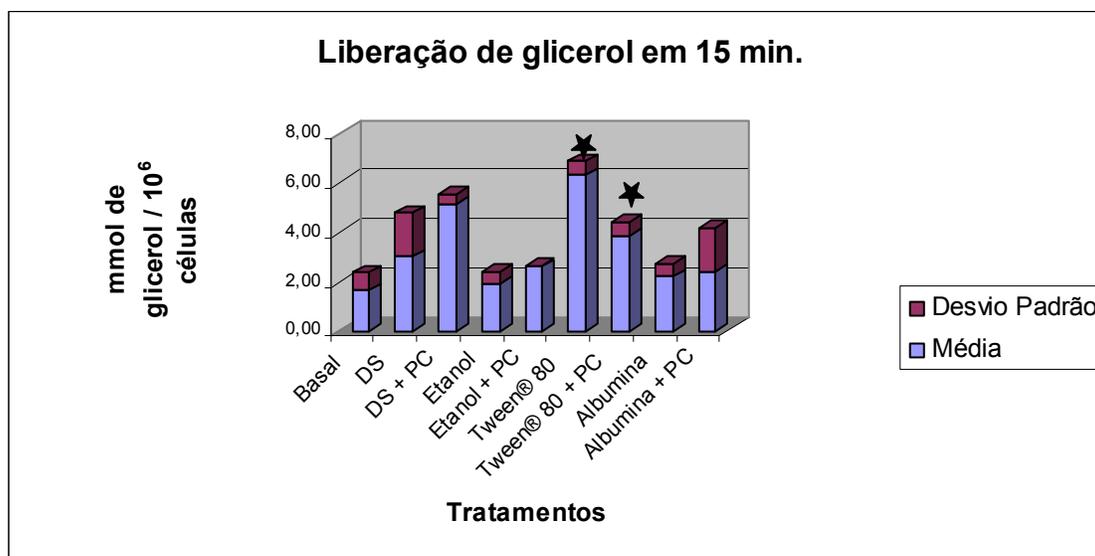


Figura 10 – Glicerol (mmol) liberado por adipócitos epididimais isolados de ratos. Os adipócitos foram incubados durante 15 minutos com deoxicolato de sódio (DS); DS + Fosfatidilcolina (PC); etanol; etanol + PC; Tween® 80; Tween® 80 + PC; albumina e albumina + PC (* diferente estatisticamente em relação ao basal).

Foram encontradas diferenças estatísticas (*p < 0,05) em Basal x Tween® 80 e em Basal x Tween® 80 + PC. Nos demais tratamentos em meio de incubação de 15 minutos, não foram encontrados diferenças estatísticas (Tabela 02).

Realizou-se também a análise estatística, Anova seguida de Tukey, Bonferroni e Dunnett. Em Dunnett observou-se diferença estatística entre os tratamentos Basal x Tween® 80.

Quando observamos o gráfico, percebemos que o DS e o DS + PC tem uma maior liberação de glicerol que o basal, porém esse efeito não é significativo estatisticamente. Já o detergente Tween® 80 tem uma maior liberação de glicerol que o Tween® 80 + PC. Será que PC tem efeito protetor? Se compararmos o DS e o Tween® 80 percebemos efeitos opostos.

Tabela 03 – Glicerol (mmol) liberado em meio de incubação de 30 minutos e valores de p (Teste t de Student).

Tratamento 30 minutos	Média	Desvio Padrão	Basal x tratamento (p)	Efeito PC* (p)
Basal	1,98	1,76	-	-
DS	3,21	0,07	0,4167	
DS + PC	5,26	2,40	0,0475	0,2688
Etanol	3,87	0,95	0,3129	
Etanol + PC	4,51	1,08	0,0665	0,7404
Tween® 80	5,23	1,73	0,1567	
Tween® 80 + PC	5,57	3,21	0,0770	0,8959
Albumina	1,89	0,47	0,9292	
Albumina + PC	3,67	0,35	0,3248	0,2949

*Efeito de lipólise causado pela PC no mesmo agente de solubilização (DS x DS + PC; etanol x etanol + PC; Tween x Tween + PC e albumina x Albumina +PC).

Os valores estão expressos em média mais desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student.

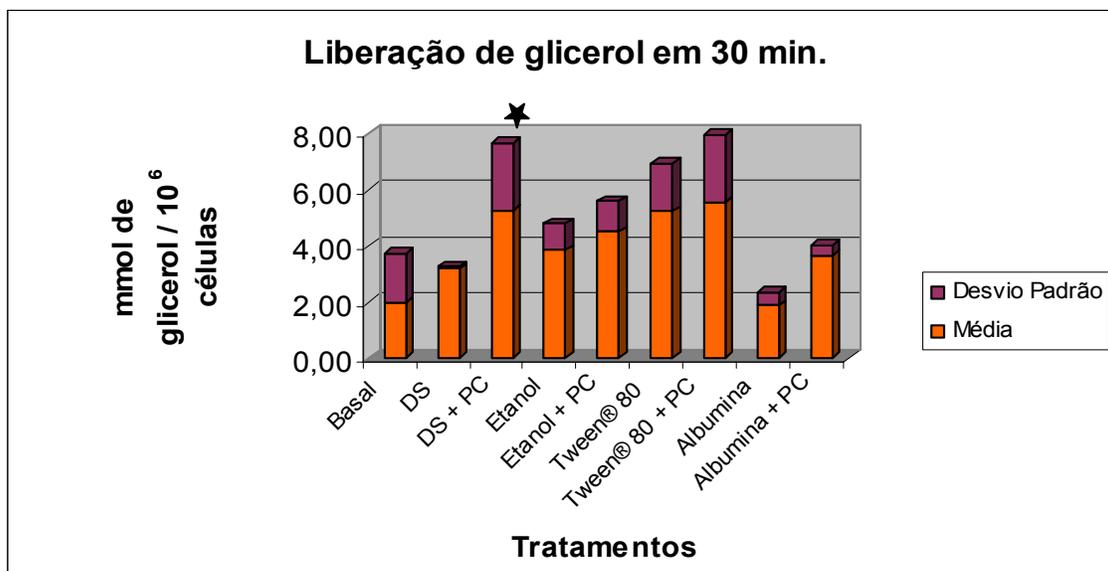


Figura 11 – Glicerol (mmol) liberado por adipócitos epididimais isolados de ratos. Os adipócitos foram incubados durante 30 minutos com deoxicolato de sódio (DS); DS + Fosfatidilcolina (PC); etanol; etanol + PC; Tween® 80; Tween® 80 + PC; albumina e albumina + PC (* diferente estatisticamente em relação ao basal).

Quando observamos o gráfico, percebemos que todos os tratamentos, com exceção da albumina têm uma maior liberação de glicerol que o basal, porém essa diferença só foi significativa em basal x DS + PC.

Observou-se também que em meio de incubação de 30 minutos, o DS e o DS + PC apresentaram a mesma tendência de liberação de glicerol que em 15 minutos.

Sendo assim, encontramos diferença estatística ($p < 0,05$) somente em Basal x DS + PC. Nos demais tratamentos em meio de incubação de 30 minutos, não foram encontrados diferenças significativas estatisticamente (Tabela 03).

Tabela 04 – Glicerol (mmol) liberado em meio de incubação de 60 minutos e valores de p (Teste t de Student).

Tratamento 60 minutos	Média	Desvio Padrão	Basal x tratamento (p)	Efeito PC* (p)
Basal	2,26	1,44	-	-
DS	4,55	0,90	0,4479	
DS + PC	2,28	0,44	0,9883	0,4152
Etanol	2,76	3,33	0,8324	
Etanol + PC	3,87	2,89	0,4135	0,6554
Tween® 80	6,03	1,13	0,2112	
Tween® 80 + PC	4,45	0,36	0,1813	0,5636
Albumina	1,13	0,33	0,3948	
Albumina + PC	2,30	0,67	0,9755	0,1024

*Efeito de lipólise causado pela PC no mesmo agente de solubilização (DS x DS + PC; etanol x etanol + PC; Tween x Tween + PC e albumina x Albumina +PC).

Os valores estão expressos em média mais desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student.

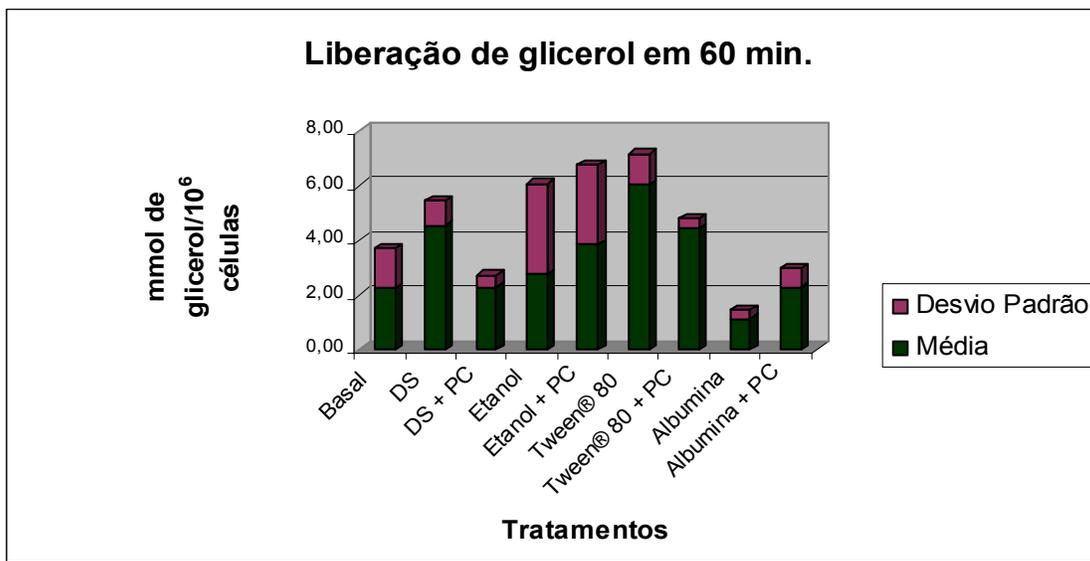


Figura 12 – Glicerol (mmol) liberado por adipócitos epididimais isolados de ratos. Os adipócitos foram incubados durante 60 minutos com deoxicolato de sódio (DS); DS + Fosfatidilcolina (PC); etanol; etanol + PC; Tween[®] 80; Tween[®] 80 + PC; albumina e albumina + PC.

O DS e o Tween[®] 80 tem uma maior liberação de glicerol (tempo de 60 minutos) quando não está solubilizado a PC. O efeito contrário ocorreu com o etanol e a albumina.

Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em meio de incubação de 60 minutos (Tabela 04).

Tabela 05 – Valores de p (Teste t de Student) para o tratamento Basal

Teste t	P
Basal 15 x Basal 30	0,6747
Basal 15 x Basal 60	0,0586
Basal 30 x Basal 60	0,1018

A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas quando comparamos os valores de p dos basais (Tabela 05).

Para a análise dos dados da contagem de adipócitos, utilizou-se o seguinte critério: a viabilidade celular foi obtida através do método da exclusão de células coradas pelo azul de Tripán, pois, quando aplicamos o azul de Tripán, ele penetra na membrana de células mortas corando-as (DEMARCO et al., 1998).

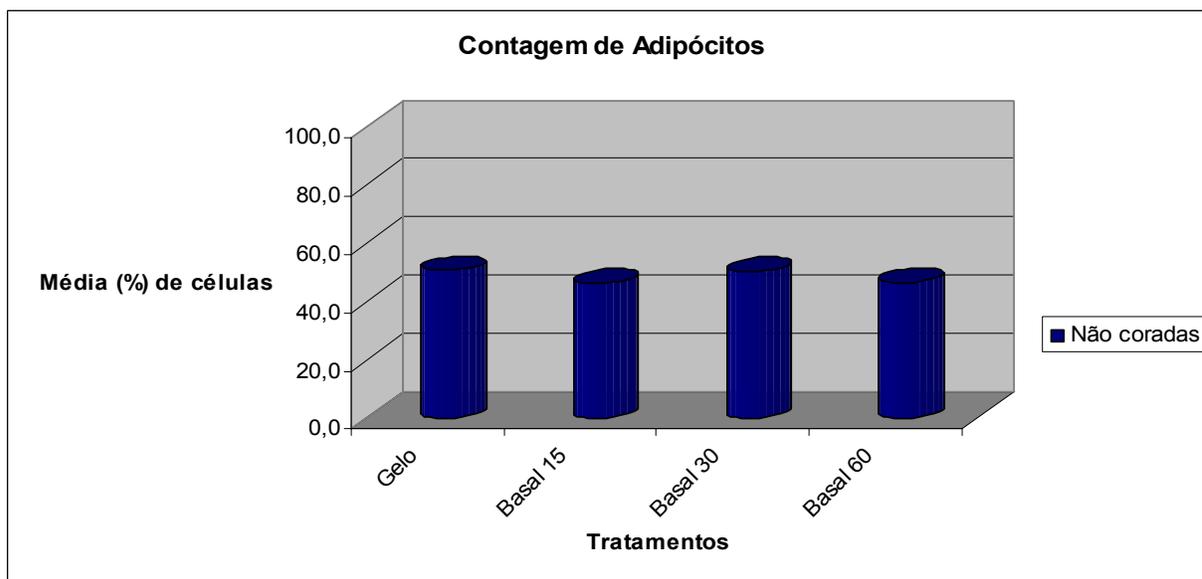


Figura 13 – Contagem de células não coradas (Gelo / Basal 15, 30 e 60 minutos).

Na figura 13 podemos observar uma maior porcentagem de células não-coradas no gelo e uma quantidade muito próxima de células não coradas no basal 30 minutos.

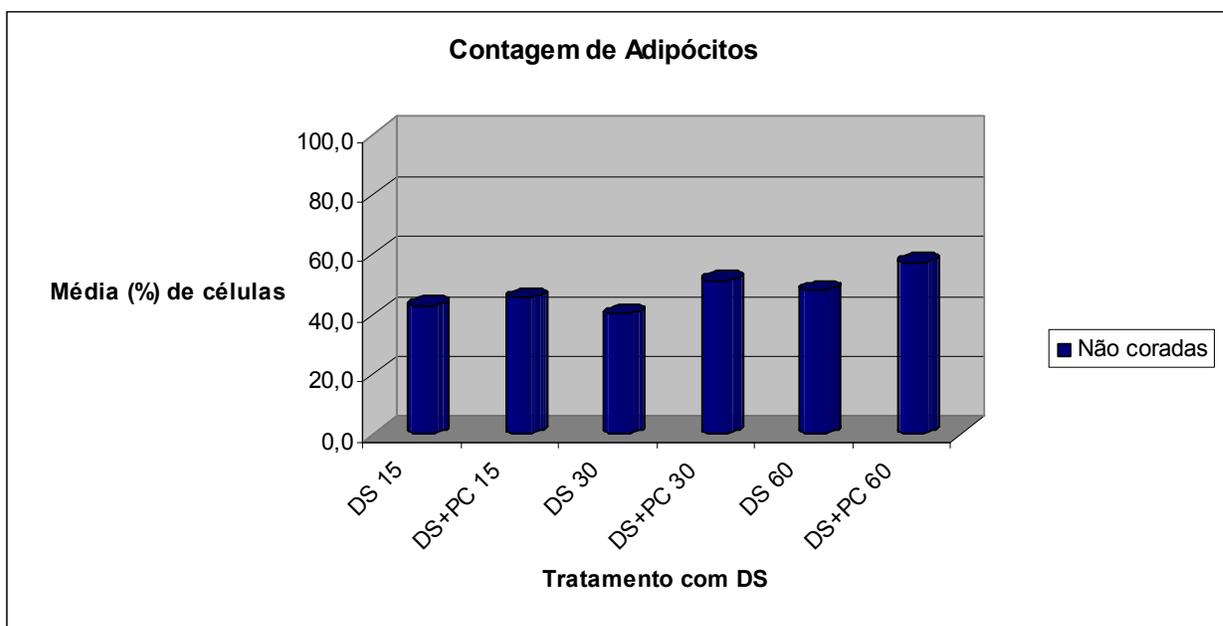


Figura 14 – Contagem de células não coradas (DS / DS + PC nos tempos 15, 30 e 60 minutos).

Na figura 14 observamos que o tratamento de DS + PC teve um aumento gradual de células não-corada nos tempos 15, 30 e 60 minutos, demonstrando-se mais eficiente que o tratamento somente com o DS.

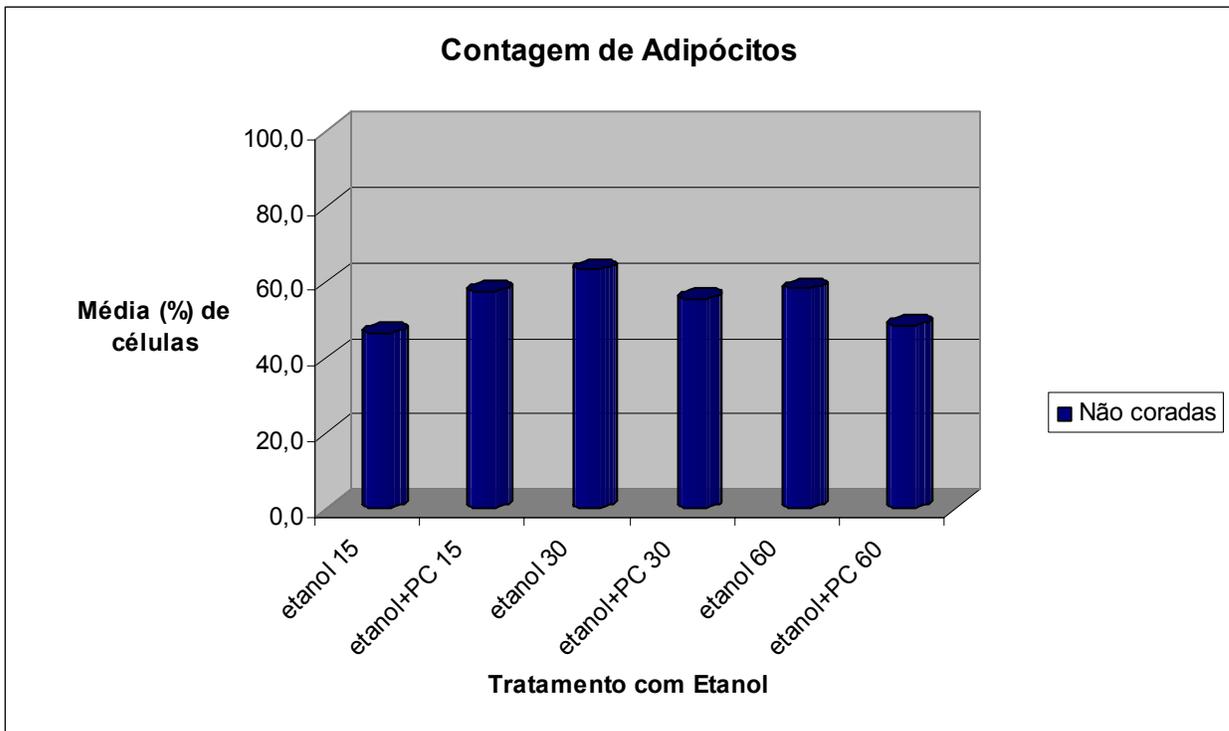


Figura 15 – Contagem de células não coradas (Etanol / Etanol + PC nos tempos 15, 30 e 60 minutos).

Quando utilizado somente o etanol como tratamento podemos observar um melhor efeito nos tempos 30 e 60 minutos, porém temos um efeito oposto no tempo de incubação de 15 minutos, onde o etanol + PC tem um efeito considerado melhor (Figura 15).

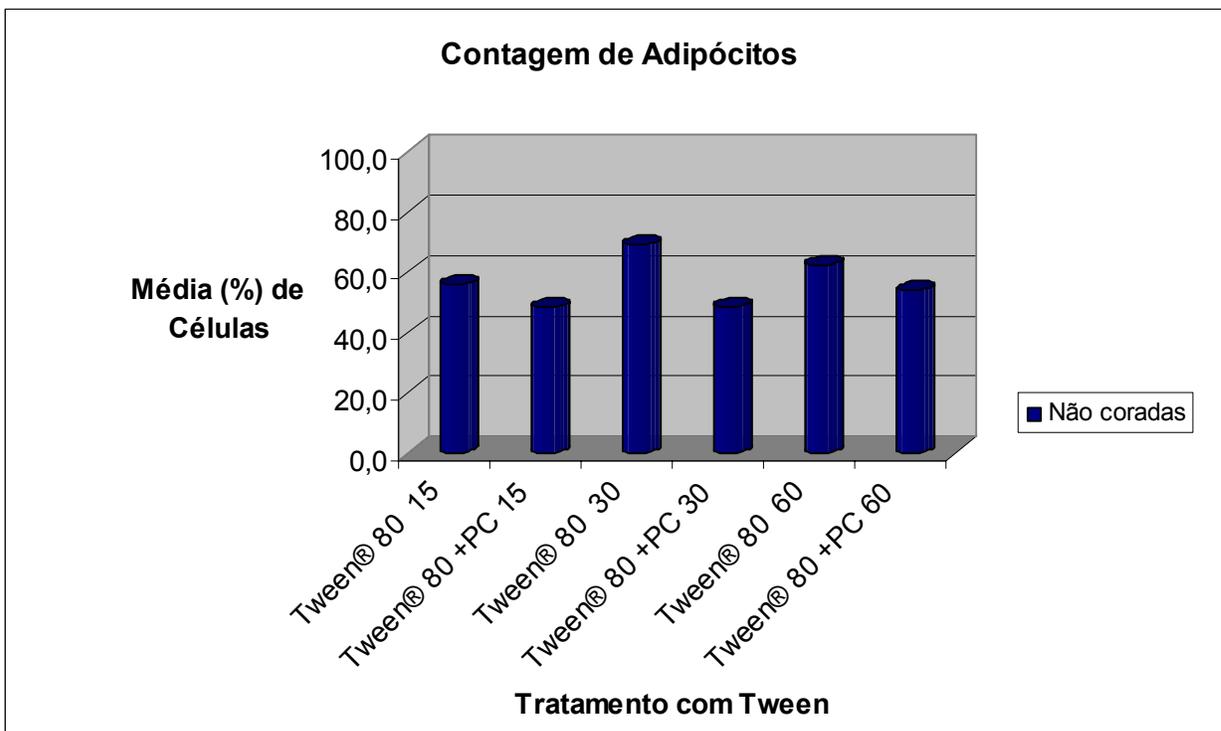


Figura 16 – Contagem de não coradas (Tween / Tween + PC nos tempos 15, 30 e 60 minutos).

No tratamento onde foi utilizado, somente o detergente Tween® 80, obtivemos uma maior porcentagem de células não coradas se comparado com o Tween® 80 + PC (Figura 16).

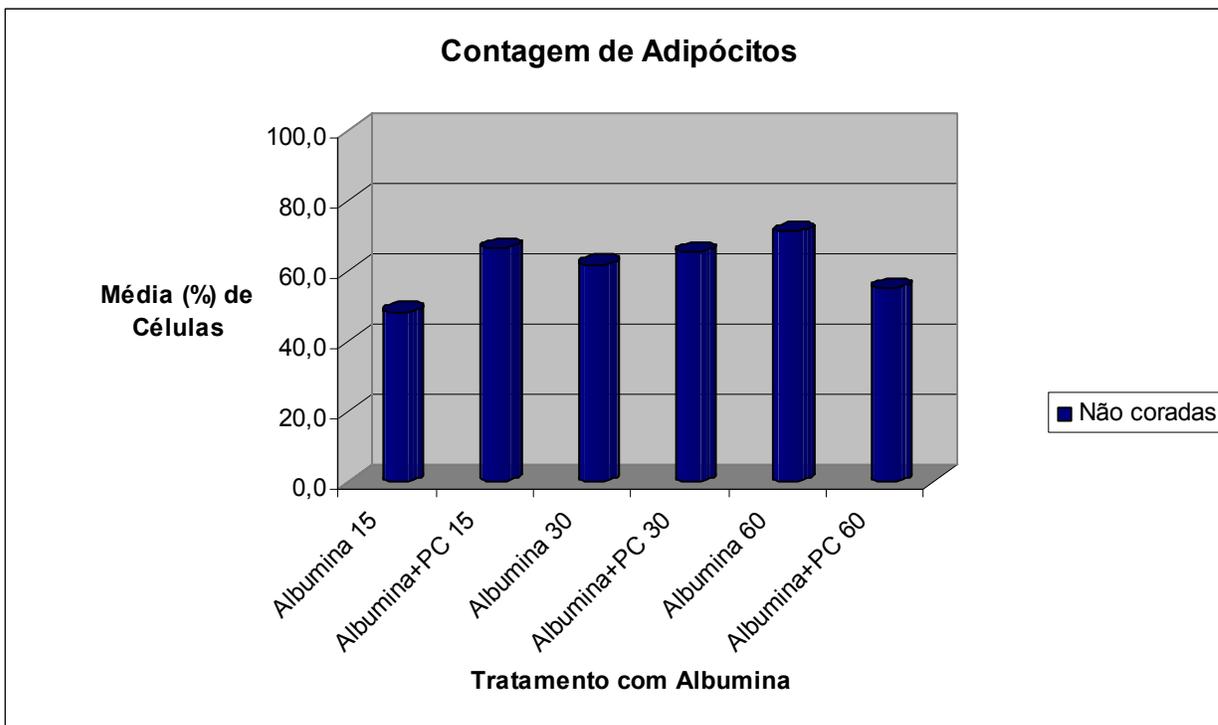


Figura 17 – Contagem de células não coradas (Albumina / Albumina + PC nos tempos 15, 30 e 60 minutos).

Quando utilizado o tratamento com albumina percebemos que os tratamentos com PC nos tempos 15 e 30 tiveram um efeito superior ao da albumina utilizada sozinha e um efeito contrário pode ser observado no tempo de incubação de 60 minutos (albumina > albumina + PC) (Figura 17).

Sendo assim, ao compararmos os diferentes tratamentos pelo método de contagem dos adipócitos, observamos que: o DS + PC teve um melhor resultado se comparado com o DS; já o etanol teve um resultado satisfatório nos tempos 30 e 60 minutos e também no tratamento de etanol + PC (15 minutos); com o detergente Tween® 80 (15, 30 e 60 minutos) observou-se um melhor resultado

quando este não foi solubilizado a PC e por último analisamos a albumina obtendo resultado satisfatório no uso desse tratamento no tempo de 60 minutos e também quando associada a PC (15 e 30 minutos).

Nos artigos utilizados para a revisão bibliográfica, observamos que dois deles, utilizaram DS para a realização dos experimentos. Em Rotunda et al, 2004 os autores utilizaram DS mais PC e chegaram a conclusão que o DS é o maior componente ativo da fórmula. E afirmaram que só chegaram a essa conclusão baseado no fato de que os sais biliares são potentes solubilizadores das membranas celulares. Já ODO et al.,2007, utilizou somente o DS e afirmou que houve dissolução de gordura quando diluiu o DS a 1% e a 2,5%. Em Hexsel et al., a PC foi utilizada pura e também diluída em solução salina (0,9%), já no estudo de Ablon & Rotunda, optou-se pelo uso de uma fórmula adquirida pronta que continha sódio em sua composição ambos os autores relataram redução das medidas nas áreas tratadas.

6. CONCLUSÃO

Após analisarmos os dados de liberação de glicerol através do teste T e do Anova seguida de Tukey, Bonferroni e Dunnett e da microscopia de captura de imagem (viabilidade celular), concluímos que: nos tratamentos em meio de incubação de 15 minutos foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em Basal x Tween® 80 e em Basal x Tween® 80 + PC. Em Dunnett observou-se diferença estatística entre os tratamentos Basal x Tween® 80. Já no meio de incubação de 30 minutos encontramos diferença estatística ($p < 0,05$) somente em Basal x DS + PC. Nos tratamentos em meio de incubação 60 minutos, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Sendo assim, o tratamento que obteve maior quantidade de glicerol produzido foi o Tween® 80 e Tween® 80 + PC no tempo de incubação de 15 minutos e o DS + PC no tempo de incubação de 30 minutos.

Ao compararmos os diferentes tratamentos pelo método de contagem dos adipócitos, observamos que: o DS quando solubilizado a PC teve um melhor resultado se comparado com o DS (15, 30 e 60 minutos); já o etanol teve um

resultado satisfatório nos tempos 30 e 60 minutos e também no tratamento de etanol + PC (15 minutos); com o detergente Tween® 80 (15, 30 e 60 minutos) o efeito foi oposto do que ocorreu com o DS (Tween® 80 > Tween® 80 + PC) e por último analisamos a albumina obtendo resultado satisfatório no uso desse tratamento no tempo de 60 minutos e também quando associada a PC (15 e 30 minutos).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução no30** (Internet). Brasil: D.O.U., 2003. Disponível em: <http://www.e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=6847>.

ABLON, G.; ROTUNDA A. M. **Treatment of lower eyelid fat pads using phosphatidylcholine: Clinical trial and review.** *Dermatol Surg* 2004; 30: 422-27.

BERNARDI, F.; CICHELERO, C.; VITOLO, M. R.. **Comportamento de restrição alimentar e obesidade.** *Rev. Nutr., Campinas*, v. 18, n. 1, 2005.

BOUCHARD, C. **Physical Activity and Obesity.** *Human Kinetics Publishers, Inc.*, 2000.

BLUMENKRANTZ, M. **Obesity: the world's metabolic disorder [online].** Beverly Hills, 1997. Available from WWW: <URL: <http://www.quantumhcp.com.obesity.htm/>>.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** 3° ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, Cap.6: Lipídeos e membranas. p. 202-35.

CREGE, D. R. X. O. **Implantação da técnica de estudo funcional de adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos eutróficos e quantificação da produção de lactato.** São Paulo, 2007. [Tese de mestrado – Universidade Estadual de Campinas].

COLEMAN W. P., et al., **Guidelines of care for liposuction.** *J. Am. Acad. Dermat.* 2001; 45 (3): 438-447.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. **Tecido adiposo e adipocinas.** *Acta Med Port,* 2006; 19: 251-256.

DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B. C.; JAEGER, M. M. M.; MATSON, E.
Avaliação da citotoxicidade de dois sistemas adesivos. *Rev Odontol Univ São Paulo,* v. 12, n. 4, p. 375-382, out./dez. 1998.

DUNCAN, D.I.; HASENGSCHWANDTNER, F. **Lipodissolve for subcutaneous fat reduction and skin retraction.** *Aesthet Surg J* 2005;25:530–43.

FAINTRENIE, G.; GÉLOËN, A. **Lactate production by white adipocytes in relation to insulin sensitivity.** *Am. J. Physiol.,* v. 270(*Cell Physiol.* 39), p. C1061-C1066, 1996b.

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

FRANCISCHI, R. P. P. et al., **Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento.** *Rev. Nutr.,* Campinas, v. 13, n. 1, 2000.

HALPERN. A.; MANCINI, M. C. **Como diagnosticar e tratar obesidade.** *Rev. Bras. Med.,* São Paulo, 54 (63): 151-160, 1998.

HASENGSCHWANDTNER, F. **Phosphatidylcholine treatment to induce lipolysis.** *Journal of cosmetic dermatology* 2005; 4, 308-313.

HEXSEL, D. et al., **Phosphatidylcholine in the treatment of localized fat.** *J Drugs Dermatol* 2003;2:511-8.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia,** São Paulo: Rocca, ed. n° 9: 468 – 469, 1998.

MÔLE, B. **Phosphatidylcholine lipolysis-lipodissolve: myth or reality ?** *Annales de chirurgie plastique esthétique* 2006; 51:178-181.

MONDINI, L.; MONTEIRO, C. A.; COSTA, R. B. L. **Mudanças na composição e adequação da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996).** *Ver. Saúde Pública,* São Paulo, 34 (3):251-258, 2000.

ODO, M. E. Y. et al.; **Action of sodium deoxycholate on subcutaneous human tissue: Local and systemic effects.** *Dermatol surg.* 2007; 33:178-189.

PINHEIRO, A. R. O.; FREITAS, S. F. T.; CORSO, A. C. T.. **Uma abordagem epidemiológica da obesidade.** *Rev. Nutr.,* Campinas, v. 17, n. 4, 2004.

RITTES, P. G. **The use of phosphatidylcholine for correction of lower lid bulging due to prominent fat pads.** *Dermatol Surg* 2001; 27:391-2.

RITTES, P. G. **The use of phosphatidylcholine for correction of localized fat deposits.** *Aesthet Plast Surg* 2003;27:315-8.

RITTES, P. G. et al.; **Injection of phosphatidylcholine in fat tissue: Experimental Study of local action in rabbits.** *Aesth Plast. Surg.* 2006; 30:474-78.

RODBELL M. **Metabolism of isolated fat cells – Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.** *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 375-380.

ROTUNDA, A. M. et al.; **Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution.** *Dermatol Surg* 2004 July; 30: 1001–8.

ROTUNDA, A. M.; KOLODNEY, M. S. **Mesotherapy and Phosphatidylcholine Injections: Historical Clarification and Review.** *Dermatologic Surgery* 2006; 32:4, 465-480.

SALLES, A. G. et al.; **Histologic response to injected phosphatidylcholine in fat tissue: Experimental study in a new rabbit model.** *Aesth Plast. Surg.* 2006; 30:479-84.

SAWAYA, A. L. **Desnutrição urbana no Brasil em um período de transição.** São Paulo: Cortez, 1997.

VASQUES, F.; MARTINS, F. C.; AZEVEDO, A. P. **Aspectos psiquiátricos do tratamento da obesidade.** *Rev. psiquiatr. clín.*, São Paulo, v. 31, n. 4, 2004.

YOUNG, V. L. **Lipostabil: the effect of phosphatidylcholine on subcutaneous fat.** *Aesthet Surg J* 2003;23:413–7.