

EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS JOVENS E VELHOS SUPLEMENTADOS COM DIETA HIPERLIPIDICA

AMANDA DE PAIVA TAVARES¹; JOAO ALVARADO RINCON², DRIELE NESKE GARCIA³; CARLOS CASTILHOS BARROS⁴; SANDRA COSTA VALLE⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – amandata95@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – joaoal13@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – barros_cc@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – sandracostavalle@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é uma condição fisiológica que ainda não tem seus mecanismos bem definidos e descritos na literatura. Sabe-se que entre os fatores que atuam nesse processo estão o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) que tem seus níveis reduzidos com o envelhecimento humano (MARI, 2011). Camundongos submetidos a restrição calórica tem níveis reduzidos de IGF-1 são extremamente sensíveis a insulina e apresentam um prolongamento da expectativa de vida de até 40% (MASORO, 2005).

Além disso, com o envelhecimento ocorre um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, que estão diretamente associadas ao nível de adiposidade corporal visto que o tecido adiposo branco é responsável pela secreção destas citocinas (MCARDLE et al, 2013). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma das mais importantes citocinas do tecido adiposo, sendo que o aumento da TNF- α induz a redução da sensibilidade a insulina (HOTAMISLIGIL, 1999). Desta forma indicando uma ligação entre o envelhecimento, a inflamação e a sensibilidade a insulina.

Por outro lado, a dieta hiperlipídica associada a fatores genéticos é considerada um fator importante para o aumento da adiposidade e resulta no aumento dos níveis de TNF- α (ROSINI et al, 2012). O tecido adiposo é um dos órgãos que tem maior concentração de receptores de IGF-1, sendo um alvo importante também do GH (BARRYMAN et al, 2013).

Com base nestas evidencias, este estudo objetivou analisar a expressão dos genes do IGF-1 e do TNF- α no tecido adiposo visceral de camundongos jovens e velhos alimentados com uma dieta hiperlipídica.

2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPel sob o número 9106. Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, sendo nove fêmeas jovens com aproximadamente 4 meses de idade e 13 fêmeas velhas com 13-14 meses de idade. As fêmeas foram divididas em quatro grupos: grupo 1 formado por cinco fêmeas jovens com dieta normal (grupo controle); grupo 2 por cinco fêmeas jovens com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica; grupo 3 por cinco fêmeas velhas com dieta normal (grupo controle); e o grupo 4 formado por cinco fêmeas velhas com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica.

As dietas foram elaboradas segundo a AIN-93. Para a dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica experimental foi adicionado 120g de banha de porco e 10g colesterol em substituição a 191g de amido de milho para cada 1kg da ração normal da AIN-93. As dietas foram fornecidas por 55 dias após o período de adaptação.

Para este estudo foi utilizado o tecido adiposo previamente coletado e congelado. Os tecidos e órgãos foram lavados em solução salina e armazenados em um tubo (1 tubo por fêmea), adicionados de 0,5mL de Trizol, homogenizados e congelados a -80°C. A extração do RNA foi feita pelo método do Trizol, conforme o seu protocolo. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total com transcriptase reversa (iScript, Biorad) utilizando-se como iniciadores nucleotídeos hexâmeros aleatórios (RH). Após síntese de cDNA, as amostras foram submetidas a análise de PCR em tempo real para análise da expressão dos genes TNF- α e IGF-1 usando o B2M como controle interno (o método comparativo do ciclo limiar - Ct). A qPCR foi realizada no equipamento ECO Ilumina Real Time PCR (Ilumina) usando-se 100 nM de cada primer e 20 ng de cDNA, utilizando o SYBR Green como reagente da PCR.

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad para analisar o efeito da dieta, da idade e interação dieta e idade através de Two-way ANOVA. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esperava-se encontrar um aumento dos níveis de TNF- α no tecido adiposo dos animais tendo em vista que o envelhecimento tem como característica o processo inflamatório crônico e que o aumento da adiposidade leva ao aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (GEHRKE; PEREIRA, 2007). Porém neste estudo não foram encontrados um aumento significativo na expressão do gene TNF- α em todas as interações analisadas.

Por outro lado, o IGF-1 é um hormônio que tem sua síntese ativada pelo GH no fígado e atua como mediador na proliferação e diferenciação celular. Grande parte dos níveis circulantes de IGF-1 é encontrada no tecido adiposo (GARTHEN et al, 2012). No presente estudo não houve uma relação significativa entre o tipo de dieta consumida (hiperlipídica) e a alteração desse hormônio embora em outros estudos, como o de SEIVA (2011) tenha sido verificado um aumento do nível deste hormônio em animais que consumiram uma dieta hiperlipídica. Os dois trabalhos diferem no período de tempo em que os animais receberam esta dieta, o que pode vir a justificar o resultado apresentado, considerando que os animais deste estudo receberam a dieta por 55 dias enquanto os animais do estudo de SEIVA receberam a dieta por 75 dias.

Quando analisado o fator idade nos grupos que receberam a dieta padrão, foi encontrado uma redução ($P < 0,05$) da expressão de IGF-1 no tecido adiposo de animais velhos em comparação aos jovens. Isto indica mais uma vez, que o IGF-1 está diretamente relacionado com o envelhecimento. Nos experimentos de VESTERGAARD et al. (2013) e YUAN et al. (2009) foram encontrados resultados correspondentes ao presente estudo e ainda foi feita a análise sobre a influência do IGF-1 na expectativa de vida em camundongos, resultando no aumento da expectativa de vida quando os valores de IGF-1 estão reduzidos e acelerando o envelhecimento quando seus valores estão aumentados. Os mecanismos que levam ao envelhecimento ainda não estão bem esclarecidos porém há a indicação de que quando jovem o animal tem seu envelhecimento acelerado até

atingir determinada idade onde os níveis de IGF-1 diminuem e o processo de envelhecimento se encontra atenuado.

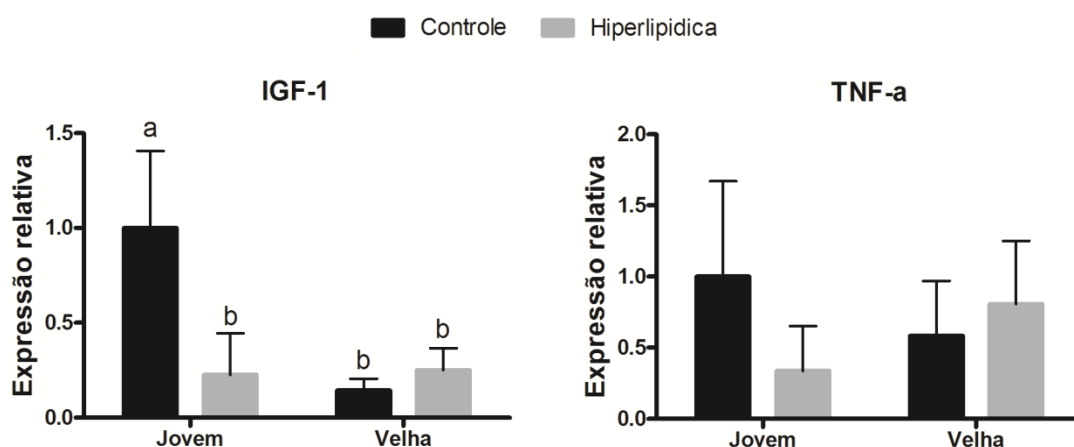


Figura 1. Resultado da expressão do gene IGF-1 e TNF- α no tecido adiposo de camundongos. a,b – letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

4. CONCLUSÕES

A expressão de IGF-1 foi reduzida em camundongos mais velhos ou que receberam uma dieta hiperlipídica. Não foi observada alteração na expressão de TNF- α entre dietas ou idades.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARI, D. Role of the IGF/insulin system in longevity. **Minerva Endocrinologica**. v.36 n.3 p.181-5, 2011.
- MASORO E. J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development** n.126 p.913–922, 2005.
- MCARDLE, M. A., FINUCANE, O. M., CONNAUGHTON, R. M., MCMORROW, A. M., ROCHE, H. M. Mechanisms of obesity induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**. v.4 n.52, 2013.
- HOTAMISLIGIL G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**. v.107 n.2 p.119-25, 1999.
- ROSINI T. C., SILVA A. S. R., MORAES C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.58 n.3, 2012.
- BERRYMAN E. D., GLAD A. M. C., LIST O. E., JOHANNSSON G. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. **Nature Reviews Endocrinology**. v.9 p.346-356, 2013.
- GEHRKE J., PEREIRA R. Z. Associação do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) com a Obesidade. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**. v.1 n.1 p.1-10, 2007.

GARTEN A., SCHUSTER S., KIESS W. The Insulin-Like Growth Factors in Adipogenesis and Obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 41 n.2 p.283-295, 2012.

SEIVA F R F. **A Bioquímica do Envelhecimento e Obesidade**. 2011. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

VESTERGAARD P. F., HANSEN M., FRYSTYK J., ESPELUND U., CHRISTIANSEN J. S., JORGENSEN J. O. L., FISKE S. Serum levels of bioactive IGF1 and physiological markers of ageing in healthy adults. **European Journal of Endocrinology**. v.170 n.2 p.229-236, 2013.

YUAN R, TSAIH S-W, PETKOVA SB, et al. Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. **Aging cell**. v.8 n.3 p.277-287, 2009.