

EMBARGO

Por solicitação da Autora, o
texto completo dessa
Dissertação está embargada
por **24 meses**, com início
após a data da defesa
(25/05/2022)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

FRANCIELE RODRIGUES MACEDO

**AUMENTO DA CELULARIDADE MIELOIDE E ADIPOSIDADE
MEDULAR EM RATOS OBESOS COM HIPERLEPTINEMIA**

Araçatuba

2022

FRANCIELE RODRIGUES MACEDO

**AUMENTO DA CELULARIDADE MIELOIDE E
ADIPOSIDADE MEDULAR EM RATOS OBESOS COM
HIPERLEPTINEMIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Araçatuba

2022

M141a Macedo, Franciele Rodrigues
Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos
obesos com hiperleptinemia / Franciele Rodrigues Macedo. --
Araçatuba, 2022
51 f. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Paulo César Ciarlini

1. Hematopoiese. 2. Medula óssea. 3. Hemograma. 4. Obesidade. 5.
Leptina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia

AUTORA: FRANCIÉLE RODRIGUES MACEDO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO - Ourinhos

Araçatuba, 25 de maio de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia

AUTORA: FRANCIÉLE RODRIGUES MACEDO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO Ourinhos

Araçatuba, 25 de maio de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia

AUTORA: FRANCIÉLE RODRIGUES MACEDO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Almeida
Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO - Ourinhos

Araçatuba, 25 de maio de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdemar (em memória) e Celina, e aos meus irmãos Sueli, Luciana e Vinicius por todo amor, carinho, apoio e incentivo que recebi durante a elaboração deste trabalho. O laço mais lindo da vida é a união de uma família. Gratidão por tudo que fizeram por mim. Amo incondicionalmente vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, suporte e incentivo para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, por toda dedicação, paciência e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para realização do trabalho. Processo nº 2019/22881-5.

Aos Prof. Dr. Fabiano Antonio Cardioli, Prof^a. Dr^a. Suely Regina Mogami Bomfim, Prof^a. Dr^a. Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune e Prof. Dr. Breno Fernando Martins de Almeida pela presença na banca examinadora, ensinamentos e contribuições para este trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório Clínico Veterinário - FMVA/UNESP, pelos longos dias de trabalho, dedicação e amizade, em especial ao Murilo, que colaborou em diversas etapas deste trabalho.

Ao meu namorado Raphael por todo apoio e palavras de incentivo e ao meu cachorro Théo (em memória) por ter sido meu suporte emocional.

Aos meus amigos e todos que colaboraram direta e indiretamente para a conclusão de mais uma vitória.

A todos meu sincero e profundo obrigado!

**“A sabedoria não vem do acerto, mas sim do aprendizado
com os erros”**

Monja Coen

MACEDO, F. R. **Aumento da celularidade mieloide e adiposidade medular em ratos obesos com hiperleptinemia**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A obesidade e suas complicações estão cada vez mais frequente na população humana e animal. Complicações relacionadas à obesidade têm sido reproduzidas em roedores, porém não há concordância quanto às alterações hematológicas associadas ao aumento de leptina plasmática e de adipócitos na medula óssea (MO). O objetivo do presente trabalho foi investigar a hipótese de que em ratos obesos com hiperleptinemia ocorre o aumento da adiposidade da MO, altera a celularidade medular e sangue periférico. Um estudo experimental controlado e cego foi realizado com 30 ratos Wistar divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (C) e obeso (Ob). A obesidade foi induzida com dieta hipercalórica. Após 120 dias de tratamento, a concentração aumentada de leptina plasmática, índice de Lee e Índice de Massa Corporal (IMC) foram adotados como critérios para exclusão do grupo C (n= 15) e de inclusão no grupo Ob (n= 15). Em ratos obesos a porcentagem de gordura da MO foi significativamente maior ($p<0,05$). Este aumento da adiposidade medular teve correlação positiva com o aumento da relação M:E ($r=0,7794$, $p=0,0047$) e leptina plasmática ($r=0,7760$, $p=0,0083$). As alterações da MO associadas à obesidade e hiperleptinemia não promoveram alteração no perfil hematológico do sangue periférico. Concluiu-se que o acúmulo de gordura na MO de ratos Wistar obesos com hiperleptinemia aumenta a população de células mieloide sem comprometer outras linhagens e o perfil hematológico do sangue periférico.

Palavras-chave: Hematopoiese. Medula óssea. Hemograma. Obesidade. Leptina.

MACEDO, F. R. **Increased myeloid cellularity and medullary adiposity in obese rats with hyperleptinemia.** 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Obesity and its complications are increasingly frequent in human and animal populations. Obesity-related complications have been reproduced in rodents, but there is no agreement on the hematological changes associated with increased plasma leptin and adipocytes in bone marrow (BM). The objective was to investigate the hypothesis that in obese rats with hyperleptinemia, increased adiposity of BM alters bone marrow cellularity and peripheral blood. A controlled, blinded experimental study was performed with 30 Wistar rats randomly divided into two groups: control (C) and obese (Ob). Obesity was induced with a hypercaloric diet. After 120 days of treatment, increased plasma leptin concentration, Lee index and Body Mass Index (BMI) were adopted as criteria for exclusion from group C (n= 15) and for inclusion in group Ob (n= 15). In obese rats the fat percentage of the BM was significantly higher ($p<0.05$). This increased medullary adiposity had a positive correlation with increased M:E ratio ($r=0.7794$, $p=0.0047$) and plasma leptin ($r=0.7760$, $p=0.0083$). The changes in BM associated with obesity and hyperleptinemia did not promote changes in the hematological profile of peripheral blood. It was concluded that fat accumulation in the BM of obese Wistar rats with hyperleptinemia increases the myeloid cell population without compromising other lineages and the hematological profile of peripheral blood.

Keywords: Hematopoiesis. Bone marrow. CBC. Obesity. Leptin.

APÊNDICE A “Referências da Introdução Geral”

- ADLER, B. J.; KAUSHANSKY, K.; RUBIN, C. T. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and bone marrow niche. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 10, n. 12, p. 737–748, 2014.
- 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.**, v. 6, n. 9, p. 1170–1180, 1996.
- BENOVA, A.; TENCERONA, M. Obesity-Induced changes in bone marrow homeostasis. **Front. Endocrinol.**, v. 11, p. 294, may. 2020.
- BOLUS, W. R.; PETERSON, K. R.; HUBLER, M. J.; KENNEDY, A. J.; GRUEN, M. L.; HASTY, A. H. Elevating adipose eosinophils in obese mice to physiologically normal levels does not rescue metabolic impairments. **Mol. Metab.**, v. 8, p. 86–95, 2018.
- BORNSTEIN, S.; MOSCHETTA, M.; KAWANO, Y.; SACCO, A.; HUYNH, D.; BROOKS, D. et al. Metformin affects cortical bone mass and marrow adiposity in diet-induced obesity in male mice. **Endocrinol.**, v. 158, n. 10, p. 3369–3385, 2017.
- CALIXTO, M. C.; LINTOMEN, L.; SCHENKA, A.; SAAD, M. J.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Br. J. Pharmacol.**, v. 159, n. 3, p. 617–625, 2010.
- CAWTHORN, W. P.; SCHELLER, E. L.; LEARMAN, B.S.; PARLEE, S. D.; SIMON, B.R.; MORI, H.; et al. Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction. **Cell Metab.**, v. 20, n. 2, p. 368–375, 2014.
- CLAYCOMBE, K.; KING, LE.; FRAKER, P. J. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. **PNAS.**, v. 105, n. 6, p. 2017–2021, 2008.
- DA SILVA, S. V.; RENOVATO-MARTINS, M.; RIBEIRO-PEREIRA, C.; CITELLI, M.; & BARJA-FIDALGO C. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. **Obesity**, v. 24, n. 12, p. 2522–2532, 2016.

DIB, L. H., ORTEGA, M. T., FLEMING, S. D., CHAPES, S. K., & MELGAREJO, T. Bone Marrow Leptin Signaling Mediates Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation in Male Mice. **Endocrinol.**, v. 155, n. 1, p. 40–46, 2014.

DO CARMO, L. S.; ROGERO, M. M.; PAREDES-GAMERO, E. J.; NOGUEIRA-PEDRO, A.; XAVIER, J. G.; CORTEZ, M.; BORGES, M. C.; FUJII, T. M.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in wistar rats. **Exp. Biol. Med.**, v. 238, n. 4, p. 375–384, 2013.

FEIJÓ, G. S. et al. Food Selection of Cafeteria Diet Affects Memory Dysfunction Related to Obesity. **Neurochem. Res.**, v. 44, n. 8, p. 1869–1877, 2019.

GALLAGHER, K. A.; JOSHI, A.; CARSON, W. F.; SCHALLER, M.; ALLEN, R.; MUKERJEE, S. et al. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1420–1430, 2014.

GREER, J. P. **Windrobe's Clinical hematology**. 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. 2019. p. 1–2312.

HALADE, G. V.; EL JAMALI, A.; WILLIAMS, P. J.; FAJARD, R. J.; FERNANDES, G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. **Exp. Gerontol.**, v. 46, n. 1, p. 43–52, 2011.

HERISHANU, Y.; ROGOWSKI, O.; POLLIACK, A.; MARILUS R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. **Eur. J. Haematol.**, v. 76, n. 6, p. 516–520, 2006.

HINDORF, C.; GLATTING, G, CHIESA, C.; LINDEN, O.; FLUX, G.; COMMITTEE, E.D. EANM Dosimetry Committee guidelines for bone marrow and wholebody dosimetry. **Eur. J. Nucl. Med. Mol Imaging.**, v. 37, p. 1238–1250, 2010.

HOUSEKNECHT, K. L.; MANTZOROS, C. S.; KULIAWAT, R. et al. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1638–1643, 1996.

LAHARRAGUE, P.; OPPERT, J. M.; BROUSSET, P.; CHARLET, J. P.; CAMPFIELD, A.; FONTANILLES, A. M. et al. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34 + progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. **Int. J. Obes.**, v. 24, n. 9, p. 1212–1216, 2000.

LECKA-CZERNIK B. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. **Bone**, v. 50, n. 2, p. 534–539, 2012.

LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. Obesity, Inflammation and Diet. **PGHN**, v. 16, n. 3, p. 143-152, set. 2013.

LUO, Y.; CHEN, G. L.; HANNEMANN, N.; IPSEIZ, N.; KRONKE, G.; BAUERLE, T. et al. Microbiota from obese mice regulate hematopoietic stem cell differentiation by altering the bone niche. **Cell Metab.**, v. 22, p. 886–894, 2015.

MATSUSHITA, K.; DZAU, V. J. Mesenchymal stem cells in obesity: insights for translation application. **Lab. Invest.**, v. 97, n. 10, p. 1158–1166, 2017.

MORRIS, V. M.; EDWARDS, M. C. Adipokines, adiposity and bone marrow adipocytes: dangerous accomplices in multiple myeloma. **J. Cell. Physiol.**, v. 233, p. 9159–9166, 2018.

STYNER, M.; THOMPSON, W. R.; GALIOR, K.; UZER, G.; WU, X.; KADARI, S. et al. Bone marrow fat accumulation accelerated by high fat diet is suppressed by exercise. **Bone**, v. 64, p. 39–46, 2014.

TRITOS, N. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin: its role in obesity and beyond. **Diabetologia**, v. 40, n. 12, p. 1371–1379, 1997.

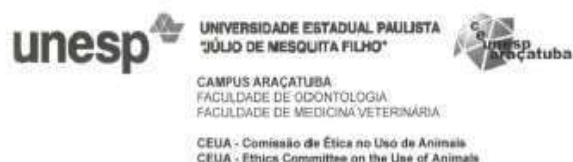
VERA, R. H.; VILAHUR, G.; BADIMON, L. Obesity with insulin resistance increase thrombosis in wild-type and bone marrow-transplanted Zucker fatty rats. **J Tromb. Haemost.**, v. 109, n. 02, p. 319–327, 2013.

VUONG, J.; QIU, Y.; LA, M.; CLARKE, G.; SWINKELS, D. W.; CEMBROWSKI, G. Reference intervals of complete blood count constituents are highly correlated to waist circumference: should obese patients have their own “normal values?”. **Am. J. Hematol.**, v. 89, n. 7, p. 671–677, 2014.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, p. 157–168, 2000.

WILSON, C. A.; BEKELE, G.; NICOLSON, M.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. **Br. J. Haematol.**, v.99, n. 2, p. 447–451, 1997.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Eficácia do chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado no controle de estresse oxidativo, obesidade e lesão óssea em ratos Wistar". Processo FOA nº 00545-2017, sob responsabilidade de Paulo Cesar Ciarlini apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Julho de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Dezembro de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 31 de Janeiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Efficacy of decaffeinated tea (*Ilex paraguariensis*) in the control of oxidative stress, obesity and bone lesion in Wistar rats", Protocol FOA nº 00545-2017, under the supervision of Paulo Cesar Ciarlini presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 05, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 31, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 31, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1150 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone: (18) 3636-3234 Email: CEUA@foa.unesp.br