

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

DOMWESLEY WENDREO DE SOUZA

**O EFEITO DA FENILHIDRAZINA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR
GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG)**

CASCAVEL-PR
(Outubro, 2021)

DOMWESLEY WENDREO DE SOUZA

**O EFEITO DA FENILHIDRAZINA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR
GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG)**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Prof.^a Dr^a Sabrina
Grassioli

CASCABEL-PR

(Outubro, 2021)

FICHA CATALOGRÁFICA

de Souza, Domwesley Wendreo

O EFEITO DA FENILHIDRAZINA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR
GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG) / Domwesley Wendreo de Souza;
orientadora Sabrina Grassioli. -- Cascavel, 2021.

69 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências
e Saúde, 2021.

1. . I. Grassioli, Sabrina, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DOMWESLEY WENDREO DE SOUZA O EFEITO DA FENILHIDRAZINA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG)

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. (a) Sabrina Grassioli
UNIOESTE

Prof. Dr. (a) Dionizia X. Scomparin
UEPG

Prof. Dr. (a) Patricia Orhlmeier Nassar
UNIOESTE

CASCADEL-PR
(Outubro/2021)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à ciência, que através de suas inúmeras descobertas deu suporte a hipótese empregada no presente estudo, a todos os pesquisadores, pela crença em seu conhecimento e capacidade e pela força em realizar suas atividades laborais em prol da construção de uma sociedade melhor, aos meus filhos, Benjamin Wendreo Amadeu de Souza e Lizye Wendy Amadeu de Souza, que a cada passo me motivam a buscar conhecimento e fortalecem minha coragem.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus familiares em especial minha mãe Sr.^a Silvana de F. dos Santos e minha sogra Sr.^a Dalva Gomes Amadeu, por cuidarem dos meus filhos Benjamin Wendreo Amadeu de Souza e Lizye Wendy Amadeu de Souza, assim como minha esposa Thainan Amadeu de Souza que nos últimos anos precisou afastar-se de suas atividades laborais e domésticas devido à instabilidade hemodinâmica decorrente de cardiopatia congênita. Sem o auxílio das Srs^a citadas anteriormente, eu não teria conseguido manter meu emprego e atividades de pesquisa realizadas para defesa do meu título de Mestre. Não menos importante, em segundo momento gostaria de agradecer a minha Orientadora Prof.^a Dr^a Sabrina Grassioli, pela calma, compreensão e ajuda na realização do desenvolvimento de todo o projeto de pesquisa. Sem a ajuda dessa profissional a defesa desta dissertação poderia não ter ocorrido. Ainda gostaria de agradecer aos colegas do grupo de pesquisa, assim como pesquisadores do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM) UNIOESTE, que compartilham da autoria do artigo submetido para defesa da titulação de Mestre. Agradeço ainda a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em particular ao Prof^o. Dr^o Antonio Carlos Boschero, pela disponibilidade em nos subsidiar intelectual e financeiramente. Finalmente, agradeço também a Deus por me manter de pé frente à guerra contra a COVID-19, sem ter sido contaminado ou ter contaminado alguém da minha família, assim como sou grato pela fé, que me deu forças para chegar até aqui.

RESUMO

DE SOUZA, D.W. O efeito da fenilhidrazina sobre a obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG). Total de páginas: 69. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2021.

A obesidade caracteriza-se pelo aumento da massa adiposa, acompanhado de um estado inflamatório crônico tendo repercussões deletérias sobre a homeostase do ferro, um quadro que parece estar relacionado a desajustes da disponibilidade e reciclagem de ferro, envolvendo o tecido hepático e esplênico. Indivíduos obesos tem maior incidência de anemia, portanto, nossa questão problema foi buscar descobrir se a administração de um agente anêmico poderia agravar a fisiopatologia da obesidade hipotalâmica? Deste modo, nosso objetivo foi avaliar o efeito da administração do agente anêmico fenilhidrazina (FHZ) sobre a adiposidade e estado metabólico de ratos com obesidade hipotalâmica induzida por glutamato monossódico. Para tal, a obesidade foi induzida pela administração de glutamato monossódico (MSG; 4g/Kg) no período neonatal (n=20 ratos machos). No mesmo período ratos controles (CON) receberam salina equimolar (n=20 ratos machos). Aos 70 dias de vida parte dos animais CON e MSG recebeu a administração de FHZ (40mg/Kg) ou salina (SAL; 0,9%) em três doses (0 h, 24 h, 32 h) formando quatro subgrupos: CON_{SAL}: ratos controles salina; CON_{FHZ}: ratos controles tratados com fenilhidrazina; MSG_{SAL}: ratos tratados com glutamato monossódico recebendo salina; MSG_{FHZ}: ratos tratados com glutamato monossódico recebendo fenilhidrazina (n=10/ratos/grupo). Dos 72 aos 90 dias de vida foi avaliado o peso corporal (g) e ingestão alimentar (g/g) de todos os grupos. Aos 92 dias de vida, e após 12h de jejum, os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado e o plasma separado para análises bioquímicas de ferro, glicose, triglicerídeos e colesterol total, assim como o sangue foi coletado em micro capilares para análise do hematócrito (Hct). Foram retirados, limpos e pesados, os depósitos de Tecido Adiposo Branco (TAB), assim como o Tecido Adiposo Marrom (TAM), baço e fígado, para análises histológicas. Os dados passaram pelos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, sendo a comparação entre dois grupos feita pelo teste t Student's, enquanto o teste Anova de duas vias com pós-teste de Tukey foi usado para análises de quatro grupos (p<0,05). Ratos MSG tratados apresentaram

maior adiposidade, resistência à insulina e hipertrigliceridemia, apresentando normalidade dos níveis do Hct e ferro plasmático em relação aos ratos CON. Ratos MSG_{FHZ} e CON_{FHZ} apresentaram redução do hematócrito e do ferro circulante assim como a elevação do peso do baço, confirmando a instalação de anemia hemolítica. Todavia, no grupo MSG_{FHZ} foi encontrado maior impacto sobre o Hct e glicemia, com repercussões sobre a adiposidade. Assim, menor teor de TAB subcutâneo e TAM, associado à redução de área e deposição de gordura foram encontrados em ratos MSG_{FHZ} em relação aos demais grupos. Portanto, ratos MSG-obesos não apresentam alterações do Hct e concentrações plasmáticas de ferro, sendo hábeis em responder a indução da anemia hemolítica, sem piorar o estado metabólico. Todavia, a anemia nesses animais provoca maiores efeitos deletérios sobre o Hct e glicemia, resultando em queda acentuada da massa adiposa branca e marrom, sugerindo maior efeito lipolítico.

Palavras-Chaves: adipócitos, anemia, ferro, fígado e baço.

ABSTRACT

DE SOUZA., D.W. The effect of phenylhydrazine on monosodium glutamate (MSG) induced obesity. Total de páginas:69. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2021.

Obesity is characterized by an increase in fat mass, accompanied by a chronic inflammatory state, which has deleterious effects on iron homeostasis, a condition that seems to be related to maladjustments in the availability and recycling of iron, involving the liver and splenic tissue. Obese individuals have a higher incidence of anemia, so our question was trying to find out if the administration of an anemic agent could aggravate the pathophysiology of hypothalamic obesity? Thus, our objective was to evaluate the effect of the administration of the anemic agent phenylhydrazine (FHZ) on the adiposity and metabolic state of rats with hypothalamic obesity induced by monosodium glutamate. For this purpose, obesity was induced by the administration of monosodium glutamate (MSG; 4g/kg) in the neonatal period (n=20 male rats). In the same period, control rats (CON) received equimolar saline (n=20 male rats). At 70 days of life, part of CON and MSG animals received administration of FHZ (40mg/Kg) or saline (SAL; 0.9%) in three doses (0 h, 24 h, 32 h) forming four subgroups: CONSAL: saline control rats; CONFHZ: control rats treated with phenylhydrazine; MSGSAL: rats treated with monosodium glutamate receiving saline; MSGFHZ: rats treated with monosodium glutamate receiving phenylhydrazine (n=10/rats/group). From 72 to 90 days of life, body weight (g) and food intake (g/g) of all groups were evaluated. At 92 days of life, and after 12 hours of fasting, the animals were euthanized, blood was collected and plasma separated for biochemical analysis of iron, glucose, triglycerides and total cholesterol, as well as blood was collected in micro capillaries for analysis of the hematocrit (Hct). The White Adipose Tissue (TAB) deposits, as well as the Brown Adipose Tissue (TAM), spleen and liver were removed, cleaned and weighed, for histological analysis. The data went through the assumptions of normality and homoscedasticity, with the comparison between two groups made using the Student's t test, while the two-way Anova test with Tukey's post-test was used for

analyses of four groups ($p < 0.05$). Treated MSG rats showed higher adiposity, insulin resistance and hypertriglyceridemia, with normal levels of Hct and plasma iron compared to CON rats. MSGFHZ and CONFHZ rats showed reduced hematocrit and circulating iron as well as increased spleen weight, confirming the onset of hemolytic anemia. However, in the MSGFHZ group a greater impact was found on Hct and glycemia, with repercussions on adiposity. Thus, lower levels of subcutaneous TAB and TAM, associated with area reduction and fat deposition were found in MSGFHZ rats compared to the other groups. Therefore, MSG-obese rats do not show changes in Hct and plasma iron concentrations, being able to respond to the induction of hemolytic anemia, without worsening the metabolic state. However, anemia in these animals causes greater deleterious effects on Hct and blood glucose, resulting in a marked decrease in white and brown fat mass, suggesting a greater lipolytic effect.

Key words: adipocytes, anemia, iron, liver, spleen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de regulação da homeostase férrica.....	14
Figura 2. Compreensão atual dos mecanismos moleculares de regulação da hepcidina.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-Coa	Acetil Coenzima A
ASC	Área Sobre a Curva
ATP	Adenosina Trifosfato
BMPs	Proteínas Morfogênicas Óssea
BMP6	Proteínas Morfogênicas Óssea 6
CAC	Ciclo do Ácido Cítrico
CEUA	Comitê de Experimentação Animal e Aulas Práticas da UNIOESTE
CON	Controle
CNA	Comprimento Naso-Anal
Cm	Centímetros
DCNT	Doenças Crônicas Não transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM	Diabete Mellitus
DM2	Diabete Mellitus tipo 2
DMT1	Transportador de Metal Divalente
DRC	Doença Renal Crônica
EPO	Eritropoietina
EPOr	Receptor de Eritropoietina
Fe ⁺²	Ferro Ferroso
Fe ⁺³	Ferro Férrico
FeTF	Saturação da Transferina

FHZ	Fenilhidrazina
FPN1	Receptores de Ferroportina 1
GH	Hormônio do Crescimento
GHS-Px	<i>Glutathione peroxidase</i>
G6P	Glicose Seis Fosfato
G6PD	Glicose Seis Fosfato Desidrogenase
g	Grama
g/g	Grama Por Grama de Peso
Hct	Hematócrito
HFE	Proteína de membrana HFE
H&E	Hematoxilina e Eosina
HJV	Hemojuvelina
HoloTf	Holotransferina
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrogênio
IGg	Imunoglobulina G
IDL	Índice de Lee
IL1	Interleucina-1
IL6	Interleucina-6
IL10	Interleucina-10
JAK-SATAT3	Janus Ativador da Transcrição/ Transdutor do Sinal Quinase
LAFEM	Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
M1	Macrófagos Classicamente Ativados

M2	Macrófagos Alternativamente Ativados
MSG	Glutamato Monossódico
MCP-1	Proteína Quimioatratora de Macrófagos
mm	Milímetros
ml	Mililitro
NA	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
NADP	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Reduzida
NF-kb	Fator Nuclear Kappa Beta
O ₂	Oxigênio
POMC	Pró-opiomelanocortina
PNS	Programa Nacional de Saúde
pE ₂	Prostaglandina E ₂
RI	Resistência Insulina
RPM	Rotações Por Minuto
RIE	Rádio Imuno Ensaio
SAL	Salina
SM	Síndrome Metabólica
SMADs	Proteínas intracelulares SMADs
SNC	Sistema Nervoso Central
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAB-I	Tecido Adiposo Branco-Inguinal
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TfR1	Receptor de transferina 1
TfR2	Receptor de transferina 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

VMH	Ventro Médial do Hipotálamo
XX	Século 20
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito telefônico
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo Geral	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 Obesidade	8
3.2 Anemia	11
3.3 Homeostase do ferro.....	12
3.4 Hepcidina, anemia e obesidade	16
3.5 A obesidade induzida por glutamato monossódico	19
3.6 A indução de anemia por fenilhidrazina.....	21
4. METODOLOGIA	25
4.1 Acasalamento e indução da obesidade:	25
4.2 Administração da Fenilhidrazina.....	25
4.3 Peso Corporal e Ingestão Alimentar	26
4.4 Análise do hematócrito.....	26
4.5 Eutanásia e Coleta de Tecidos e Sangue	27
4.6 Dosagens Bioquímicas Plasmáticas	27
4.7 Histologia	28
4.8 Análise Estatística	28
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	30
6. CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS	61
7. REFERENCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019), obesidade e sobrepeso são definições para o acúmulo excessivo de gordura corpórea que causa prejuízo à saúde. A obesidade é um dos fatores determinantes no desenvolvimento de comorbidades, como o aumento da pressão arterial, a perda da sensibilidade à insulina, problemas na secreção de insulina, hiperglicemia e prejuízo do metabolismo lipídico (GUH, 2009; BALSAN, 2015; FARHANGI; VAJDI, 2020). Frequentemente, essas comorbidades são reunidas na Síndrome Metabólica (SM), uma condição diretamente envolvida com o desenvolvimento das mais frequentes Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), em especial a hipertensão e o diabetes (OMS, 2019; VIGITEL, 2018).

No mundo todo, as DNCT representam a maior causa de morte, sendo responsável por cerca de 38 milhões de mortes em 2012. Segundo estimativas, em 2030 as DCNT serão responsáveis por mais de 52 milhões de óbitos no mundo todo (MINASI; CURADO, 2017; MALTA, 2014; OMS, 2014; BRASIL, 2009). No Brasil, assim como em outros países do mundo, a maior incidência de DCNT está relacionada ao envelhecimento, aos maus hábitos alimentares e ao sedentarismo. As DCNT estão presentes em, cerca de, 45% da população adulta brasileira (>18 anos de idade), sendo responsáveis por, cerca de, 74% dos óbitos no ano de 2016. Deste modo, grande parcela dos gastos públicos com o financiamento da assistência à saúde pública são destinados ao tratamento dessas doenças (VIGITEL, 2019; MALTA, 2014).

A íntima relação entre obesidade e DCNT, a elevada incidência destes eventos na população mundial e o alto custo para seu tratamento, fizeram com que a compreensão dos mecanismos celulares, fisiológicos e sociais, nesta condição, se tornasse ferramenta fundamental como estratégia de enfrentamento ao problema. Neste sentido, estudos das últimas décadas têm revelado que durante a progressão da obesidade ocorre hipertrofia de adipócitos e aumento da produção de adipocinas, levando a uma inflamação crônica de baixo grau e mudança do perfil de resposta imune sistêmica.

Assim, na obesidade há redução da produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como, adiponectina e Interleucina 10 (IL10) e simultânea elevação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6), além de estar relacionada a promoção da resistência à insulina (RI), que é a base da SM (FONSECA-ALANIZ, 2007; PINTO, 2010).

Em decorrência da inflamação crônica, de caráter subclínico, o paciente obeso apresenta desequilíbrios na homeostase energética, com efeitos sobre a ingestão alimentar e gasto energético (PINTO, 2010; WOLF, 2017). Neste contexto, há evidências de que obesos apresentem, além de alterações relacionadas à macronutrientes como carboidratos, lipídios e proteínas, problemas com a obtenção, distribuição e utilização de diferentes micronutrientes, entre eles o ferro, no estado ferroso (Fe^{+2}). Deste modo, estudos mais recentes têm estabelecido uma relação entre obesidade e a deficiência Fe^{+2} , um fenômeno observado em diferentes populações do mundo (MORENO-NAVARRETE, 2017; ARSHD, 2017; YANOFF, 2007; GIBSON, 2014).

O Fe^{+2} é um oligoelemento de alta reatividade, utilizado em diferentes reações no organismo, com destaque para sua atividade transportadora de oxigênio na cadeia carreadora de elétrons e nas hemácias (DEV; BABITT, 2017; FERNANDEZ-CAO, 2013). Alterações na disponibilidade de Fe^{2+} estão presentes em diferentes condições patológicas, em especial na anemia. Interessantemente, obesidade e anemia são problemas de saúde pública em países de baixa e média economia. Ambas de causa multifatorial, com apontamento a subnutrição dos doentes (OMS, 2019; RODRIGUES, 2019).

Existem numerosos tipos de anemias, entretanto, podemos dividi-las em anemias por carência nutricional e geneticamente herdadas, estas últimas são anemias com maiores complicações influenciadas pelo formato celular, defeitos na hemoglobina, erros enzimáticos e erros na produção de células pela medula óssea, além da inflamação ocasionada por parasitas que levam ao desenvolvimento de anemia microangiopática, microcítica e normocítica (CHAPARRO; SUCHDEV, 2019). A anemia está relacionada a complicações cardiovasculares direta e indiretamente (GUNAWARDENA; DUNLAP, 2012), as características fisiológicas da anemia relacionada à homeostase do ferro

colaboram para a sobrecarga de Fe^{2+} , risco aumentado de acidentes vasculares e trombose (MOZOS, 2015; RODRIGUES, 2013).

O interessante é que parece haver relação entre o desequilíbrio da homeostase glicêmica e lipídica na obesidade e alterações na obtenção, distribuição e função do ferro no organismo. Neste contexto, alguns estudos apontaram que a sobrecarga de Fe^{2+} é um fator primordial no desenvolvimento de diabetes, em particular por promover ou favorecer a destruição de tecidos como o pâncreas (LIU, 2009; FENÁNDEZ-REAL; MANCO, 2014). Adicionalmente, Bahar (2015), aponta que em pacientes talassêmicos¹ não transfundidos ocorre aumento do estresse oxidativo e RI. A sobrecarga de ferro causa também prejuízos para os cardiomiócitos e hepatócitos, contribuindo para a instalação das DCV e hepática (FERNANDEZ-CAO, 2013). No estudo realizado por Andrews, (2000) foi demonstrado que o Fe^{2+} tem papel importante na atividade antimicrobica, não suficiente o Fe^{2+} ainda parece estar relacionado ao processo de diferenciação celular, em especial de macrófagos e adipócitos (ZHOU, 2017).

Diferentes estudos avaliaram a atividade da eritropoietina (EPO), glicoproteína responsável pela maturação de eritrócitos, demonstrando seus efeitos em diferentes modelos de obesidade induzida por dieta rica em gordura (NOGUCHI, 2020; DEY, 2020). Alamo e colaboradores (2017), apontaram que a EPO tem papel importante na regulação do metabolismo energético e sistema imune, através da sua atividade anti-eritroide, atuando em receptores de eritropoietina (EPOr), existentes em tecidos como, cérebro, fígado e tecido adiposo. Portanto, a adequada homeostase do ferro no organismo pode ter impacto na secreção de insulina, no funcionamento hepático, além de modular resposta inflamatória no Tecido Adiposo Branco (TAB) (GABRIELSEN, 2012; SIMCOX; MSCLAIN, 2013).

A deficiência de ferro na obesidade parece estar relacionada com a regulação de captação de ferro férrico (Fe^{+3}) e a disponibilidade de Fe^{+2} no organismo. Neste contexto, a hepcidina, um hormônio peptídico produzido no fígado, parece ter papel importante no controle da absorção e liberação de

¹ Talassemia: Hemoglobinopatia relacionada a mutações genéticas que geram prejuízo no desenvolvimento de hemácias.

Fe^{+2} em diferentes tecidos, regulando os estoques de ferro tecidual e sistêmico (ARSHD, 2017; GANZ; NEMETH, 2012) um mecanismo que envolve a inibição da ferroportina (enzima transportadora de Fe^{2+}) expressa em diferentes tecidos (GANZ; NEMETH, 2012; ARSHD, 2017). Em condições de rompimento da homeostase energética, tais como, na obesidade e anorexia, já foram encontradas concentrações alteradas de hepcidina (DEL GIUDICE, 2009; GOTARDO, 2013). O processo inflamatório da obesidade aumenta a produção de hepcidina, com impacto sobre o metabolismo do ferro (DEL GIUDICE, 2015), diminuindo a sua biodisponibilidade.

A EPO modula o perfil pró-inflamatório da obesidade, para o perfil anti-inflamatório, tendo impacto sobre a redução da massa adiposa, além de estar relacionado aos neurônios centrais no hipotálamo de pró-opiomelanocortina (POMC), responsáveis pela manutenção da saciedade (TENG, 2013; LUO, 2015; NOGUCHI, 2020; DEY, 2020). De maneira importante, foi demonstrado que o aumento da síntese de EPO é proporcional à redução da síntese de hepcidina, além de, ter papel importante na resposta ao estresse hepático (ALAMO, 2017; NOGUCHI, 2020). Interessantemente, o controle da hepcidina hepática pode influenciar a homeostase férrica em outros territórios, em especial o TAB. É bem estabelecido que a disponibilidade de ferro é inversamente proporcional ao Fe^{+2} disponível, o que regula a expressão de hepcidina hepática. Assim, a expressão hepática de hepcidina é elevada em condições de aumento intracelular de Fe^{2+} nos hepatócitos, sendo reduzida em condições de queda do Fe^{2+} intracelular, como ocorre na eritropoiese. Portanto, sendo o fígado o tecido mais importante nesta regulação, mecanismos intrínsecos sinalizam a disponibilidade e necessidade de ferro para diferentes funções na manutenção da homeostase férrica. A exacerbada expressão de hepcidina pode prejudicar o metabolismo de diferentes sistemas (YANOFF, 2007 GIBSON, 2014; FERRARI, 2015; ARSHD, 2017).

Desajustes na homeostase do ferro podem ser induzidos por diferentes agentes farmacológicos, entre eles a fenilhidrazina (FHZ). A FHZ é um fármaco que foi experimentado inicialmente em meados do século XX e que, *in vitro*, demonstrou as propriedades hemolíticas do fármaco (COHEN; HOCHSTEIN, 1963, 1964). Diferentes estudos demonstraram subsequentemente a eficiência da FHZ na indução de anemia hemolítica em

ratos, propondo um modelo de estudo para os fenômenos do metabolismo do ferro (JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; NAUGHTON, 1990; ZYUZ'KOV, 2004; VANNUCCHI, 2000; MOREAU, 2012).

O mecanismo proposto é que a FHZ induz hemólise em hemácias por meio da peroxidação da membrana lipídica de eritrócitos decorrente da formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), fenômeno relacionado ao aumento de enzimas específicas do metabolismo energético celular como a Acetil Coenzima A (Acetil-CoA) (COHEN; HOCHSTEIN, 1964). Diferentes estudos têm mostrado a eficiência da FHZ para indução da anemia em roedores (COHEN; HOCHSTEIN, 1964; JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; MOREAU, 2012).

A obesidade hipotalâmica em roedores pode ser induzida pela administração de elevadas doses de MSG no período neonatal; um modelo utilizado para experimentação desde a década de 60, sendo caracterizado, ao longo dos últimos anos, como obesidade hipotalâmica (OLNEY, 1969; GRASSIOLLI, 2006; BALBO, 2007; MIRANDA, 2016). Assim, animais obesos-MSG apresentam como características: diminuição do Comprimento Naso-anal (CNA) e tamanho dos órgãos, em decorrência da lesão no Núcleo Arqueado do hipotálamo (NA), o qual resulta em ausência do hormônio do crescimento (GH – growth hormone), além de perturbar o eixo hipotálamo-hipófise e provocar aumento da secreção de corticosterona. Adicionalmente, estes roedores apresentam alterações autonômicas, com aumento da atividade parassimpática e baixa atividade simpática, hiperinsulinemia, dislipidemia e intolerância à glicose. Estas anormalidades endócrino-metabólicas resultam em elevada adiposidade, na ausência de hiperfagia, finalmente, estes roedores têm alterações na secreção de insulina e problemas cardiovasculares, reproduzindo um quadro fisiopatológico muito similar a SM vista em humanos (SVED; FERNSTROM, 1979; SCALET; OLNEY 1989; BALBO, 2007; SCOMPARIN, 2009 ANDREAZZI, 2011; KONRAD, 2012 MIRANDA, 2016). Entretanto até o presente momento, não há estudo avaliando a homeostase do ferro no modelo de obesidade induzida por MSG. Assim, nossa questão problema é: frente a administração de um agente anêmico (FHZ) haverá agravamento da obesidade e comorbidades induzidas pelo MSG? Nossa hipótese é que a administração de FHZ

promoverá desajuste na biodisponibilidade de Fe^{2+} nos obesos, favorecendo o estresse oxidativo e aumentando a adiposidade, RI e a dislipidemia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração do agente anêmico fenilhidrazina (FHZ) sobre a adiposidade e estado metabólico de ratos com obesidade hipotalâmica induzida por glutamato monossódico.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever o impacto da FHZ sobre o hematócrito e concentrações plasmáticas de ferro em ratos obesos-MSG e CON (não obesos);
- Caracterizar o perfil plasmático glicêmico e lipídico e a resistência à insulina em ratos obesos-MSG e CON (não obesos) que receberam FHZ;
- Estudar os aspectos histológicos hepáticos e esplênicos em MSG-obesos e CON (não obesos) que receberam FHZ;
- Avaliar se a administração de FHZ altera o conteúdo e os aspectos histológicos dos depósitos do Tecido Adiposo Branco (TAB) e do Tecido Adiposo Marrom (TAM) em ratos obesos-MSG e CON (não obesos);

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Obesidade

Obesidade e sobrepeso são definições para o acúmulo excessivo de gordura corpórea que causa prejuízo à saúde. Diferentes alterações endócrinas, genéticas e metabólicas estão envolvidas com a expansão da massa adiposa. Todavia, estudos, das últimas décadas, têm confirmado a relação da obesidade e suas comorbidades com um processo inflamatório crônico de baixo grau e a SM. Neste contexto, os adipócitos do TAB produzem diferentes substâncias denominadas adipocinas, algumas com efeitos anti-inflamatórios como a adiponectina e a Interleucina 10 (IL10), e outras com ação pró-inflamatória como TNF- α e interleucinas-1 (IL1) e IL6, promovendo um balanço ideal de ambas as citocinas. Na obesidade ocorre a perda da homeostase imunológica, ocorrendo a elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais têm potente efeito endócrino sistêmico sendo diretamente envolvidas com a RI e dislipidemia. Adicionalmente, o efeito pró-inflamatório sistêmico iniciado pelo TAB é exacerbado e mantido pelo sistema imunológico, em particular por alterações na resposta imune-secretora dos macrófagos (PINTO, 2010; LUSTIG, 2011; MEHRAN, 2012; BALBALHO, 2015).

A obesidade é um problema de saúde pública mundial que atinge países desenvolvidos e em desenvolvimento. É uma doença de causas multifatoriais estando relacionada com condições socioeconômicas, psicossociais e hereditárias. Todavia, grandes estudos populacionais, apontam que a obesidade é consequência de uma transição no perfil alimentar da população decorrente da carga diária dos indivíduos componentes da sociedade, tendo colocado a obesidade como consequência do consumo de “fast food” e sedentarismo (OMS, 2019; TAVARES, 2010). Notadamente, o excesso de TAB eleva o risco da instalação de graves DCNT, em particular, o diabetes melitus (DM), e as DCV (OMS, 2019).

Dados da OMS, (2019), mostraram que 1.9 bilhões de adultos, acima de 18 anos, estão acima do peso e 650 milhões são obesos, sendo que no ano de 2016, 38% da população mundial estavam acima do peso e 13% obesa, deste último 11 % eram homens e 13% mulheres. Dentro deste

contexto é estimado que 41 milhões de crianças com menos de cinco anos estejam com sobrepeso ou obesidade, e que 340 milhões de crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos tenham sobrepeso ou obesidade.

No Brasil, de acordo com VIGITEL (2019), 55,4 % da população está com sobrepeso, sendo que os homens apresentam 57,1 % do total de sobrepeso e as mulheres 53,9%. Ainda, a incidência de obesidade é de 20,3%, sem diferença entre homens e mulheres. Como mencionado anteriormente, a má alimentação é fator de desenvolvimento da obesidade. Corroborando com esta afirmação os levantamentos da VIGITEL (2018), apontam o baixo consumo de hortaliças pela população, considerando que, da população total estudada, somente 33,9 % consomem frutas e hortaliças sendo os homens os menores consumidores, (27,7%), e as mulheres as maiores consumidoras, (39,2%).

A OMS (2019), afirma que países de baixa e média renda têm sofrido com o duplo ônus da doença, apontando que, além dos problemas com doenças subnutricionais e infecciosas, tais países têm sofrido com o rápido crescimento das DCNT, citando a coexistência da subnutrição e obesidade e a alimentação nutricional com baixa quantidade de nutrientes, ou seja, o consumo de alimentos de menor custo com menor qualidade.

Deste modo, apesar do excesso de calorias consumidas, o perfil alimentar do indivíduo obeso apresenta-se com baixa qualidade, visto que, na realidade, há um déficit nutricional nesses indivíduos. A subnutrição dos obesos despertou a curiosidade dos pesquisadores e estudos recentes têm procurado evidenciar e compreender a relação entre a falta de micronutrientes e a obesidade. Entre os diferentes tipos de micronutrientes necessários a homeostase está o Fe^{2+} , encontrado em elevada quantidade nos grãos (arroz, feijão) e hortaliças (couve; brócolis), responsável por diferentes reações no organismo. Esse mineral, além de ter papel fundamental na maturação de hemácias e, portanto, no transporte de oxigênio a todos os subtipos celulares, ainda participa como regulador do estresse oxidativo e da ativação de diferentes tipos de enzimas essenciais ao metabolismo (GANZ; NEMETH, 2012).

A homeostase férrica na fisiopatologia da obesidade parece estar alterada, um evento que pode envolver proteínas do metabolismo do ferro, tal

como a EPO, ferritina e a hepcidina (GIBSON, 2014; FERRARI, 2015), além de modificações nos níveis de heme (MORENO-NAVARRETE, 2017), mecanismos que podem ser agravados pela inflamação crônica de baixo grau, típica da obesidade.

Estudos têm demonstrado elevada presença de marcadores anêmicos na obesidade sem estarem diretamente relacionados com a incidência de anormalidades hematológicas. Deste modo, obesos podem ser anêmicos ou apresentar desajuste no metabolismo do ferro independente de características anêmicas hematológicas clássicas (características macrocíticas ou microcíticas). A alta incidência de marcadores anêmicos como; Fe^{2+} , hepcidina e ferritina, demonstra a relação da obesidade com a anemia da inflamação (AUSK; LOANNOU, 2012; ARSHAD, 2017; ALOUFI, 2018; MACHADO, 2019).

Estudos atuais demonstraram que a EPO tem efeito benéfico sobre a obesidade, atuando por mecanismos não eritroides, modulando a resposta inflamatória, além de ação benéfica central, estimulando a atividade dos neurônios POMC, assim como sua atividade sobre a inflamação hepática, que diminui o processo inflamatório local, tendo impacto sobre o fator nuclear-kappa beta (NF-kb), com efeito direto sobre o metabolismo lipídico (TENG, 2010; NOGUCHI, 2020). Assim, os achados da homeostase do ferro em obesos, sugerem que há nesta condição um prejuízo dos processos reguladores da biodisponibilidade endógena do ferro, fator que tem impacto sobre importantes variáveis clínicas, como a RI, a secreção de insulina, homeostase glicêmica e lipídica e a função hepática. Além de influencia a massa adiposa. Logo, estudar os efeitos da anemia sobre a fisiopatologia da obesidade torna-se importante para compreensão de novos mecanismos de regulação do metabolismo energético.

3.2 Anemia

Para OMS (2019), anemia é a perda da capacidade dos glóbulos vermelhos ou hemácias carregarem oxigênio até as células, seja pela diminuição no número de hemácias ou por algum defeito que não permite o carregamento de oxigênio para suprir as necessidades fisiológicas dos tecidos.

A prevalência global da anemia foi apresentada em um estudo feito entre, 1995-2005, mostrando que 1.62 bilhões de pessoas eram anêmicas, somando 24,8% da população mundial atingindo mais mulheres e crianças do que homens (OMS, 2008).

Em 16 anos, a prevalência de anemia global caiu 12%. Isso pode ser considerado um bom avanço, mas insuficiente até o momento. Espera-se que a prevalência de anemia global seja reduzida 50% até 2025 (OMS, 2015), visto que essa condição tem grande impacto nas taxas de morbidade e mortalidade feminina e infantil (OMS, 2008, 2015).

A anemia, em seu estado mais grave, causa fadiga, vertigem, cansaço, sonolência, maior suscetibilidade às infecções e parece estar associada a complicações musculo esqueléticas e deficiência do desenvolvimento cognitivo (OMS, 2015; LEITÃO; OLIVEIRA 2016). Não menos importante, a anemia causada por Doença Renal Crônica (DRC), tem papel clínico importante quando considerado o impacto da fisiopatologia da doença relacionado ao sistema eritrocitário (ALAMO, 2017).

As anemias relacionadas às causas hereditárias, acarretam prejuízos na formação de eritrócitos, apresentando maiores riscos como a sobrecarga de ferro devido a tratamento contínuo, as necessidades de transfusão sanguínea, a falta de uma terapia resolutiva de baixo custo e as complicações geradas pela baixa excreção de ferro pelo corpo (CAPPELLINI; MUSALLAM; TAHER; 2019).

No Brasil, sugere-se que 4,8 milhões de pré-escolares sejam atingidos pela doença (JORDÃO, 2009). Por outro lado, um recente estudo de prevalência feito na população brasileira, por Machado e colaboradores (2019), demonstrou baixa prevalência de anemia em adultos acima de 18 anos (9.9%) tendo maior incidência em idosos. Esse trabalho baseou-se nos

dados coletados pelo Programa Nacional de Saúde (PNS) de 2013, que contou com a avaliação hematológica de 8.060 pessoas de todos os estados brasileiros. Ressaltamos aqui, que esses dados são referentes à população adulta e não a população infantil que tem maior incidência de casos anêmicos.

Até o momento, conhece-se pouco sobre a relação da anemia com outras doenças, porém considerando que alterações da homeostase do Fe^{2+} têm implicações para oxigenação, estresse oxidativo celular, funções enzimáticas e controle da resposta imunológica, conclui-se que conhecer suas implicações à saúde parece ser fundamental. Entre as causas, mais frequentes, de anemia está a deficiência de ferro. Nos últimos anos, foram descritos em estudos de avaliação de portadores de hemoglobinopatias², o aumento do estresse oxidativo e a deficiência de enzimas antioxidantes, sugerindo que pacientes não transfundidos tem a taxa de estresse oxidativo aumentada (EL-GHANRAWY, 2014; MAHDI, 2014). Sabe-se que o estresse oxidativo modifica reações metabólicas e causa danos teciduais irreversíveis. Além disso, como mencionado acima, indivíduos obesos parecem ter alterações na homeostase férrica, o que poderia agravar as comorbidades relacionadas à obesidade, em particular a RI e a dislipidemia, por exemplo, quando considerado o efeito benéfico da EPO sobre diferentes órgãos como, pâncreas, fígado; cérebro e tecido adiposo (CHOI, 2010; NOGUCHI, 2020).

3.3 Homeostase do ferro

O ferro é um nutriente essencial para diferentes reações de organismos vivos. Nos humanos esse oligoelemento tem papel importante na manutenção da maturação das células vermelhas e no processo de lise celular (ANDERSON; FRAZER, 2017; GANZ, 2017). A alta reatividade desse elemento atribui importante destaque na produção de estresse celular diretamente e indiretamente quando sua sobrecarga pode aumentar a produção de estresse oxidativo, ou pela sua baixa quantidade de Fe^{2+} que pode gerar prejuízo da eritropoiese com consequente diminuição do aporte

² Hemoglobinopatias: gama de patologia causadas por erros na hemoglobina (KOHNE, 2011).

de oxigênio celular (ZANDMAN-GODDARD; SHOENFELD, 2007; KNUTSON, 2017; GANZ, 2017).

A quantidade de ferro corpórea depende de dois fatores: os valores nutricionais de Fe^{3+} adquiridos na alimentação (ferro não heme) e a peculiar capacidade dos macrófagos e células do endotélio hepático e outros tipos celulares de reciclar o Fe^{2+} e ferro heme. Em termos nutricionais, o ferro não-heme é obtido de grãos e vegetais, enquanto o ferro heme, da mioglobina e hemoglobina encontrada na carne de animais (ANDERSON; FRAZER, 2017; GANZ, 2017).

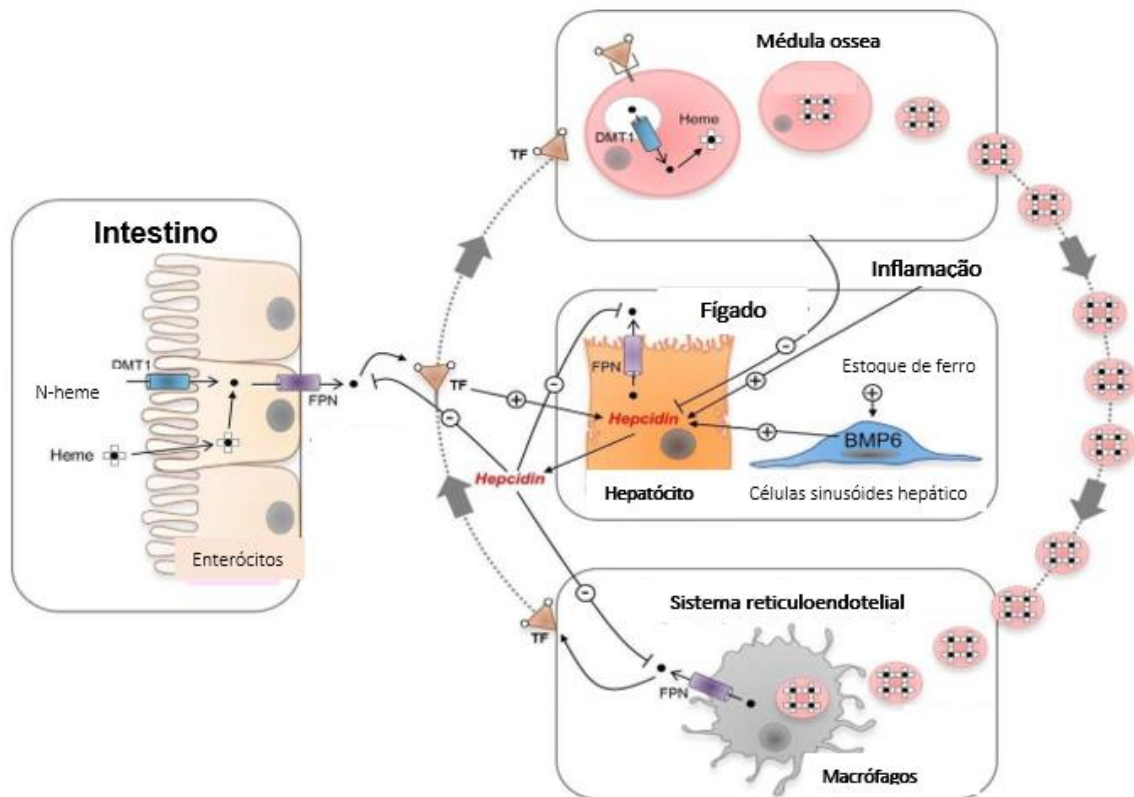
Os mecanismos de absorção e liberação de ferro compreendem diferentes proteínas especializadas em transporte, como a ferroportina, responsável por coordenar a saída do Fe^{2+} de células como enterócitos, macrófagos e hepatócitos; transportador de metal divalente (DMT1) responsável pela captura do Fe^{3+} do trato intestinal pelos enterócitos e a transferrina, responsável pelo transporte de ferro na sua forma Fe^{3+} na circulação (GULEC, 2014; KNUTSON, 2017). No período alimentar ocorre uma grande carga de absorção de Fe^{3+} o qual é reduzido em Fe^{2+} pela citocromo B duodenal, sendo armazenado no meio intracelular na ferritina, sofrendo subsequentemente a sua liberação pela ferritina e ao atravessar a membrana basal dos enterócitos conversão em Fe^{3+} para ser transportado pela transferrina até o tecido hepático via sistema porta-hepático (ANDERSON; FRAZER, 2017; KNUTSON, 2017).

Entre as diferentes proteínas envolvidas no controle de captação e distribuição do ferro nos tecidos, destaca-se a hepcidina, em particular aquela de origem hepática, a qual é capaz de regular a liberação e absorção de ferro em diferentes tecidos (KNUTSON, 2017). Deste modo, a sinalização endócrina dos hepatócitos regula o Fe^{2+} intracelular nos tecidos, de acordo com a disponibilidade de Fe^{3+} . Essa sinalização tem seu centro de controle atribuído à função de componentes que aumentam a expressão da hepcidina, como a saturação da transferrina na ligação com os receptores de transferrina (TFN1), pelo influxo³ de Fe^{3+} hepático e pela produção de IL6 (GANZ; NEMETH, 2012; KNUTSON, 2017; ROSS, 2017).

³ Influxo: Transporte iônico de moléculas do espaço extracelular para o espaço intracelular.

Para tal, há complexa interação entre eritrócitos, hepatócitos, células intestinais e macrófagos do sistema reticulo-endotelial, presentes em órgãos como o baço (Figure 1).

Figura 1. Mecanismo de regulação da homeostase férrica.



Adaptado: (Knutson, 2017)⁴.

Proteínas transportadoras e hormônio peptídico responsável pela absorção e liberação dos estoques de ferro. DMT1: Transportador de metal divalente; FPN: Ferroportina; TF: Transferrina; HEPICIDIN: Hepcidina; N-heme: ferro não heme; Heme: Ferro heme; BMP6: Proteínas de morfogênese óssea 6; Enterócitos: células do trato gastrointestinal; Hepatócitos: células tecido hepático; Sistema reticulo endotelial: células especializadas em fagocitose envolvidas na homeostase do ferro e eritropoiese.

Os níveis teciduais hepáticos de hepcidina regulam sua própria produção. Assim, frente ao aumento do Fe^{2+} intracelular nos hepatócitos ocorre *up regulation* (aumento da expressão) de hepcidina. A elevação da hepcidina resulta na inibição da atividade de transporte de Fe^{2+} dos enterócitos para circulação, pelo efluxo via ferroportina pelos receptores de ferroportina 1 (FPN1), ocorrendo o armazenamento interno de Fe^{2+} nos

⁴ Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28615441/> .

enterócitos pela ferritina de armazenamento de ferro. A retenção de Fe^{2+} nos enterócitos diminui o ganho de Fe^{3+} dos hepatócitos, pela diminuição do efluxo de Fe^{2+} pelos enterócitos que acarreta na diminuição de Fe^{3+} na circulação promovendo a baixa saturação da transferrina (não ocorre carreamento de Fe^{3+} para o fígado) consequentemente essa atividade pode causar uma *down regulation* (baixa expressão) de hepcidina nos hepatócitos, o que aumenta a atividade dos receptores FPN1 levando ao aumento da quantidade de Fe^{3+} liberado por células como enterócitos, macrófagos e hepatócitos para serem entregues para diferentes tecidos via transferrina (GULEC, 2014; BERGAMASCHI, 2016; KNUTSON, 2017).

A homeostase do ferro parece ter influência na patogenia da SM. Neste sentido, estudos apontam que os níveis de ferritina séricos parecem estar relacionados a distúrbios metabólicos na via glicolítica, relacionando a homeostase do ferro com DM2 (STECHEMESSER, 2017; SUÁREZ-ORTEGÓN, 2018). Estudos atuais afirmam a existência de hiperferretinemia na SM, separando a patologia em SM com hiperferretinemia e sem hiperferretinemia (STECHEMESSER, 2017). Na fisiopatologia da SM a hiperferretinemia parece favorecer a instalação da RI, relacionando a SM ao estado dismetabólico férrico (DATZ, 2013). Sendo assim, o prejuízo da homeostase do ferro parece contribuir para instalação da SM em obesos, tendo papel importante no processo de adaptação do organismo a mudança de perfil inflamatório e dislipidêmico da obesidade. Nesse contexto, a hepcidina, o hormônio regulador da homeostase do ferro, parece ter papel importante.

3.4 Hepcidina, anemia e obesidade

A hepcidina é um hormônio peptídico secretado pelas células do fígado que tem como função controlar a absorção de ferro através da inibição da ferroportina, uma proteína transmembrana responsável pela liberação de ferro intracelular em diferentes tipos celulares (GANZ; NEMETH, 2012; KNUTSON, 2017). Deste modo, sugere-se que a hepcidina é um biomarcador para anemia.

A secreção de hepcidina é controlada por ‘feedback positivo’, sendo regulada pela quantidade de Fe^{2+} no meio intracelular de hepatócitos (PRENTICE, 2017). A hepcidina controla o efluxo⁵ de Fe^{2+} de macrófagos, enterócitos e hepatócitos, por ligação direta com a ferroportina, levando a proteína a uma mudança conformacional que resulta em endocitose⁶ da mesma e degradação lisossomal (GANZ; NEMETH, 2012). Deste modo, a produção de hepcidina, pelos hepatócitos, é induzida pela disponibilidade de Fe^{2+} liberado pelos enterócitos no processo de absorção de nutrientes alimentares, assim como, pela reciclagem de ferro pelo sistema reticuloendotelial (GANZ; NEMETH, 2012; KNUTSON, 2017).

O controle de síntese do peptídeo hepcidina pelos hepatócitos requer mecanismos intrínsecos das proteínas transportadores de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, como pela saturação da transferrina (FeTF) e consequente formação da holotransferrina que liga-se ao receptor de transferrina (TFR1/TFR2), levando à sobreposição do receptor TRF1 sobre o receptor de membrana HFE com consequente inibição da atividade do TRF1 pela holotransferrina, que permite o deslocando do complexo holotransferrina para o receptor TRF2, colaborando conjuntamente com outros mecanismos no estímulo expressivo de hepcidina, uma via ainda incompleta (GANZ; NEMETH, 2012)

Em sinergismo⁷ com outras vias, as proteínas de morfogênese óssea (BMPs) parece ser responsável pela regulação da síntese de hepcidina (GANZ; NEMETH, 2012). A ligação da proteína de morfogênese óssea 6

⁵ Efluxo: Saída iônica de moléculas do meio intracelular para o meio extracelular.

⁶ Endocitose: Processo de invaginação interna da membrana plasmática, que resulta na formação de uma vesícula intracelular.

⁷ Sinergismo: Associação positiva de dois fatores contribuintes em algumas reações celulares.

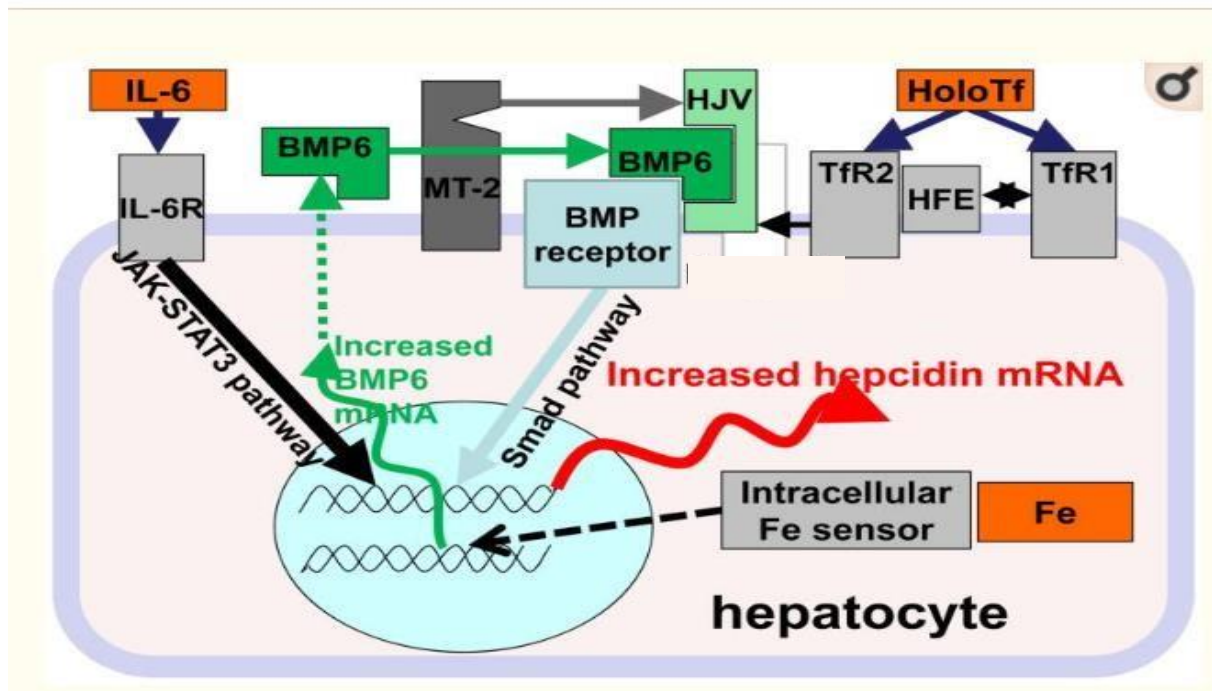
(BMP6), ligada ao receptor de BMP acoplado à um co-receptor chamado hemojuvelina, está relacionada com a ativação de proteínas intracelulares SMADs, aparentemente, relacionada à expressão de hepcidina como ilustrado na Figura 2. Ainda, citocinas inflamatórias (IL-6) e o próprio influxo de Fe^{2+} nos hepatócitos parecem estar envolvidos nesse processo (GANZ; NEMETH, 2012).

Interressantemente, a EPO, responsável pela maturação de eritrócitos, demonstrou papel importante sobre a fisiopatologia da obesidade (ALNAEELI; NOGUCHI, 2015). Sabe-se que a quantidade de EPO é inversamente proporcional a quantidade de hepcidina (ALAMO, 2017). Contudo, a EPO parece estar envolvida na diminuição da atividade da STAT3 hepática, assim como, na diminuição da lipogênese, e inflamação hepática local (NOGUCHI, 2020), como parece ter impacto sobre os estoques de gordura, e termogênese (ALNAEELI, 2014; KODO, 2017; NOGUCHI, 2020), além de modular a resposta inflamatória através de macrófagos, pela ativação da STAT3 em macrófagos, responsáveis pela expressão de EPOr, colaborando na diminuição de citocinas pro-inflamatórias e aumentando a síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (SURESH, 2020).

Em colaboração com os estoques de ferro corpóreo, os macrófagos, células filogeneticamente antigas, desempenham papel importante na distribuição de Fe^{3+} em períodos de necessidade, macrófagos da polpa vermelha do baço, macrófagos centrais na medula óssea e células de Kupffer no fígado garantem a disponibilidade de Fe^{3+} para as reações celulares necessárias (KNUTSON, 2017). Interessantemente, os macrófagos parecem sofrer diferenciação celular dependente de Fe^{2+} . Zhou (2018), afirmam que o ferro intracelular de macrófagos é responsável pela polarização para o subtipo celular M1, ou seja, o Fe^{2+} intracelular contribui para indução de macrófagos pró-inflamatórios.

A mudança de perfil de polarização de macrófagos é uma característica da obesidade. Na sua fisiopatologia, macrófagos M2 sofrem polarização para o subtipo M1, levando o tecido adiposo hipertrófico a um estado de inflamação de baixo grau (SUKHBAATAR; WICHART, 2019). Os macrófagos têm papel importante no perfil de secreção de citocinas na obesidade local e sistêmica (PINTO, 2010; WOLF, 2017).

Figura 2. Compreensão atual dos mecanismos moleculares de regulação da hepcidina.



Fonte: Ganz; Nemeth (2012).⁸

Vias de sinalização que controlam o aumento da síntese de RNAm do hormônio hepcidina. HoloTf: Holotransferina; TfR1: Receptor de transferina 1; TfR2: Receptor de transferina 2; HJV: Hemojuvelina; HFE: Proteína de membrana HFE; BMP e BMP6: receptores BMP; SMAD: proteínas intracelulares SMADs; JAK-SATAT3: via de sinalização intracelular.

Estudos atuais apontam que o déficit micronutricional, referente ao Fe^{2+} , está intimamente relacionado ao processo inflamatório crônico de baixo grau da obesidade. Logo a produção elevada de IL-6 parece aumentar a expressão de hepcidina. Com isso ocorre o aumento intracelular de Fe^{2+} com menor efluxo celular de Fe^{2+} (GIBSON, 2014; FERRARI, 2015; MORENO-NAVARRETE, 2017). Interessantemente, a indução da anemia hemolítica aguda por FHZ por gavagem parece estimular a dislipidemia, sendo observado o aumento de lipídios e triglicerídeos no fígado (OGUNRINOLA, 2019),

⁸ Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4048856/>.

Na obesidade-MSG, o baço parece ser um órgão atrófico que se relaciona, de alguma forma, com a hipertrofia do tecido adiposo na obesidade, quando observado o trabalho de Guareschi (2019).

O aumento de heme no TAB, a deficiência de ferro em obesos, o aumento da expressão de hepcidina e sua relação com a resistência à insulina assim como, o aumento do estresse oxidativo e a diminuição de agentes antioxidantes em pessoas com hemoglobinopatias, sugere uma relação entre os mecanismos de deficiência de ferro na obesidade e anemia.

3.5 A obesidade induzida por glutamato monossódico

A pesquisa experimental utiliza diversos modelos de obesidade em roedores para ampliar o conhecimento e favorecer o desenvolvimento de estratégias para o tratamento da fisiopatologia da obesidade. Neste contexto, o hipotálamo é centro neural fundamental no balanço energético. Logo, alterações hipotalâmicas podem levar a perda ou ganho de peso, associada ou não, a complicações no controle alimentar (SACALLET; OLNEY, 1989).

A obesidade hipotalâmica induzida pela administração de glutamato monossódico (MSG), no período neonatal, tem sido um modelo amplamente usado no estudo da obesidade e SM (OLNEY, 1969; GRASSIOLLI, 2006; BALBO, 2007; MIRANDA, 2016).

O glutamato é um neurotransmissor e coordena cerca de 50% da atividade excitatória no Sistema Nervoso Central (SNC). Sofre antagonismo direto da atividade gabaérgica, logo a resposta de integração somática espacial gaba compete com a atividade excitatória do glutamato no SNC (LENT, 2010).

O modelo experimental pioneiro de obesidade induzida por MSG, foi realizado por Olney (1969), o primeiro a descrever que as consequências do tratamento neonatal com MSG resultava em obesidade, originada de uma lesão na região hipotalâmica, provocada por um edema intracelular no tecido neural acompanhado de necrose neural atingindo o plano médio do cérebro, terceiro ventrículo e base do cérebro, região pré-óptica e o NA do hipotálamo.

Em parceria, Scallet e Olney (1989), confirmaram que o tratamento neonatal com MSG atinge principalmente o NA, podendo alterar o núcleo Ventro Medial do Hipotálamo (VMH), sendo assim, comparado com modelos de lesão hipotalâmica causados por lesão eletrolítica, como o realizado por Lazaris (1976), ou pela administração de outros agentes como bipeperidil mustard ou gold thioglucose. Não obstante, os roedores obesos induzidos por MSG, possuem características diferentes de obesos com lesão no VMH (MACIA, 2010).

O modelo de obesidade induzida por MSG é caracterizado pela redução da massa muscular e óssea, alterações hormonais, como da redução do hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) pelos neurônios do hipotálamo provocando redução da síntese do hormônio do crescimento (GH) pela adenohipófise, aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol e insulina, hipofagia ou normofagia (SVED; FERNSTROM, 1979; SCALLET; OLNEY 1989; BALBO, 2007; ANDREAZZI, 2011; MIRANDA, 2016). Alguns autores mostram que há um desajuste no Sistema Nervoso Autônomo (SNA) decorrente da lesão hipotalâmica ocasionada pela administração do MSG no período neonatal (SCOMPARIN, 2009; KONRAD, 2012; MIRANDA, 2016). Este fenômeno de desajuste do SNA também é confirmado em outros modelos de obesidade, incluindo humanos. Neste sentido, o desajuste no metabolismo energético parece promover a hipoatividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e a hiperatividade do Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), influenciando na baixa atividade catabólica do TAB e aumento da hiperinsulinemia sistêmica (BRAY, 1985; YAHAGI, 2016; MIRANDA, 2016).

A hiperinsulinemia parece ter íntima relação com a expansão do TAB, visto que é o principal hormônio com atividade lipogênica, um evento já demonstrado em roedores obesos- MSG (BALBO, 2000; BALBO, 2007). Além disso, a redução do SNS favorece o acúmulo de triglicerídeos no fígado, reduz a lipólise no TAB, leva a um menor gasto energético e favorece a hiperinsulinemia (DOLKINOFF, 2001; KALSBECK, 2010; GEERLING, 2013; WOLF, 2017). Adicionalmente, a hiperinsulinemia e hipercortisolemia, comuns do modelo MSG, favorecem a hipertrofia e hiperplasia do TAB (OLNEY, 1969; ZUBIRÍA, 2016). Em consequência do aumento do tamanho

celular e divisão celular dos adipócitos, ocorre o aumento da secreção das adipocinas, citocinas produzidas pelo TAB hipertrofiado como: TNF- α , IL-6; proteína quimioatratora de macrófagos (MCP-1) e a leptina, esta última envolvida na regulação da fome e saciedade (PINTO 2010; ROMAM-RAMOS, 2011). Assim o modelo apresenta RI, intolerância à glicose, dislipidemia, alterações cardiovasculares, eventos associados a obesidade que definem a SM, sendo esta a principal causa de DM2, evento de impacto na qualidade de vida da população (FONSECA-ALANIZ, 2007; LEAL; MAFRA, 2013; LEITE, 2015).

As limitações desse modelo experimental, atreladas ao aumento de cortisol e redução do GH, ocasionadas pela lesão no hipotálamo, recentemente foram demonstradas em humanos. Foi encontrado, na literatura atual, pacientes com lesões no hipotálamo por craniocarcinoma que apresentam características semelhantes do modelo (LEE; KORNER, 2009), redução da expressão e de receptores do GH (MAKIMURA, 2003; NAN; MARCUS, 2008; LEE, 2013). Sendo assim, esses achados reforçam a pertinência do modelo experimental.

Leite e colaboradores (2015), mostraram não haver alterações no hematócrito ou hemácias neste modelo, porém até o presente momento, nenhum estudo avaliou a homeostase do ferro em roedores MSG.

3.6 A indução de anemia por fenilhidrazina

Assim como a obesidade, modelos experimentais em roedores têm sido utilizados para simular o impacto de alterações na homeostase do ferro sobre o organismo. A FHZ é um agente farmacológico capaz de promover a anemia em roedores como confirmado por diferentes estudos (COHEN; HOCHSTEIN, 1964; ZYUZ'KOV, 2004; MOREAU, 2012). O mecanismo de ação da FHZ envolve alterações do metabolismo celular, cujas bases são apresentadas a seguir.

A glicose é um metabólito central para o funcionamento celular, em particular em tecido neural e em células cuja via anaeróbica glicolítica seja importante na geração da energia, tal como os eritrócitos. O metabolismo da

glicose intracelular é dependente da sua conversão em glicose seis fosfatos (G6P), um passo realizado pela enzima desidrogenase (G6PD), um processo essencial que retém a glicose intracelularmente e destina a mesma a etapas subsequentes na via glicolítica. Na via glicolítica oxidativa, após a glicólise, o piruvato será convertido a acetil-CoA, o qual tem grande importância na produção de energia intracelular por colaborar com as reações enzimáticas do Ciclo do Ácido Cítrico (CAC) e finalmente, para a fosforilação oxidativa mitocondrial responsável principal pela síntese da adenosina trifosfato (ATP) celular (LEHNINGER, 2010; CAMPOS; LEME, 2018).

Entre as diferentes reações enzimáticas que ocorrem no CAC, tem grande importância a produção de ATP, que acontece com a redução da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) em nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que além de produzir energia, protege a célula formando água (H_2O) no final do CAC, a partir das moléculas de hidrogênio (H^+) e oxigênio (O^2) (LEHNINGER, 2010). Defeitos nessa fase de óxido redução ($NADP \rightleftharpoons NADPH$) no final do CAC, como a falha da catalase, enzima que em diferentes complexos proteicos é responsável pela redução de NADP em NADPH, podem gerar o acúmulo de H^+ e, conseqüente, produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 2017).

O H_2O_2 é uma molécula altamente reativa que provoca lesões celulares não reversíveis, como peroxidação lipídica de membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 2017; CAMPOS; LEME, 2018). Esta última parece estar relacionada ao processo de hemólise que acontece na anemia hemolítica (COHEN; HOCHSTEIN, 1964).

A hemólise em eritrócitos vem sendo estudada há décadas. A G6PD parece estar relacionada a este fenômeno. Em estudo realizado por Cohen e Hochstein (1964), foi demonstrado o efeito de diferentes substâncias hemolíticas concluindo que, agentes como hidroxilamine e FHZ causam hemólise e levam ao declínio da proteção oxidativa pela diminuta atividade da glutathione peroxidase (GHS-Px), relacionada à intermediação da geração de H_2O_2 .

Diferentes estudos, *in vivo* ou *in vitro*, demonstraram a eficácia da FHZ na indução de hemólise em eritrócitos (COHEN; HOCHSTEIN, 1964; JAIN;

SUBRAHMANYAM, 1978; MOREAU, 2012). Em meados do século XX, foi demonstrado que diferentes agentes hemolíticos, entre eles a FHZ, produzem auto-oxidação de eritrócitos, evento este relacionado à oxidação com oxihemoglobina que provoca oxidação do GSH-Px, deficiência de G6PD, provocando insuficiência irreversível da síntese de NADPH. Por fim, o dispêndio da proteção oxidativa de eritrócitos gera danos como a oxidação da hemoglobina e inibição da glicólise (COHEN; HOCHSTEIN, 1963, 1964). A partir desse momento, diferentes estudos vêm demonstrando os efeitos sistêmicos da indução de anemia por FHZ.

Nesse contexto, estudos esclarecem o efeito hematopoiético da FHZ (ZYUZ'KOV, 2004), o tempo de resposta regenerativa de hemácias (CRISWELL, 2000), os precursores eritróides da medula óssea em animais com anemia hemolítica induzida por FHZ (VANNUCCHI, 2000), o efeito da FHZ sobre a histomorfologia de hemácias (RAMOT, 2008), assim como atividades enzimáticas da via antioxidante (LOW, 2010; MARKOVIC, 2011), o efeito sobre o metabolismo do ferro (MASARATANA, 2012), sobre o metabolismo lipídico hepático e a atividade da citocromo P-450 (JONEN, 1982). De maneira interessante, o modelo tem sido proposto como limitado, porém, adequado para estudos relacionados à patologia das talassemias (RAMOT, 2008). Supreendentemente, foi revelado os efeitos da FHZ sobre a atividade imune esplênica, assim como, o efeito em diferentes linhagens celulares na corrente sanguínea (LAZAREVA, 2002).

Em um estudo realizado por Naughton (1990), foi revelado que a FHZ é capaz de ativar o sistema imune, promovendo aumento da produção de prostaglandinas E_2 (pE_2) e anticorpos IG_g circulantes, estes últimos responsáveis pelo aumento acentuado de células B no baço, com consequente ativação da blastogênese linfóide, principalmente de células B. Esses achados sugerem que o efeito hemolítico da FHZ pode ter influência na polarização dos macrófagos. Esses dados mostraram que macrófagos M1, alternativamente ativados, possuem baixa afinidade com as proteínas do metabolismo do ferro e aumento do estoque intracelular de Fe^{2+} , contrariamente, o subtipo de macrófagos M2 ativados classicamente que tem alta afinidade pelas proteínas do metabolismo do ferro e baixo estoque intracelular de Fe^{2+} (CORNA, 2010; CAIRO, 2011; SAHA, 2017). Além disso,

os macrófagos esplênicos CD169+ estão relacionados com proliferação do centro germinativo esplênico de células B, responsáveis pela imunidade humana inata (VENINGA, 2015). Esses achados parecem de grande importância para nosso estudo, visto que, na obesidade há mudanças na polarização dos macrófagos, inflamação crônica, além de alterações esplênicas (BALBO, 2007; ZHOU, 2018; GUARESCHI, 2019).

Na anemia induzida por FHZ, existem controvérsias quanto aos seus efeitos sobre a expressão de hepcidina. Alguns estudos mostraram que a expressão da hepcidina hepática é inibida pela FHZ (CORNEL, 2017; MASARATANA, 2012), fator que parece melhorar o tráfego de ferro nos macrófagos.

Sendo assim, é provável que o efeito hemolítico, induzido por FHZ, seja uma hemólise aguda, fator que deve ativar a regeneração de células vermelhas, bem como, aumentar a eritropoiese. Portanto, no presente estudo avaliaremos o efeito da hemólise aguda em ratos magros (controles) e obesos-MSG. Acreditamos que os efeitos da administração de FHZ colaborem com o dispêndio do metabolismo energético, acentuando os agravos da obesidade induzida por glutamato monossódico.

4. METODOLOGIA

Realizamos uma pesquisa do tipo experimental verdadeira. Para tal, foram utilizados ratos Wistar (machos e fêmeas) obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e mantidos no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endocrinologia e Metabolismo (LAFEM), sob condições controladas de luminosidade (luz das 07h00min às 19h00min) e temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), recebendo água de torneira e ração padrão para roedores da marca BIO BASE/SC à vontade. Os animais usados nesse estudo foram provenientes do projeto de pesquisa previamente aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal e Aulas Práticas da UNIOESTE (CEUA) (Anexo I).

4.1 Acasalamento e indução da obesidade:

Os animais (4 ratos machos e 12 fêmeas) foram acasalados em sistema de harém (um macho para três fêmeas). Constatada a prenhez, as ratas foram separadas em caixas individuais, e após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes machos/mãe. A partir do 2º ao 6º dia de vida, metade das ninhadas (n=20 ratos) foram submetidos a administração das injeções subcutâneas de MSG, na dose de 4 g/Kg, conforme protocolo adaptado de Olney (1969). No mesmo período, animais do grupo controle (CTL; n=20 ratos) receberam salina equimolar (1,25 g/Kg). Ambos os grupos foram desmamados aos 21 dias de vida, alojados em caixas apropriadas com número de 3-4 ratos por caixa e permaneceram em condições controladas de luminosidade, temperatura, hidratação e nutrição, conforme mencionado anteriormente.

4.2 Administração da Fenilhidrazina

Aos 70 dias de vida, iniciando às 8:00h da manhã, e após jejum prévio de 12h, animais de ambos os grupos foram pesados individualmente e preparados para a indução da anemia hemolítica.

Parte dos animais de ambos os grupos (n=10) recebeu, via intraperitoneal (ip), uma dose de 40 mg/Kg de fenilhidrazina (FHZ) dissolvida em salina (0,9%) conforme protocolo experimental realizado por Moreau, (2012). A mesma dose foi repetida, também, por via ip 24h e 32h após a primeira aplicação. No mesmo período e horário, a outra metade dos ratos, de ambos os grupos, recebeu salina 0,9% (SAL) sem FHZ para simular o estresse (n=10). Deste modo, formaram-se quatro grupos experimentais: CON_{SAL}: ratos controles salina; CON_{FHZ}: ratos controles tratados com fenilhidrazina; MSG_{SAL}: ratos tratados com glutamato monossódico recebendo salina; MSG_{FHZ}: ratos tratados com glutamato monossódico recebendo fenilhidrazina (n=10/ratos/grupo).

4.3 Peso Corporal e Ingestão Alimentar

Os animais receberam uma marca individual na cauda e, dos 72 aos 90 dias de vidas, foram registrados o peso corporal (g) e ingestão de ração. Para registro do consumo de ração, o total ofertado, num dia, foi reduzido da sobra de ração após 48h e dividido pelo número de ratos na caixa e, posteriormente, pelo peso individual do rato. Deste modo, o consumo de ração foi expresso em g/g de peso corporal. A evolução do peso corporal e o consumo de ração foram utilizados para análise da área sob a curva (ASC) no período. O ganho de peso corporal foi calculado, reduzindo o peso corporal aos 90 dias, do peso corporal aos 70 dias de vida.

4.4 Análise do hematócrito

Aos 90 dias de vida, os ratos (n = 10 / grupo) foram alocados em gaiolas individuais e uma amostra de sangue foi coletada da veia caudal dos animais em tubos heparinizados, microcapilares, que foram transferidos para centrífuga microcapilar com o raio da circunferência de cobertura medindo 13 cm (CENTRIBIO), por cinco minutos, a 4000 rpm. Então, o hematócrito (Hct: %) foi obtido a partir da proporção do volume de glóbulos vermelhos (RBC)

ao volume total de sangue, medido com um Cartão Especial para Leitura de Hematócrito conforme realizado por Gomes (2006).

4.5 Eutanásia e Coleta de Tecidos e Sangue

Aos 92 dias de vida, e após 12h de jejum, os ratos foram pesados e o comprimento naso-anal (CNA; cm) registrado para posterior cálculo do Índice de Lee (IL) conforme proposto por Lee (1928) e aplicado e confirmado por Bernardis e Patterson (1968) de acordo com a fórmula

$$\sqrt[3]{\text{Peso Corporal} \frac{g}{\text{CNA}} (cm)}$$

Em seguida os animais foram dessensibilizados em câmara de gás carbônico e rapidamente eutanasiados por decapitação. Não foi usado anestésico ou outros agentes farmacológicos que deprimam o sistema nervoso central, pois assim evitamos seus efeitos colaterais sobre a glicemia, lipidemia e insulina plasmáticas (PIOREZAN, 2017). Imediatamente o sangue total foi coletado em tubos previamente heparinizados. As amostras coletadas foram centrifugadas 12.000 (RPM) por 3 minutos, o plasma foi separado e acondicionado em *eppendorf*, que foram armazenados em freezer a -20 C°. Foi coletado depósito do tecido adiposo branco subcutâneo inguinal (TAB-I) (g/100g) e o tecido adiposo marrom (TAM) (100g/rato), baço e fígado dos animais. Os órgãos coletados foram pesados em uma balança de alta precisão e os dados foram anotados e tabulados com a ajuda do software Excel. O baço, fígado, TAM, TAB-I, foram limpos e pesados para verificação do peso (g/g de peso). Ambos os tecidos foram transferidos para frascos contendo ALFAC (Anexo II) para fixação e posteriormente foram lavados em água corrente e fixados em álcool 70%, para realização das análises histológicas.

4.6 Dosagens Bioquímicas Plasmáticas

O plasma troncular total coletado foi centrifugado, (15.000 rpm / min) por três minutos e usados para dosagem de glicose e triglicerídeos por kits enzimáticos

colorimétricos (BIOLAB e BIOCLIN). O valor do jejum de glicose e triglicerídeos foram usados para calcular o índice de triglicerídeos e glicose (TyG), para as fórmulas: $TyG = \ln [\text{triglicerídeo em jejum (mg / dl)} \times \text{Jejum glicose (mg / dl)}] / 2$. O índice TyG é um indicativo de resistência à insulina como apontado por Almeda-Valdés et al., 2018). O plasma também foi usado para dosagem dos níveis de ferro plasmático pelo método 2,4,6-Tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Humano GmbH; Magdeburg; Alemanha) sendo a leitura feita em sistema automatizado Human Star 600.

4.7 Histologia

Após 24h em ALFAC o TAB-I e TAM, assim como baço e fígado, foram lavados e armazenados em álcool 70% em frasco de vidros vedados em temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos passaram por etapas de desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e finalmente foram embebidos em paraplast (SIGMA). Os tecidos emblocados foram submetidos à microtomia, feito cortes semi-seriados de $\leq 7\mu\text{m}$ os quais foram transferidos para lâminas de vidro, corados em Hematoxilina & Eosina (H&E) e posteriormente fotografados com auxílio do fotomicroscópio (OLYMPUS BX60) com câmera de captura acoplada (OLYMPUS DP71). As lâminas coradas em H&E foram utilizadas para análise do número de adipócitos por área e área de adipócitos no TAB-I, para contagem de núcleos nos cortes de fígado e para verificação da área da polpa branca e centro germinativo do baço. Também foi realizada descrição qualitativa do infiltrado de lipídios no TAM.

4.8 Análise Estatística

Foram, inicialmente, aplicados os testes de normalidade e homocedasticidade e quando os resultados foram paramétricos foi aplicado o teste T para amostras independentes, nos casos de dados não paramétricos utilizamos o teste MannWhitney-U. Os dados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para avaliarmos o efeito da FHZ realizamos

a análise de variância Anova de duas vias, quando F significativo, foi realizado o pós-teste de Tukey para dados onde os pressupostos foram aceitos. Em todas as análises $p < 0,05$ foi adotado como critério de significância. Todos os testes estatísticos, bem como a elaboração dos gráficos, foram realizados com auxílio do Software Graph Pad Prism versão 7.0.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Experimental Physiology

<https://ep.msubmit.net>

EP-RP-2021-089883

Title: Phenylhydrazine-induced anemia reduces subcutaneous white adipose and brown adipose tissues in hypothalamic obese rats

Authors: Domwesley Wendreo Souza Vanessa Marieli Ceglarek Bruna Schumaker Siqueira Caroline Zanella Volinski Juliane Zanon Nenevê João Paulo Arruda de Amorim Jean F Vettorazzi Sabrina Grassioli

Author Conflict: No competing interests declared

Running Title: Phenylhydrazine-induced anemia reduces adiposity in obese rats.

Abstract: Iron imbalance is frequent in the obesity. Herein, we evaluated the impact of anemia induced by phenylhydrazine on adiposity and metabolic state of hypothalamic obese rats. Hypothalamic obesity was induced by high doses of glutamate monosodium (MSG; 4g/Kg) administered neonatally (n=20 male rats). Control (CTL; non-obese) received saline equimolar (n=20 male rats). After 21 days of life the rats were weaning and at 70 days of life half of rats received intraperitoneally phenylhydrazine (PHZ; 40mg/Kg; three doses) or saline solution. The body weight and food intake were accompanied by four weeks after PHZ. At 92 days of life the rats were euthanized and blood collected to hematocrit (Hct) microcapillary analysis, as well as, the plasma was used to biochemistry dosage of glucose, triglycerides, total cholesterol and iron levels. The liver, spleen, white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues were excised, weighted and used to histological analysis. MSG-treated rats develop obesity, hypertriglyceridemia and insulin resistance in relation to CTL rats ($p<0.05$); without changes in iron and Hct values ($p>0.05$). The PHZ administration reduced iron plasma levels and provoked similar histological injuries in splenic and liver tissues of MSG and CTL rats. However, in

MSG-obese PHZ causes reduction in fasting glucose and Hct values, as well as, diminished subcutaneous WAT and BAT mass. In conclusion, MSG obese rats have normal iron plasma levels and Hct value than lean rats. However, PHZ-induced anemia in obese induces markedly drop in subcutaneous WAT and BAT mass suggesting higher lipolytic effects at these sites.

New Findings: central question:

Hypoferremia is frequently observed in obese subjects having relationship with insulin resistance and dyslipidemia. Herein, we evaluated iron plasma levels in hypothalamic obese rat and analysed if anemia induced by phenylhydrazine could worsen adiposity and metabolism in this obese model.

Importance:

The hypothalamic obese rats show normal iron and hematocrit values presenting similar splenic and hepatic responses to PHZ-induced anemia than lean rats. However, the PHZ-anemia-induced provoked greater reduction in subcutaneous WAT and BAT mass, indicating that anemia could elevate lipolytic effects in hypothalamic obese rats

Dual Publication: No

Funding: N/A: Sabrina Grassioli, N/A; N/A: Jean F Vettorazzi, N/A; N/A: Bruna Schumaker Siqueira, N/A; N/A: Domwesley Wendreo Souza, N/A; N/A: Vanessa Marieli Ceglarek, N/A; N/A: João Paulo Arruda de Amorim, N/A; N/A: Caroline Zanella Volinski, N/A; N/A: Juliane Zanon Nenevê, N/A N/A

Title: Phenylhydrazine-induced anemia reduces subcutaneous white adipose and brown adipose tissues in hypothalamic obese rats

Authors: Domwesley Wendreo de Souza¹; Vanessa Marielle Ceglarek²; Bruna Schumaker Siqueira¹; Caroline Volinski³; Juliane Zanon Nenevê³; João Paulo de Amorin Arruda⁴, Jean Franciesco Vettorazzi¹, Sabrina Grassioli¹.

1. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – CCBS – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Cascavel, PR, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRG) – Porto Alegre, RS, Brasil
3. Graduação Enfermagem – CCBS - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Cascavel, PR, Brasil.
4. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – CCBS - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Cascavel, PR, Brasil.

Corresponding author: Sabrina Grassioli Rua Universitária, 1619 – Universitário Cascavel - PR – Brasil. Zip cod: 85819-110; phone (55)-(45) 3220-3000. sgrassioli@gmail.com.

Running Title: Phenylhydrazine-induced anemia reduces adiposity in obese rats.

The total number of words: 6567

The total number of references: 35

Abstract: Iron imbalance is frequent in the obesity. Herein, we evaluated the impact of anemia induced by phenylhydrazine on adiposity and metabolic state of hypothalamic obese rats. Hypothalamic obesity was induced by high doses of glutamate monosodium (MSG; 4g/Kg) administered neonatally (n=20 male rats). Control (CTL; non-obese) received saline equimolar (n=20 male rats). After 21 days of life the rats were weaning and at 70 days of life half of rats received intraperitoneally phenylhydrazine (PHZ; 40mg/Kg; three doses) or saline solution. The body weight and food intake were accompanied by four weeks after PHZ. At 92 days of life the rats were euthanized and blood collected to hematocrit (Hct) microcapillary analysis, as well as, the plasma was used to biochemistry dosage of glucose, triglycerides, total cholesterol and iron levels. The liver, spleen, white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues were excised, weighted and used to histological analysis. MSG-treated rats develop obesity, hypertriglyceridemia and insulin resistance in relation to CTL rats ($p < 0.05$); without changes in iron and Hct values ($p > 0.05$). The PHZ administration reduced iron plasma levels and provoked similar histological injuries in splenic and liver tissues of MSG and CTL rats. However, in MSG-obese PHZ causes reduction in fasting glucose and Hct values, as well as, diminished subcutaneous WAT and BAT mass. In conclusion, MSG obese rats have normal iron plasma levels and Hct value than lean rats. However, PHZ-induced anemia in obese induces markedly drop in subcutaneous WAT and BAT mass suggesting higher lipolytic effects at these sites.

Key words: adipocytes, anemia, iron, liver, spleen

Introduction

Obesity results of disarrangements of food intake and energy expenditure, a process regulated by hypothalamic areas (MUNZBERG et al., 2011; BRUNING, 2017). High doses of monosodium glutamate (MSG) administered during first post-natal days results in intensive lesion in hypothalamic nucleus, in particular affecting arcuated nucleus (ARC) (OLNEY, 1969). After ARC lesions the MSG-treated rats develop intense adiposity accompanied of metabolic dysfunctions such as, glucose intolerance, insulin resistance (IR), dyslipidemia, cardiovascular and liver abnormalities (DOLNIKOFF et al., 2001; KONRAD et al., 2012; LEITE et al., 2015). Thus, at long of life MSG-treated rats reproduces central characteristics of metabolic syndrome (MS) typically found in human obese subjects (BARBALHO et al., 2015). Moreover, MSG-obese rats show altered pro-inflammatory state, a condition that frequently accompanies obesity having close relationship with development of MS and non-communicable chronic diseases (NCD) in special, diabetes and hypertension (ROMAN-RAMOS et al., 2011; KONRAD et al., 2012).

More recently data indicates that iron homeostasis disruptions also could be involved in obesity comorbidities including MS (GOTARDO et al., 2013; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2020). Since the decade of 60 several studies have demonstrated reduction in iron (hypoferraemia) in obese subjects, an event that, initially, was related with alterations in dietary iron ingestion, changes in blood volume and muscle mass (ZHAO et al., 2015). However, the discovery of hepcidin protein and its central role in iron homeostasis have revealed new aspects in the relationship obesity, iron and metabolic diseases (DEL GIUDICE et al., 2009; FADEM, 2017).

The adequate iron availability is essential to maintain biological and physiological functions, once that this mineral is necessary for hemoglobin synthesis and production of heme, as well as, to iron-sulfur (Fe/S) clusters, which are components of central proteins/enzymes involved in respiration, nucleic acid replication and repair, metabolic

reactions and host defense. Important, the iron show high ability to accept or release electrons having greater potential to damage cell. Thus, high iron levels are toxic to organisms and tightly controlled iron homeostasis is necessary to prevent both deficiency and overload avoiding pathological states (PAUL et al., 2017). The iron homeostasis is obtained by balance between absorption, utilization, storage and recycling. In this regard, the liver is an important site to iron storage, the blood cells production is important font of iron utilization and spleen and reticuloendothelial system (RES) participates of iron recyclizing (GANZ; NEMETH, 2012; KNUTSON, 2017).

Obesity has been found to influence all tissue targets of iron metabolism having role in pathophysiology of obesity-related anemia in human and rodent obese models. Thus, in overweight and obesity, elevated WAT content predicts higher serum hepcidin contributing to reduction in iron availability and resulting in increased risk for iron deficiency (AUSK; LOANNOU, 2008; ARSHAD et al., 2016; MORENO-NAVARRETE et al., 2017). High fat diet (HFD) consumption is associated with reduction in iron intestinal absorption as well as in renal iron transportation (FERARRI, et al., 2015). Rodent models lacking the active ferritin subunit are unable to develop HFD-induced obesity, as the reduction of intracellular iron deposits ameliorates the inflammatory state. Obese woman with higher central adiposity presented elevated plasmatic levels of hepcidin associated with disruptions in iron homeostasis and reduction in iron absorption (STOFFEL et al., 2020). In contrast, have been observed that obese subjects with fatty liver disease (NAFLD) or MS can develop a condition termed “dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS)” with elevated ferritin concentrations (DATZ et al., 2012).

The transferrin receptor, mediates cellular iron uptake being essential to prevent iron overload. Obese patients present high plasma values of pro-inflammatory cytokines and acute phase reagents, and patients with impaired iron homeostasis manifest iron sequestration when an increase in transferrin saturation is observed (FRAENKEL, 2017). Several studies have demonstrated the influence of transferrin on thermogenesis and it

has been pointed out that obese patients with weight loss have higher plasma levels of transferrin saturation, which supports the hypothesis that obesity causes iron sequestration (FRAENKEL, 2017; LI et al., 2020). Interestingly, MSG-treated rats present alterations in central organs of iron metabolism such as, liver and spleen, suggesting that iron disruption could be contributing to metabolic abnormalities in this obese model. Phenylhydrazine (PHZ) is a hemolytic agent that lyses red blood cells (RBC), reducing hemoglobin concentration and provoking alterations in hematocrit (Hct) (JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; MOREAU et al., 2012). In the present work we evaluated the impact of PHZ administration on histopathological aspects of adipose tissue, liver and spleen in hypothalamic obese rats.

Methods

Animal and ethics aspects

All experimental procedures were previously approved by the Ethics Committee of the University of West Parana (UNIOESTE) in 2017 following the principles established by Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) of Brazil.

Ten pregnancy rats were obtained and allocated in individual cages at bioterium of Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology (LAFEM) – Unioeste, being maintained at controlled luminosity (12h dark-light cycle) and temperature ($23\pm3^{\circ}\text{C}$) and receiving water and rodent chow (BIO BASES/SC) ad libitum. At birth the size of litter was adjusted to 6 pup male rats by dam to avoid lactation milk fluctuation ingestion and sexual hormone of female interference. For 2nd to 6th day after birth, part of the litter (n=50) received subcutaneously monosodium glutamate (MSG) solution in a diary dose of 4g/Kg for body weight (bw), according to the protocol adapted from Olney (1969). In same period non-obese or Control (CTL) group received saline equimolar solution (n=36 male rats). During lactation period the dams and pup remained in controlled luminosity, temperature and had free access to water and rodent chow as describe above. The pups were weaning at 21 days, being regrouped in cages (n=3 male rats/cages) according groups.

Phenylhydrazine administration

At 70 days of life 20 male rats from CTL and MSG-treated groups were randomly selected to receive the first dose of PHZ (40mg/Kg/bw) solution, via intraperitoneal (i.p) which was repeated after 24h and 32h, as indicated by Moreau (2012). Negative groups received, at same period and via, a saline (0.9%) solution. Thus, were originated 4 experimental subgroups (n=10 male rats/group): control-saline (CTL_{saline}); control-phenylhydrazine (CTL_{PHZ}); monosodium glutamate-saline (MSG_{saline}); monosodium glutamatephenylhydrazine (MSG_{PHZ}). The rats were regrouped in cages (n=3 rats) and received free access to water and rodent chow until 90 days of life.

Body weight and food intake

From 72 to 90 days of life were weekly accomplished body weight (BW; g) and food intake (g) consumptions. For this, the rats received an individual mark in tail and were weighed once per week. The body weight gain (Δ BW; g) was obtained by reduction of initial BW (at 70 days) minus the final BW (at 90 days). To analyze of food intake the total of chow offered at start of week was discounted of total chow consumed during the week and the result divided by number of rats in cage and by individual body weight of rat. Thus, food intake was expressed in g/g of BW. The area under curve (AUC) of food intake also was calculated.

Hematocrit Analysis

At 90 days of life the rats (n=10/group) were allocated in individual cages and a blood sample was collected in microcapillary heparinized tubes which were transferred to microcapillary centrifuge with the radius of the cover circumference measuring 13 cm (CENTRIBIO) for five minutes at 4000 rpm. Then, the hematocrit (Hct; %) was obtained from ratio of the volume of red blood cells (RBC) to the total volume of blood, measuring with a Special Card for Reading Hematocrit as accomplished according performed by Gomes et al., 2006.

Euthanasia, Adiposity, Blood and Tissues collection

At 92 days of life and after 12h of fasting the animals were weighed and nasoanal length (NAL; cm) were registered to calculate Lee Index, value using the formulae $\sqrt[3]{BW(g)} / NAL(cm)$ as proposed by Lee (1928). The rats were desensitized by CO₂ and immediately decapitated being the total truncal blood collected in heparinized tubes. In next, the abdominal cavity was opened and the white adipose tissue (WAT) from inguinal depot (WAT-I), the brown adipose tissue (BAT) from scapular region, spleen and liver were excised, cleaned and weighed. Also were excised and weighed WAT from visceral depot, were used the mesenteric (WAT-R) and retroperitoneal (WAT-R) depots.

Blood biochemistry analysis

The total truncal blood collected was centrifuged (15.000 rpm/min) by three minute and the plasma separated and used to dosage of glucose and triglycerides by colorimetric enzymatic kits (BIOLAB and BIOCLIN). The fasting value of glucose and triglycerides were used to calculate the triglycerides and glucose index (TyG), for the formulae: $TyG = \ln [Fasting\ triglyceride\ (mg / dl) \times Fasting\ glucose\ (mg / dl)] / 2$. The TyG index is an indicative of insulin resistance as pointed (ALMEDA-VALDÉS et al., 2018). The plasma also was used to dosage of the levels of iron (Fe⁺²) by 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) method (Human GmbH; Magdeburg; Germany) being reading made in automatized system Human Star 600.

Histological Techniques

The BAT and spleen were used whole, while to liver and WAT retroperitoneal depot was used only a fragment of tissue to histological procedures. Thus, after excised and weighted all tissues or fragments were transferred to ALFAC fixative solution by 24h. In next, the tissues were submitted at phases of dehydration in growing alcohol solution, being diaphanized in xylol and embedded in paraplast (GUARESCHI et al., 2019). Posteriorly, the specimens were manually sectioned with a microtome (Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) to obtain 5-7 µm-thick sections. Dewaxed sections are then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and photographed using an Olympus BX51 (Olympus Microscope, Shinjuku, Japan), and digital photographs were taken with a digital still

36-bit color camera, 1280x1024 pixels, with a DP71 Controller (Olympus). The ImageJ 1.42q software (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, Md), available from the NIH site (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, accessed on January 18, 2019). Each tissue was submitted at particular profile of analysis: i) WAT depots: were evaluated the number and size of adipocytes; ii) BAT depot: were analyzed total area of nuclei expressed in percentage (%) and qualitative analysis of droplets lipids deposition; iii) liver: were noted nucleus number and elaborated a qualitative pathological analysis; iv) spleen: were evaluated white pulp (WP) area, germinative center (GC) area, and lymphatic nodule (LN) thickness, as well as, a qualitative pathological analysis was done.

Statistical Analysis

Data are showed as mean $\pm$ SEM. Student's t test was used to evaluate CTL versus MSG ($p<0.05$). Two-way variance analysis (ANOVA) was used to calculate F value to Obesity (O); PHZ (P) and interaction (I) being applied Tukey post-test to evaluated mean differences between groups ($p<0.05$).

Results

The MSG-treated rats showed reduction in BW and NAL in relation to CTL animals (Table 1; $p<0.0001$). In contrast, the Lee index was significant elevated in MSG-treated rats in comparison to CTL animals ($p<0.036$), indicating obesity installation as confirmed by greater WAT-R content found in MSG-treated animals in relation to CTL rats ($p=0.0003$). Despite of normoglycemia and similar TC values MSG-treated rats presented high TG levels in relation to CTL group ($p<0.0130$). Thus, TyG index was significant higher in MSG-treated rats in relation to CTL animals ($p<0.0007$), indicating insulin resistance. Moreover, Hct

percentage and iron plasmatic levels were similar between CTL and MSG-treated rats (Table 1; $p=0.1551$ and $p=0.2923$, respectively).

The effect of PHZ administration on biometric and metabolic parameters in MSGobese and non-obese (CTL) are showed in Table 2. The BW ($F_{(1,36)}= 114.6$; $p<0.0001$), NAL ($F_{(1,34)} = 179.3$; $p<0.0001$), TG ($F_{(1,36)} = 15.9$ $p=0.0003$), TC ($F_{(1,35)} = 7.639$; $p=0.0090$) and TyG ($F_{(1,36)} = 8.537$; $p=0.0060$) were influenced by MSG-treatment. Thus, MSG-obese presented reduced BW, TC and higher TG plasmatic levels, as well as, elevated value of TyG index confirming insulin resistance ($p<0.01$). Only glucose plasma level was affected by PHZ ($F_{(1,36)}= 17.91$; $p=0.0002$), being plasmatic glucose values in CTL_{PHZ} and MSG_{PHZ} groups smaller in relation to respective saline groups (Table 2). MSG-treatment significantly affected Hct ($F_{(1,36)}= 20.61$; $p<0.0001$); having MSG_{saline} rats smaller

Hct value in relation to CTL_{saline}. Hct also was influenced by PHZ administration ($F_{(1,36)} = 19.88$; $p<0.0001$). Thus, in MSG_{PHZ} groups was noted reduction of Hct value in comparison to other experimental groups (Table 2). MSG-induced obesity no modifies iron plasma levels ($F_{(1,36)} = 0.001078$; $p=0.9740$). However, PHZ factor influenced this parameter ($F_{(1,36)} = 32.70$; $p<0,0001$). Thus, in CTL_{PHZ} and MSG_{PHZ} were noted significant reduction in iron plasma levels in comparison with respective saline groups (Table 2; $p<0.001$).

Body weight and food intake consumption during four weeks after PHZ administration are showed in Figure S1 (supplementary data). The MSGtreatment modifies body weight gain ($F_{(1,36)} = 239.9$; $p<0.0001$), presenting MSG_{saline} and MSG_{PHZ} groups smaller BW in relation to CTL_{saline} rats during this period (Figure S1a and insert). Independent of MSG-treatment or PHZ, the 1st and 2nd week were found gradated reduction in food consumption with recuperation at 4th week (Figure S1b and insert). Thus, the analysis of AUC showed, that neither MSG-treatment ($F_{(1,36)} = 0.6842$; $p=0.4136$) nor PHZ ($F_{(1,36)} = 1.85$; $p=0.1822$) administration altered food intake (Figure 1b and insert).

The MSG-treatment influences WAT-I content ($F_{(1,32)} = 7.983$; $p=0.0081$) as well as adipocyte size ($F_{(1,16)} = 4.738$; $p=0.0448$) and number ($F_{(1,44)} = 8.008$; $p=0.0070$); (Figure 1 a-g). Thus, MSG_{saline} rats showed higher WAT-I content (Fig. 1e); adipocyte hypertrophy (Fig. f) and reduction in adipocyte number (Fig. g) in relation to WAT-I from CTL_{saline} group. WAT-I content $F_{(1,32)} = 7.983$; $p=0.0081$ nu), number $F_{(1,44)} = 27.46$, $p<0.0001$) and size $F_{(1,16)} = 9.406$; $p=0.0074$) also were affected by PHZ administration. Moreover, interaction between obesity and PHZ were observed in all these variables. Thus, in MSG_{PHZ} was found reduction in WAT-I content, accompanied of smaller adipocyte size and high adipocyte numbers in relation to MSG_{saline} (Fig. 1e, f and g). In CTL_{PHZ} were noted only rises in adipocyte size in relation to CTL_{saline}. Representative photomicrography of WAT-I depot stained in H&E are showed in Fig 1a-b. This reduction in WAT-I provoked by PHZ treatment, not was observed in WAT-M depot (Fig. S2; Supplementary data).

The liver weight was influenced by MSG-treatment $F_{(1,16)} = 10.75$; $p=0.0047$ and also by interaction obesity and PHZ ($F_{(1,16)} = 12.37$; $p=0.0029$); without isolated effects of PHZ ($F_{(1,16)} = 0.4308$; $p=0.5209$). Thus, MSG_{saline} animals showed reduction in liver weight in relation to CTL_{saline}; a difference that disappear in MSG_{PHZ} (Figure 2e). In addition, the nuclei numbers in liver were modified by MSG-treatment ($F_{(1,16)} = 5.729$; $p=0.0293$), PHZ administration ($F_{(1,16)} = 119.9$; $p<0.0001$), as well as, by interaction obesity and PHZ ($F_{(1,16)} = 4.962$; $p=0.0406$). Therefore, MSG_{PHZ} and CTL_{PHZ} animals showed high nuclei numbers in liver in relation to respective saline groups (Fig. 2f). Moreover, MSG_{PHZ} presented elevated nuclei numbers in relation to CTL_{PHZ} animals. In visceral WAT-M depot we note only influence of MSG-treatment, without effect of PHZ (Fig. S2; supplementary data). Representative photomicrography of liver, stained in H&E are showed in Fig 2a-d. Pathological hepatic analysis shows higher resident macrophages (Kupffer cells) infiltration and greater number of balloon cells, suggesting an increase in hepatic lipotoxicity and elevated activity of the reticuloendothelial system favoring erythropoiesis in CTL_{PHZ} and MSG_{PHZ} animals in relation to respective saline groups (data not shown).

The weight of spleen was influenced by PHZ ($F_{(1,31)} = 69.08$; $p < 0.0001$) and by interaction obesity and PHZ ($F_{(1,31)} = 8.897$; $p = 0.0055$). Thus, CTL_{PHZ} and MSG_{PHZ} showed higher spleen weight in relation to respective saline groups (Figure 3e). In addition, MSG_{saline} have smaller spleen weight in relation to CTL_{saline}. Histological analysis of spleen showed that PHZ have effect on WP ($F_{(1,16)} = 14.86$; $p = 0.0014$) and GC size ($F_{(1,16)} = 428.0$; $p < 0.0001$). Thus, CTL_{PHZ} and MSG_{PHZ} presented elevated WP and GC size in relation to respective saline groups (Fig. 3e and 3f). The thickness of LN was modified by interaction effect between obesity and PHZ ($F_{(1,16)} = 12.89$; $p = 0.0024$). Thus, MSG_{saline} have smaller LN thickness in comparison to CTL_{saline} (Fig. 3g). Moreover, CTL_{PHZ} showed reduction in LN thickness in relation to CTL_{saline}. Representative photomicrography of spleen, stained in H&E are showed in Fig 3a-d. An increase in the proliferation of splenic cells traveling between WP and red pulp was observed, as well as, an increase in hemosiderin depots in animals CTL and MSG-PHZ treated, suggesting splenic infarction (data not shown).

BAT weight was affected by MSG-treatment ($F_{(1,32)} = 45.66$; $p < 0.0001$); PHZ administration ($F_{(1,32)} = 36.20$; $p < 0.0001$) and also by interaction obesity and PHZ ($F_{(1,32)} = 12.02$; $p = 0.0015$). Therefore, the weight of BAT from MSG_{saline} animals was significant higher in relation to others experimental groups (Fig. 4e). Moreover, MSG_{PHZ} rats presented reduction in BAT weight in comparison to MSG_{saline} animals presenting similar BAT weight that CTL groups. Representative photomicrography of WAT-I depot stained in H&E are showed in Fig 4a-d. Histological qualitative analysis pointed that MSG_{saline} presented high presence of unilocular lipids deposition in BAT in relation to CTL_{saline} group, suggesting reduced thermogenic process. Interesting, greater presence of multilocular droplets lipids were noted in BAT from MSG_{PHZ} in relation to MSG_{saline}. Representative photomicrography of BAT depot stained in H&E are showed in Fig 4a-d.

Discussion

Obesity have been associated with disruptions in iron homeostasis (ZHAO et al., 2015); an event not studied in hypothalamic obese rodents. Herein, we investigated the impact of anemic PHZ agent in liver, spleen, WAT and BAT depots in hypothalamic obese rats. We confirmed efficacy of MSG neonatal treatment to induce obesity and metabolic abnormalities as yet demonstrated by us (GUARESCHI et al., 2019; BALBO et al., 2007) and others (SCALLET; OLNEY, 1986; MIRANDA et al., 2016). Thus, in the present work, the MSG-treated animals showed, in adult life, massive adiposity, hypertriglyceridemia and insulin resistance, as demonstrated by elevated TyG index value. The autonomic imbalance is an important contributor to adiposity in this obesity model (BRAY, 1985). Thus, vagal hyperactivity promotes hyperinsulinemia and favors adipogenesis in MSG-obese rats (MIRANDA et al., 2016). Moreover, reduced sympathetic activity rate contributes with lesser lipolytic effect in WAT and reduction in thermogenic responsiveness in the BAT in MSG-obese rodents (SCALLET; OLNEY, 1986). We also confirmed that adult MSG-obese rats have reduced growth and elevated Lee index value. High doses of MSG administered in first post-natal days promotes intense hypothalamic damage, primarily ablating neurons in arcuate nucleus (ARC). In consequence, MSG-obese show reduced circulating levels of growth hormone (GH) due to inhibition of GHRH production primarily occurring in ARC neurons. The lower GH plasma level contributed by smaller NAL, as observed in this work, and also explains the reduction in organ weight frequently present in MSG-obese rodents (SVED; FERNSTROM, 1979).

Of our knowledge, there is no study evaluating iron levels in this hypothalamic obese model. As mentioned above, the MSG-obese rats develop insulin resistance, dyslipidemia associated with liver (NAKANISHI et al., 2008) and spleen (GUARESCHI et al., 2019) injuries suggesting the iron imbalance also could be present in this obesity animal. Herein, we did not find significant difference in Hct (%) value and iron plasmatic levels in MSG-obese in relation to CTL, suggesting adequate maintenance of iron homeostasis in hypothalamic obese rats. In contrast, Huang et al. 2015 demonstrated positive correlation between

obesity and plasma iron deficiency in adolescents. Reduced plasma iron levels also have been observed in HFD-obese rats (GOTARDO et al., 2013). Other plasmatic biomarker to iron is the ferritin, which values are altered in obese adolescent (FERRARI et al., 2015). Herein, we no evaluated ferritin plasma levels. Moreover, as suggested by González-Domínguez et al., (2020) the impact of obesity in iron homeostasis not is implicates in changes in iron plasmatic parameters, but in a complexes regulatory mechanism that includes intestinal absorption, storage and recycling.

Thus, we utilized the anemic agent PHZ to evaluate the hypothesis that anemia state could to worsen the obesity comorbidities in hypothalamic obese rats. As demonstrated by our data in MSG-obese and non-obese (CTL) condition the PHZ administration reduced iron plasma levels. Moreover, we noted significant elevation in spleen weight associated with high expansion of WP and GC size and elevated hemosiderin deposition in MSG-obese and non-obese PHZ treated. Similarly, elevated liver nuclei numbers were found in MSG-obese and nonobese PHZ treated animals. Taken together, these data confirm effectiveness of PHZ-anemia induction with similar degree of injuries in MSG-obese than those observed in non-obese rats. The PHZ is an antipyretic drug that induces hemolytic anemia in laboratory animals and in humans. As demonstrated by several studies the anemia induced in the rat by PHZ is associated with the activation of the immune system, rises in serum immunoglobulin titers, B lymphocyte population of the peripheral blood and spleen as well as by altered ratio of T helper to T suppressor cells (DORNFEST et a.; 1983). Moreover, PHZ also induces lyses of RBC, reducing hemoglobin concentration and provoking alterations in hematocrit (Hct) (JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; MOREAU et al., 2012).

Anemic state has been related with worsen insulin sensitivity, elevated dyslipidemia and high incidence of MS in obese state (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2020). However, in the present study, MSG anemic rats not showed deterioration in metabolic state. In contrast, HFD induced obesity is associated with alterations in iron and ferritin plasma levels (BERTINATO et al., 2014). According with these authors HFD obese

animal had higher iron requirements compared with non-obese (lean) rats, an event appeared independent of hepcidin, inflammation and intestinal iron absorption. Moreover, study of Dornfest et al., (1992) have showed that PHZ anemia can be reduced by corticoids treatment. In this, regard is important to remember that MSG-obese rodents show hypercorticosteronaemia (TORREZAN et al., 2019), a factor that no avoided anemia installation, as demonstrated in the present work.

Thus, MSG-obese rats have particular responses to anemia condition different in relation to HFD obese rodents or humans obese. In this sense, we noted that PHZ anemia provokes higher reduction in Hct of MSG-obese group in relation to non-obese, suggesting failure in hematological response to anemia in this obese model. Erythropoiesis occurs in bone marrow where hematopoietic stem cells generate the immature progenitors to RBC. During anemia, a growth factor named erythropoietin (Epo) is released by the kidneys and inhibits progenitor apoptosis, allowing a fast production of numerous erythrocytes to recover the anemia. Interesting, new findings indicates that Epo also could affect WAT and metabolic homeostasis (TSUMA et al., 2018; SURESH et al., 2020). Epo may be protective in diet-induced obesity, improves glucose tolerance, reduces insulin resistance and regulates WAT mass accumulation, particularly in male mice (WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2014; ALNAEELI AND NOGUCHI, 2015). It is possible that MSG-obese rats presented deficiently Epo production or responsiveness.

Surprisingly we also noted that, PHZ-induced anemia has impact in WAT mass, in special to subcutaneous WAT depot from obese. In this sense, MSG-PHZ treated rats showed intensive reduction in subcutaneous WAT depot content with accented fall in adipocyte size, suggesting greater lipolysis in this site. Moreover, BAT content also was reduced in MSG-PHZ treated animals. Interestingly, BAT mass reduction was associated with smaller lipids deposition and elevated presence of multilocular droplets lipids profile and elevated nuclei area, suggesting BAT thermogenesis activation. The SNS is important modulator of WAT and BAT lipolysis, of note, subcutaneous WAT is more susceptible to beige phenomenon a process directed by high rate of SNS (SHIN et al., 2018).

Stress condition, such as, fasting and cold are able to promote augmented brown-like adipocytes in subcutaneous WAT. The MSG treated rats have recognized lower SNS flux. Thus, it is possible that PHZ-induced anemia be a stressor event reacting SNS to BAT and WAT of MSG-obese rats elevating lipolysis and reducing WAT subcutaneous and BAT mass. The ability of exercise to restore SNS flux and reduce WAT content yet has been observed in MSG-obese mice. Confirming this hypothesis, Fth-deleted mice, showed higher WAT lipolysis induced by high the production of norepinephrine released by the SNS (BLANKENHAUS et al., 2019). Moreover, nutritional iron deficiency is associated with norepinephrine accumulation in blood and urine, as well as with loss of adaptive thermoregulation (DILMANN, et al., 1979).

As aforementioned anemia induces Epo production which has potential to regulate WAT mass (SURESH et al., 2020). Despite presence of Epo receptor in WAT subcutaneous, in human obese this receptor not was able to induce lipolysis (CHRISTENSEN, et al., 2016). In contrast, Epo was effective to reduce WAT inflammation in HFD-obese mice, an effect that may be mediated by hypothalamic areas, in particular, Arc region (ALNAEELI, et al., 2014). Important, MSG causes damage in Arc region, blocking Epo hypothalamic effects. Thus, it is possible that Epo in MSG-obese rats acts in another hypothalamic nucleus to reactive SNS periphery flux. In addition, insulin, it is a well-recognized lipogenic hormone, having central role in MSG adiposity (BALBO et al., 2007). Herein we not evaluated insulin plasma levels, but is important to note that fasting glycemia was reduced in MSG_{PHZ} rats, suggesting effect on glucose homeostasis. PHZ induced anemia by elevated SNS could reduce insulin plasma levels contributing to lipolysis in WAT.

Finally, several studies have demonstrated that during the anemia of inflammation, hepcidin transcription is increased due to inflammatory stimuli. Increased transcription can be a direct result of activation of Toll-like receptors by inflammatory stimuli or indirectly due to increased levels of inflammatory cytokines such as Interleukin-1 or Interleukin-6. Hepcidin transcription will persist as long as the inflammatory cytokines or

inflammatory stimuli are present. Increased hepcidin levels downregulate ferroportin leading to a hypoferremia, which if persistent can lead to anemia. Herein, we no found hypoferremia in MSGobese. However, is important to remember that MSG-obese rats show rises in pro-inflammatory cytokines, as TNF alpha in WAT. Thus, the effects of adipokines on local WAT iron metabolism could not be discharge in this obese model.

In conclusion, MSG-obese rats no presented alteration in Hct and iron plasmatic levels having PHZ-induced anemia similar impact in iron plasma levels and histological splenic and liver injuries in this hypothalamic obese model. Anemia in MSG-obese rat no worsen metabolic state. However, PHZ-induced anemia causes more pronounced reduction in glucose and Hct and provoked accented reduction subcutaneous WAT and BAT mass depots from MSG-obese rats suggesting elevated lipolytic effects on these targets.

Financial support: This work no received none financial support.

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

References

- Alnaeeli, M., Raaka, B.M., Gavrilova, O., Teng, R., Chanturuya, T., Noguchi, C.T. (2014). Erythropoeitin signaling: a novel regulator of White adipose tissue inflammation during diet-induced obesity. *Diabetes* 63(7), 2415-2431. <https://10.2337/db13-0883> .
- Arshad, M., Jaberian, S., Pazouki, A., Riazi, S., Rangraz, M.A., & Mokhber, S. (2017). Iron deficiency anemia and megaloblastic anemia in obese patients. *Romanian Journal of Internal Medicine*, 55(1), 3-7. <https://doi.org/10.1515/rjim2016-0046>.
- Ausk, K.J., & Ioannou, G.N. (2008). Is obesity associated with with anemia of chronic disease? A population-based study. *Obesity Journal*, 16(10), 2356-2361. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.353>.

- Balbo, S.L., Grassioli, S., Ribeiro, R.A., Bonfleur, M.L., Gravena, C., Brito, M.N.,...Torrezan, R. (2007). Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocr* 31, 142-148. <https://10.1007/s2020-007-0021>.
- Barbalho, M.S., Bechara, M.D., Quesada, K., Gabaldi, M.R., Goulart, R.A., Tofano, R.J., Gasparini, R.G. Metabolic syndrome, atherosclerosis and inflammation: an inseparable triad ?. *J Vasc Bras*, 14(4), 319-327. <https://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.04315>.
- Bertinato, J., Aroche, C., Plouffe, L.J., Lee, M., Murtaza, Z., Kenney, L.,...Aziz, A. (2014). Diet-induced obese rats have higher iron requirements and are more vulnerable to iron deficiency. *Eur J Nutr* 53, 885-895. <https://10.1007/s00394013-0592-9>.
- Blankenhau, B., Braza, F., Martins R, Bastos-Amador, P., González-García, I., Carlos, A.R.,...Soares M.P. (2019). Ferritin regulates organismal energy balance and thermogenesis. *Molecular Metabolism*, 24, 64-79. <https://10.1016/j.molmet.2019.03.008>.
- Christensen, B., Nølleman, B., Jørgensen, J.O.L., Pedersen, S.B., Jessen, N. (2016) Erythropoietin does not activate erythropoietin receptor signaling or lipolytic pathways in human subcutaneous white adipose tissue in vivo. *Lipids in Health and Disease*, 15(160), <https://doi.10.1186/s12944-016-0327-z>.
- Datz, C., Felder, T.K., Niedersser, D., Aigner, E. (2012). Iron homeostasis in the metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(2), 215-224. <https://doi.org/10.1111/eci.12032>.
- Dilman, E., Johnson, D.G., Martin, J., Makler, B., Finch, C. (1979) Catecholamine elevation in iron deficiency. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1979.237.5.r297>.
- Dornfest, B.S., Naughton, B.A. Johnson, R., Gordon, A.S. (1983). Hepatic production of erythropoietin in a phenylhydrazine-induced compensated hemolytic state in the rat. *J Lab Clin Med*, 102(2), 274-285.
- Fadem, S.Z. The complex relationships between iron regulation, obesity, and anemia. *Management of anemia*, 173-183. https://doi.org/10.1007/978-49397360-6_10.

Ferrari, M., Cuenca-García, M., Valtuenã, J., Moreno, L.A., Censi, L., GonzálezGross, M.,...Leclercq, C. (2015). Inflammation profile in overweight/obese adolescents in Europe: na analysis in relation to iron status. *European Journal of Clinical Nutrition*, 69, 247-255. <https://10.1038/ejcn.2014.154>.

Fraenkel, P.G. (2016). Anemia of inflammation: a review. *Med Clin North Am*, 101(2), 285-296. <https://10.1016/j.mena.2016.09.005>.

Ganz, T., Nemeth, E. Hepcidin and iron homeostsis. *Molecular Cell Research*, 1823(9), 1434-1443. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.014>.

González-Domínguez, A., Visiedo-García, F.M., Domínguez-Riscart, J., González-Dominguez, R., Mateos, R.M., Lechuga-Sancho, A.M. Iron metabolismo in obesity and metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5529. <https://doi:10.3390/ijms21155529>.

Gotardo, E.M.F., Santos, A.N., Miyashiro, R.A., Gambero, S., Rocha, T., Ribeiro, M.L., Gambero, A. (2013) Mice that are fed a high-fat diet display increased hepcidin Expression in adipose tissue. *J Nutr Sci Vitaminol*, 59, 454-461. <https://doi:10.3177/jnsv.59.454> .

Guareschi, Z.M., Ceglarek, V.M., Rodrigues, P.F., Huning, L.P., Festinali, C., Amorim, T.P.A., & Grassioli, S. (2019). Exercise and vitamin D supplementation modify spleen morphology in lean, but not, in monosodium-glutamate-obese rats. *Journal of spleen and liver research*, 1(3), 1-13. <https://10.14302/issn.25782371.jslr-19-2819>.

Huang,Y.F., Tok, T.S., Lu, C.L., Ko, H.C.,Chen, M.Y., Chen, S.C.C. (2015)

Relationship between being overweight and iron deficiency in adolescents. *Pediatrics and Neonatology*, 56(6), 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2015.02.003>.

Jain, S.K., & Subrahmanyam, D. On the mechanism of phenylhydrazine induced hemolytic anemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 82(4), 1320-1324. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(78\)90332-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(78)90332-7).

- Jais, A., & Bruning, J.S. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 127, 24-32. <https://doi.org/10.1172/JC188878>.
- Knutson, M.D. Iron transport proteins: gateways of cellular and systemic iron homeostasis. *Journal of biological chemistry*, 292(31), 12735-12743. <https://doi10.1074/jbc.R117.786632>.
- L. Zhao, X., Zhang, Y., Shen, X., Fang, Y., Wang, F. Obesity and iron deficiency: a quantitative meta-analysis. *Obesity/Nutrition*, 16(12), 1081-1093. <https://doi.org/1111/obr.12323>.
- Miranda, R.A., Torrezan, R., Oliveira, J.C., Barella, L.F., Franco, C.C.S., Lisboa, P.C., ... Mathias, P.C.F. (2016). HPA axis and vagus nervous function are involved in impaired insulin secretion of msg-obese rats. *Journal of Endocrinology*, 230(1), 27-38. <https://doi:10.153/joe-15-0567>.
- Moreau, R., Malu, D.T., Dumais, M., Dalko, E., Gaudreault, V., Roméro, H., ... & Scorza T. (2012). Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and plasmodium-infected mice. *Plos One*, 7(9), 1-11. <https://10.1371/journal.pone.0046101>.
- Moreno-Navarrete, J.M., Rodríguez, A., Ortega, F., Becerril, S., Sabater-Masdeu, M., Latorre, J., ... Fernández-Real, J.M. (2017). Increased adipose tissue heme levels and exportation are associated with altered systemic glucose metabolism. *Scientific Reports*, 7(5305), 1-9. <https://10.1039s41598-017-05597-2>.
- Munzberg, H., Qualls-Creekmore, E., Berthoud, H.R., Morrison, C.D., Yu, S. Neural Control of Energy Expenditure. *Handb Exp Pharmacol*, 233, 173-194. <https://doi.org/10.1007/164>.
- Paul, B.T., Manz, D.H., Torti, F.M., Torti, S.V. Mitochondrial and iron: current questions. *Expert Review of Hematology*, 10(3), 275. <https://doi:10.1080/17474086.2016.1268047>.
- Roman-Ramos, R., Almanza-Perez, J.C., Macedo, R.G., Blancas-Flores, G., Fortis-Barrera, Angeles., Jasso, E.I., Garcia-Lorezana, M., ... Garcia-Lorezana, M. Monosodium glutamate neonatal intoxication associated with obesity in adult stage is characterized by chronic inflammation and increased mRNA Expression of peroxisome proliferator-activated

receptors in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108, 406-413. <https://doi:10.1111/j.1742.2011.00671.x> .

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L.J., Goodman, R., Maughan, B., ... Carroll, J. Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association*, 291(16), 2007-2012. <https://doi:10.1001/jama.291.16.2007>

Scallet, A.C., Olney, J.W. (1986). Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions and hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. *Brain Res*, 374(2), 380-384. [https://10.1016/0068993\(86\)90434-8](https://10.1016/0068993(86)90434-8) .

Stoffel, N.U., El-Mallah, C., Herter-Aeberli, I., Bissani, N., Wehbe, N., Obeid, O., & Zimmermann, M.B. (2020). The effect of central obesity on inflammation, hepcidin, and iron metabolism in young women. *International Journal of Obesity*, 44, 1291-1300. <https://10.1038/s41366-020-0522>.

Suresh, S., Rajvanshi, P.K., Noguchi, C. T. (2020). The many facets of erythropoietin physiologic and metabolic response. *Frontiers in physiology*, 17(10),. <https://10.3389/fphys.2019.01534>.

Torrezan, R., Malta, A., de Souza Rodrigues, W.D.N., Dos Santos, A.A.A., Miranda, R.A, Moura, E.G.,... de Freitas, M.P.C. (2019) Monosodium l-glutamate obesity onset is associated with disruption of central control of the hypothalamic- pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(6),. <https://doi.org/101111/jne.12717>.

Tsuma, Y., Mori, J., Ota, T., Kawabe, Y., Morimoto, H., Fukuhara, S., Kodo, K.,... Hosoi, H. (2018). Erythropoietin and long-acting erythropoiesis stimulating agents ameliorate non-alcoholic fatty liver disease by increasing lipolysis and decreasing lipogenesis via EPO/STAT pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 509(1), 306-313. <https://10.1016/j.bbrc.2018.12.131>

Tables

	CTL (n=15)	MSG (n=15)	p-value
BW (g)	322.8±3.970	244.6±5.825	<0.0001
NAL (cm)	22.62±0.1713	19.32±0.2261	<0.0001
Lee Index	0.03000±0.0002	0.03237±0.0007	0.0036
WAT-R (g)	0.90±0.06	1.61±0.15	0.0003
Glucose (mg/dL)	80.63±3.351	88.94±3.255	0.0853
TG (mg/dL)	78.13±5.938	97.13±4.005	0.0130
TC (mg/dL)	33.19±2.155	32.25± 2.919	0.7979
TyG	4.337±0.0450	4.521±0.0176	0.0007
Hct (%)	56.67±1.26	54.63±0.66	0.1551
Iron (µg/dL)	261.9±11.76	240.5±16.03	0.2923

Table 1. Hypothalamic Obesity characteristics. Data are mean ±SEM. Biochemistry plasmatic variables were collected after fasting (12h). p value was obtained after Student's t test. Legend: CTL: control; MSG: monosodium glutamate; BW: body weight; NAL: naso-anal length; TG: Triglycerides; TC: total cholesterol; Hct: hematocrit; TyG: triglycerides and glucose index.

	CTL _{saline}	CTL _{PHZ}	MSG _{saline}	MSG _{PHZ}	p-value		
					O	P	I
BW (g)	316.50±4.75 ^{c,d}	314.8±8.08 ^{c,d}	235.50±8.73 ^{a,b}	249.2±4.88 ^{a,b}	<0.0001	0.2681	0.3866
NAL (cm)	22.7±0.21 ^{c,d}	19.15±0.28 ^{c,d}	19.15±0.28 ^{a,b}	18.75±0.37 ^{a,b}	<0.0001	0.0221	0.4296
Lee Index	0.30±0.0002 ^{c,d}	0.33±0.006 ^d	0.33±0.001 ^a	0.36±0.001 ^{a,b}	<0.0001	0.047	0.2596
Glucose(mg/dL)	103.84±4.20 ^{b,d}	85.27±4.74 ^a	99.93±3.93 ^d	83.00±3.85 ^{a,c}	0.4660	0.0002	0.8461
TG (mg/dL)	68.3±5.85 ^{c,d}	76.3±3.11	93.2±3.81 ^a	92±6.63 ^a	0.0003	0.5083	0.3721
TC (mg/dL)	35.30±2.98	43.60±3.40 ^d	31.11±3.88	27.80±4.13 ^b	0.0060	0.4949	0.1174
TyG	4.34±0.054 ^c	4.38±0.034	4.529±0.029 ^a	4.45±0.056	0.0255	0.6905	0.1821
Hct (%)	58.00±1.53 ^d	54.00±1.44 ^d	53.90±1.01 ^d	46.90±0.82 ^{a,b,c}	<0.0001	<0.0001	0.2319
Iron (µg/dL)	261.60±19.38 ^{b,d}	149.50±8.26 ^{a,c}	236.10±19.13 ^{b,d}	174.00±15.01 ^{a,c}	0.9740	0.0001	0.1094

Table 2. Effect of phenylhydrazine administration on biometric and plasmatic biochemistry profile on CTL and MSG-obese rats. Data are mean ±SEM; n= 10 rats for group. Biochemistry plasmatic variables were collected after fasting (12h). Two-way Anova analysis with p value showed in column O (obesity), P (phenylhydrazine); I (interaction). The letters above of number show significant difference of p<0.05 in Tukey post-test. ^aCTL_{saline}; ^bCTL_{PHZ}; ^cMSG_{saline}; ^dMSG_{PHZ}. Legend: BW: body weight; NAL: naso-anal length; TG: Triglycerides; TC: total cholesterol; Hct: hematocrit; TyG:

triglycerides and glucose index; CTL: control; MSG: monosodium glutamate; PHZ: phenylhydrazine.

Figures Legends

Figure 1. PHZ-induced anemia reduces subcutaneous WAT mass in MSG-obese rats.

Data are mean $\pm$ SEM (n= 3-5 rats/group). Representative photomicrography (Fig. 1a -d), H&E staining, 40x magnification. (*) indicate adipocyte size; (►) indicate nucleus. Weight of WAT-inguinal (WAT-I; subcutaneous) (Fig. 1e), adipocyte size (Fig. 1f) and adipocyte number (Fig. 1g). The line and letter in graphics represented the F value in Anova-two way (O: obesity factor; P: PHZ factor and I: interaction). Letters above of bars shows Tukey post-test ($p<0.05$) differences: a CTLsaline; b CTLPHZ; c MSGsaline and d MSGPHZ.

Figure 2. PHZ-induced anemia rises nuclei number in liver from CTL and MSG-obese rats.

Data are mean $\pm$ SEM (n= 3-5 rats/group). Representative photomicrography (Fig. 2a - d), H&E staining, 40x magnification. (*) indicate central vein; (►) indicate nucleus. Liver weight (Fig. 2e) and liver nuclei (Fig. 2f). The line and letter in graphics represented the F value in Anova-two way (O: obesity factor; P: PHZ factor and I: interaction). Letters above of bars shows Tukey post-test ($p<0.05$) differences: a CTLsaline; b CTLPHZ; c MSGsaline and d MSGPHZ.

Figure 3. PHZ-induced anemia rise weight of spleen and alter size of WP and GC in splenic tissue of CTL and MSG-obese rats.

Data are mean $\pm$ SEM (n= 3-5 rats/group). Representative photomicrography (Fig. 3a - d), H&E staining, 40x magnification. Black circle WP size; Dashed yellow circle GC size. Spleen weight (Fig. 3e), size of WP (Fig. 3f) and GC (Fig. 3g); LN thickness (Fig. 3h). The line and letter in graphics represented the F value in Anova-two way (O: obesity factor; P: PHZ factor and I: interaction). Letters above of bars shows

Tukey post-test ($p < 0.05$) differences: ^aCTL_{saline}; ^bCTL_{PHZ}; cMSG_{saline} and d MSG_{PHZ}.

Figure 4. PHZ-induced anemia reduces weight and lipids deposition in BAT from MSG-obese rats

Data are mean $\pm$ SEM (n= 3-5 rats/group). Representative photomicrography (Fig. 4a - d), H&E staining, 40x magnification. Dashed yellow indicates multilocular lipids deposition; (*) indicates unilocular lipids deposition; (►) indicates nuclei; BAT weight (Fig. 4e), BAT nuclei area (Fig. 4f). The line and letter in graphics represented the F value in Anova-two way (O: obesity factor; P: PHZ factor and I: interaction). Letters above of bars shows Tukey post-test ($p < 0.05$) differences: aCTL_{saline}; bCTL_{PHZ}; cMSG_{saline} and d MSG_{PHZ}.

Figure S1. Effect of PHZ administration in food intake and body weight in CTL and MSG-obese rats.

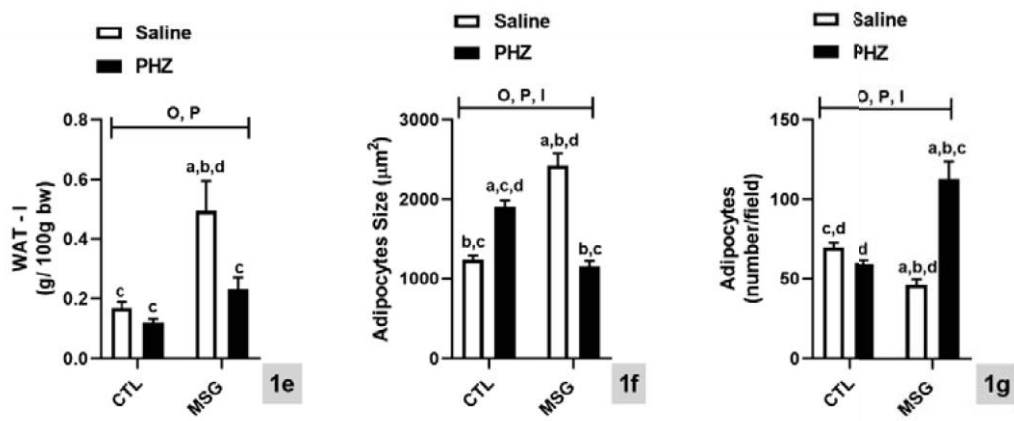
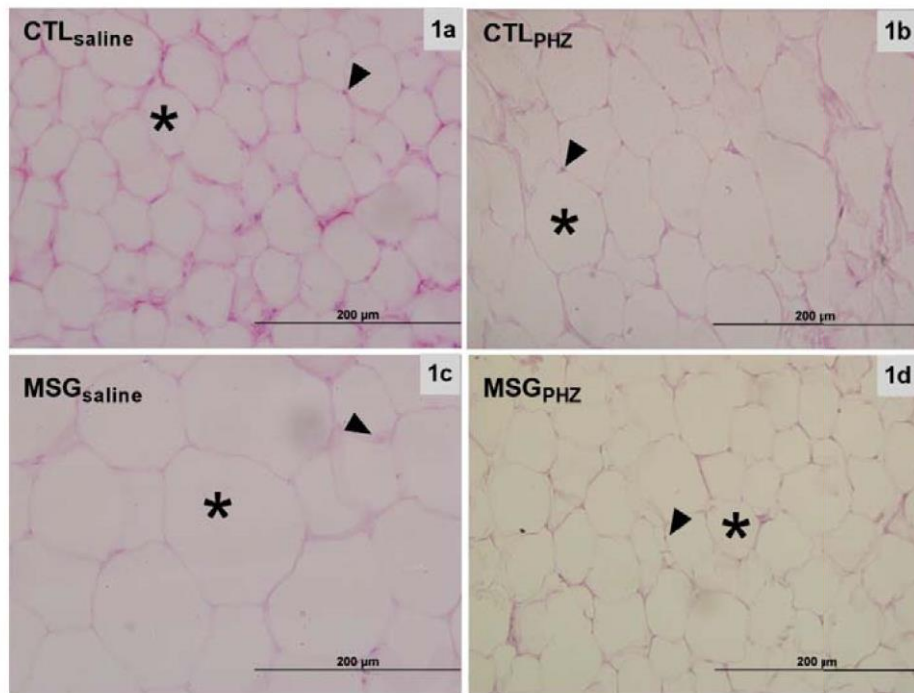
Data are mean $\pm$ SEM (n= 10 rats/group). Body weight gain (Fig. 1a and insert); food intake consumption (Fig. 2a and insert). The line and letter in graphics represented the F value in Anova-two way (O: obesity factor; P: PHZ factor and I: interaction). Letters above of bars shows Tukey post-test ($p < 0.05$) differences: aCTL_{saline}; bCTL_{PHZ}; cMSG_{saline} and d MSG_{PHZ}.

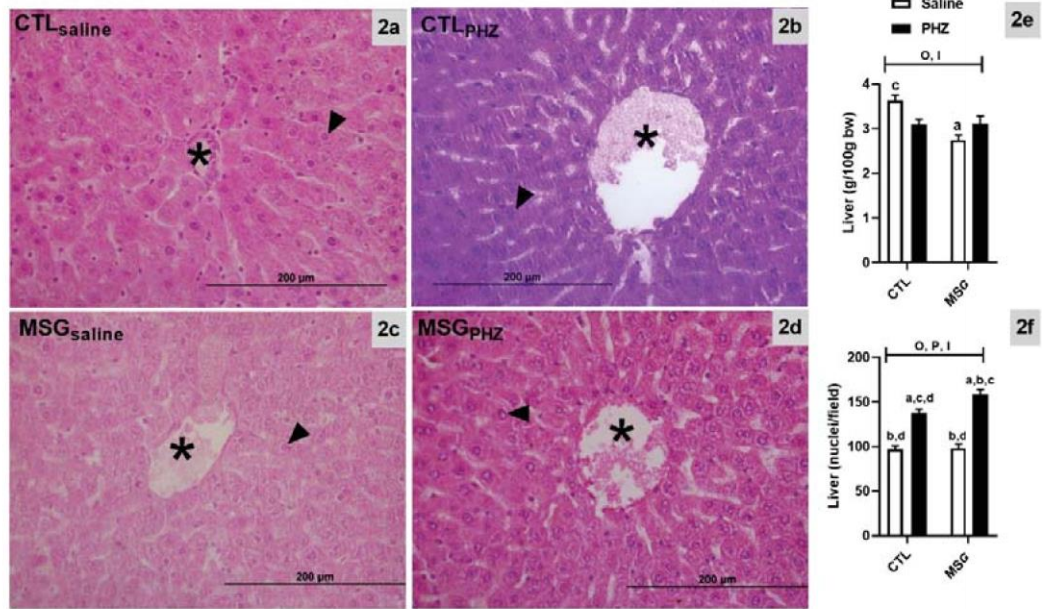
Figure S2. PHZ-induced anemia reduces subcutaneous WAT mass in MSGobese rats.

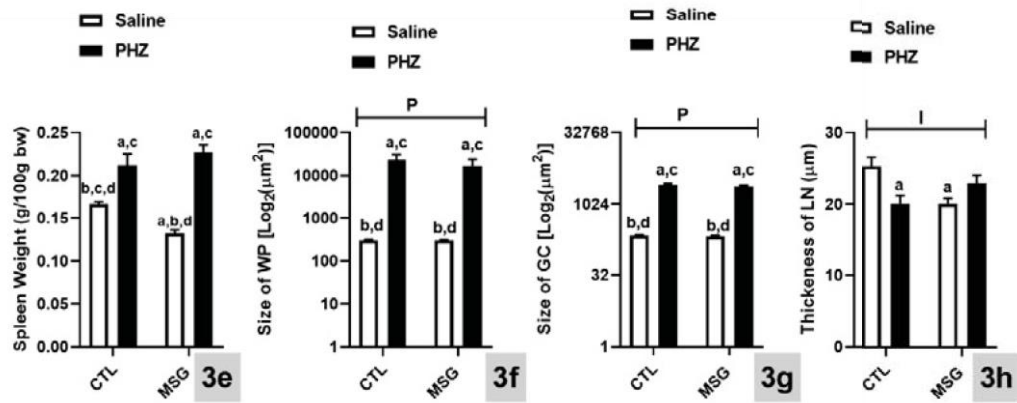
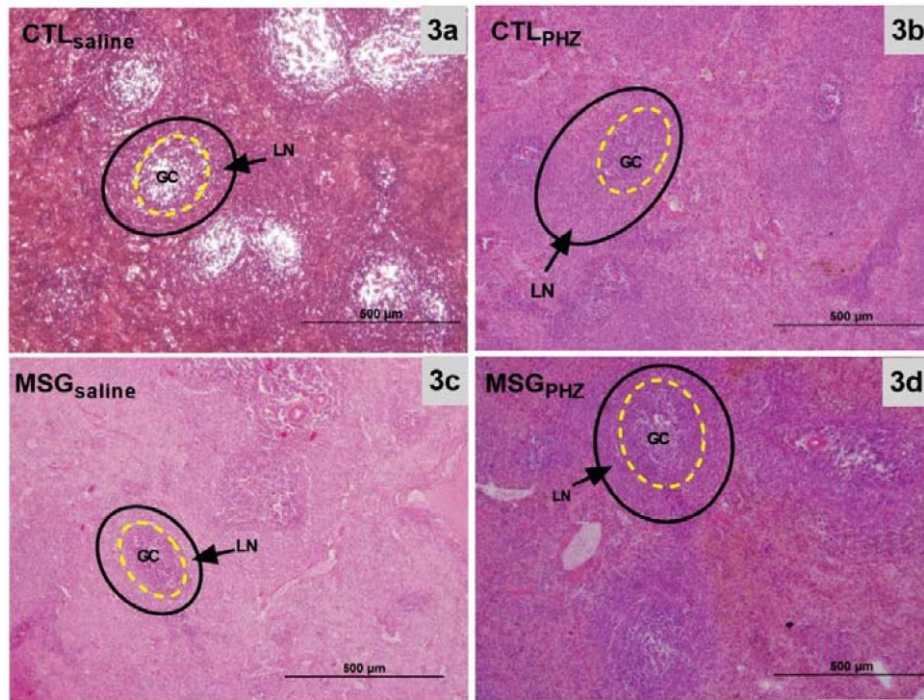
Data are mean $\pm$ SEM (n= 3 rats/group). Representative photomicrography (Fig. 2a -d), H&E staining, 40x magnification. (*) indicate adipocyte size; (►) indicate nucleus. Weight of WAT-mesenteric (WAT-M; visceral) (Fig. 2e), adipocyte size (Fig. 2f) and adipocyte number (Figl 2g). The line and letter in graphics represented the F value in Anova-two way (O: obesity factor; P: PHZ factor and I: interaction).

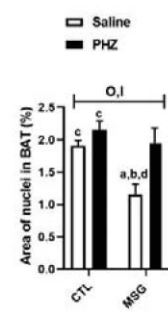
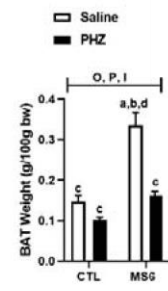
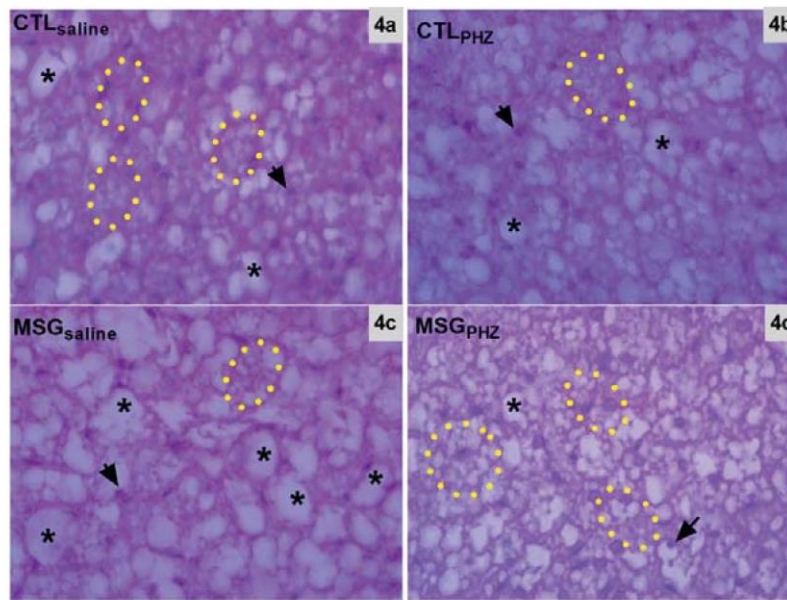
Letters above of bars shows Tukey post-test ($p < 0.05$) differences: a CTLsaline; b CTLPZH; cMSGsaline and d MSGPHZ.

Figures

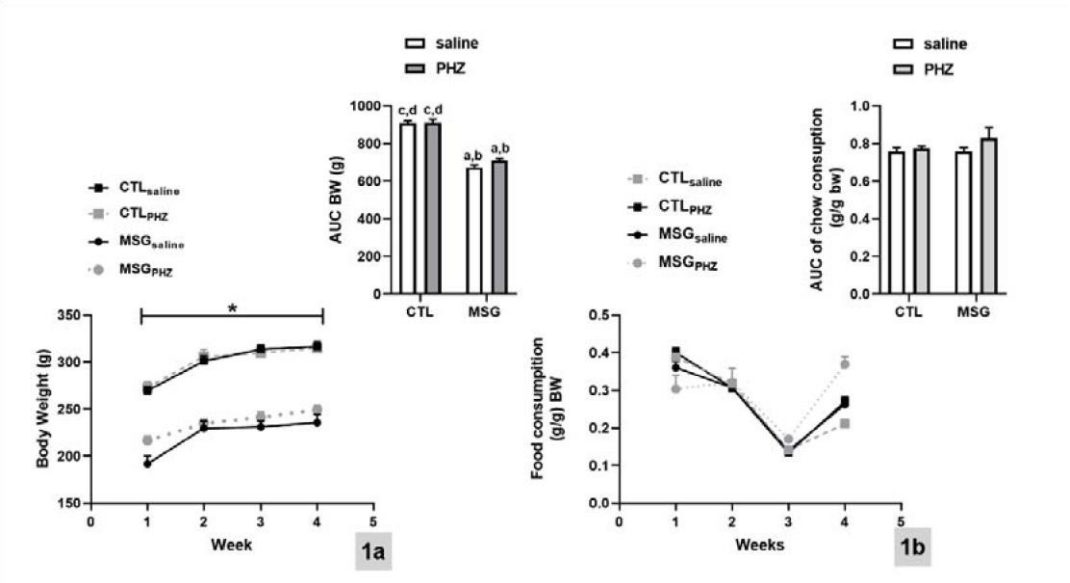








Supplementary data:



6. CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS

A obesidade tem sido associada a distúrbios na homeostase do ferro. Diferentes autores apresentaram resultados em diferentes modelos experimentais de obesidade relacionando obesidade e anemia, sugerindo a existência da relação entre marcadores anêmicos, mecanismos relacionados ao papel de absorção, distribuição e reciclagem de ferro, dos efeitos da homeostase do ferro e o perfil inflamatório do TAB, da relação da homeostase do ferro e SM e da relação dos estoques de ferro intracelular e a diferenciação de macrófagos e adipócitos em animais obesos (GIBSON, 2014; FERRARI, 2015; MORENO-NAVARRETE, 2017; ARSHAD, 2017; ZHOU, 2018; ALOUFI, 2018; MACHADO, 2019).

Até o presente momento, não conhecemos nenhum estudo que tenha avaliado a homeostase do ferro em modelos de obesidade induzida por glutamato monossódico. Contudo, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da administração do agente anêmico fenilhidrazina (FHZ) sobre a adiposidade e estado metabólico de ratos com obesidade hipotalâmica induzida por glutamato monossódico. Considerando os efeitos deletérios relacionados à homeostase do ferro, hipotetizamos que a administração de FHZ pode agravar o estado metabólico de ratos obesos-MSG. Nesse contexto, investigamos o impacto da FHZ em depósitos teciduais do fígado, baço, TAB e TAM, além de avaliarmos o efeito plasmático sobre o ferro, triglicerídeos, glicose e colesterol de animais magros e obesos-MSG tratados com FHZ.

Após a administração de glutamato monossódico, no período neonatal, animais obesos-MSG apresentaram características específicas do modelo experimental como: diminuição do CNA, RI, trigliceridemia, e expansão da massa adiposa (SVED; FERNSTROM, 1979; SCALET; OLNEY, 1989; BALBO, 2007; ANDREAZZI, 2011; MIRANDA, 2016). Após a instalação da obesidade, ratos magros e obesos-MSG sofreram a indução de anemia hemolítica induzida por FHZ, de acordo com o protocolo de Moreau (2012). Após tratamento, os grupos que receberam FHZ, apresentaram redução dos níveis plasmáticos de ferro e aumento significativo do peso do baço associado à alta expansão do tamanho do centro germinativo e da polpa branca no tecido esplênico, assim como a elevada deposição de hemossiderina. Não menos importante, esses animais apresentaram aumento do número de núcleos

hepáticos, características essas apontada no modelo experimental (JONEN, 1982; NAUGHTON, 1990).

Ratos obesos-MSG não apresentaram alterações nos níveis plasmáticos de ferro e do Hct, a anemia induzida por FHZ reduziu os níveis plasmáticos de ferro em animais obesos e não obesos, assim como desenvolveu lesões histológicas esplênicas e hepáticas semelhantes entre os grupos tratados com FHZ. Além de tudo, a anemia induzida por FHZ causou a redução da glicose plasmática em ratos magros e obesos-MSG. Em particular, a obesidade-MSG não teve o estado metabólico agravado pela administração da FHZ, porém ratos obesos-MSG apresentaram redução acentuada do Hct, assim como a redução da massa do TAB e TAM.

Considerando os achados do nosso estudo, acreditamos que a anemia hemolítica, induzida por FHZ, ativa mecanismos intrínsecos para manutenção da hematopoese frente a hemólise, o qual tem repercussão sobre mecanismos promotores da expansão da massa adiposa em roedores obesos-MSG, quando considerado que; a atividade do SNS é diminuída e favorece a hipertrofia de adipócitos em animais obesos-MSG (OLNEY, 1969; SHIN, 2018). Notadamente, após a administração de FHZ em roedores obesos-MSG, foi observada a diminuição dos depósitos de gordura do TAM, assim como foi observada a redução da massa adiposa do TAB. Evidentemente, esses achados podem estar relacionados aos efeitos da EPO sobre o SNS e a regulação da massa adiposa, quando considerado o efeito da EPO sobre o hipotálamo (neurônios POMC) (DORNFEST, 1983; TENG, 2010; NOGUCHI, 2020). Não suficiente a EPO é inversamente proporcional a síntese de hepcidina, sendo esse último, um neuropeptídeo chave na regulação da homeostase do ferro, o qual regula a atividade da ferroportina e o sistema de reciclagem de ferro (ALAMO, 2017). Logo, em períodos de maior uso de ferro plasmático, menor é a síntese de hepcidina (GANZ; NEMETH, 2012). Na hematopoese a EPO tem importante papel na maturação de células vermelhas, sendo assim, o aumento da síntese EPO ocorre para o aumento da maturação de células vermelhas frente hemólise, o que *down* regula a hepcidina, aumentando o efluxo de ferro para o plasma, favorecendo a maturação de células vermelhas.

A hepcidina regula o acúmulo de ferro intracelular. Sabe-se que o ferro intracelular está relacionado à polarização de macrófagos e que, esses últimos, têm papel importante na inflamação de baixo grau da obesidade, considerando que o perfil

inflamatório está intimamente relacionado pela infiltração de macrófagos M1 em diferentes tecidos, em especial o tecido adiposo (ZHOU, 2018). Notadamente, os efeitos da administração de FHZ em roedores obesos-MSG, podem ter ocasionado a modificação do processo inflamatório da obesidade, quando considerados os efeitos da FHZ sobre o sistema imune e o desajuste na homeostase do ferro, requerente de aumento da hematopoese e consequente regulação dos níveis de ferro (DORNFEST, 1983; CORNA, 2010; CAIRO, 2011; SAHA, 2017).

Sendo assim, mesmo se for refutada a nossa hipótese, acreditamos que nosso estudo tem grande importância para o aprofundamento do conhecimento, entre a relação da obesidade e homeostase do ferro, entre estado inflamatório, polarização de macrófagos e ferro frente à expansão do TAB, além de sugerir possíveis vias metabólicas e centrais referentes à regulação da homeostase do ferro.

7. REFERENCIAS

- AL-HAKEIM, H. K.; AL-KHAKANI, M. M.; AL-KINDI, M. A. Correlation of Hepcidin Level With Insulin Resistence and Endocrine Glands Function in Major Thalassemia. **ADVANCED IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**, v. 1, n. 24, p. 69–78, 2015.
- ALNAEELI, M. et al. Erythropoietin Signaling : A Novel Regulator of White Adipose Tissue In fl ammation During Diet-Induced Obesity. v. 63, n. March, p. 2415–2431, 2014.
- ALOUFI, M. E. et al. Prevalence of Iron Deficiency anemia in Obese Children in Taif Area - Saudi Arabia. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 73, n. October, p. 6744–6752, 2018.
- ALVES, P. L. et al. Anti-obesogenic and hypolipidemic effects of a glucagon-like peptide-1 receptor agonist derived from the saliva of the Gila monster. **Toxicon**, v. 135, p. 1–11, 2017.
- ANDREAZZI, A. E. et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 201, n. 3, p. 351–359, 2009.
- ARSHAD, M. et al. Iron deficiency anemia and megaloblastic anemia in obese patients. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 1, n. 55, p. 1–5, 2016.
- ARTICLE, O. Prevalência de anemia em adultos e idosos brasileiros. v. 22, n. Suppl 2, p. 1–15, 2019.
- AUSK, K. J.; IOANNOU, G. N. Is obesity associated with anemia of chronic disease? A population-based study. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2356–2361, 2008.
- BALBO, S. L. et al. Vagotomy Reduces Obesity in MSG-treated Rats. **Research Communications in Molecular Pathology**, v. 108, n. 6, p. 291–296, 2000.
- BALBO, S. L. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142–148, 6 abr. 2007.
- BARBALHO, S. M. et al. Síndrome metabólica , aterosclerose e inflamação : tríade indissociável ? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 319–327, 2015.
- BRAY, G. A. Autonomic and endocrine factors in the regulation of food intake. **Brain Research Bulletin**, v. 14, n. 6, p. 505–510, jun. 1985.
- CHATURVEDI, R. et al. Iron-rich drinking water and ascorbic acid supplementation improved hemolytic anemia in experimental Wistar rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 7, p. 856–861, 4 nov. 2014.
- CHOI, D. et al. Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic β cells. v. 207, n. 13, p. 2831–2842, 2010.
- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes by Hemolytic Agents. **Biochemistry**, v. 3, n. 7, p. 895–900, 1964.
- CRISWELL, K. A. et al. Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. **Journal of applied toxicology : JAT**,

v. 20, n. 1, p. 25–34, [s.d.].

DEL GIUDICE, E. M. et al. Hepcidin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 12, p. 5102–5107, 2009.

DEV, S.; BABITT, J. L. Overview of iron metabolism in health and disease. **Hemodialysis International**, v. 21, p. S6–S20, 2017.

DEY, S. et al. Sex-specific brain erythropoietin regulation of mouse metabolism and hypothalamic inflammation. v. 5, n. 5, p. 1–18, 2020.

DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 3, p. 426–433, 18 mar. 2001.

DOYLE, R. L.; MONTEIRO, S. G. SANGUÍNEO PARA PESQUISA DE HEMOPARASITAS EM RATOS E CAMUNDONGOS CONTENTION AND MAKING METHOD OF BLOOD SCRUBBING FOR THE RESEARCH OF HEMOPARASITES IN MICE AND RATS. p. 153–157, [s.d.].

FADEM, S. Z. The Complex Relationships Between Iron Regulation, Obesity, and Anemia. p. 173–183, 2018.

FELIX, A. A. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 3, n. 32, p. 203–208, 2010.

FERRARI, M. et al. Inflammation profile in overweight/obese adolescents in Europe: An analysis in relation to iron status. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 247–255, 2015.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. S192–S203, nov. 2007.

GANZ, T.; NEMETH, E. NIH Public Access. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1434–1443, 2014.

GIBSON, R. S. et al. Tissue iron deficiency and adiposity-related inflammation in disadvantaged preschoolers from NE Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 8, p. 887–891, 2014.

GRASSIOLLI, S. et al. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K⁺ATP channel-dependent but not -independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, v. 30, n. 2, p. 191–6, out. 2006.

JAIN, S. K.; SUBRANANYAM, D. On the Mechanism of Phenylhydrazine-induced Hemolytic Anemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 32, n. May, p. 147–156, 1978.

JELKMANN, W. Regulation of erythropoietin production. v. 6, p. 1251–1258, 2011.

JONEN, H. G. et al. The reaction of phenylhydrazine with microsomal cytochrome P-450. Catalysis of heme modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 8, p. 4404–4411, 1982.

JORDÃO, R. E.; BERNARDI, J. L. D.; BARROS FILHO, A. DE A. Prevalência de

anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 1, p. 90–98, 2009.

KALSBECK, A. et al. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1212, n. 1, p. 114–129, nov. 2010.

KNUTSON, M. D. Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 31, n. 292, p. 12735–12743, 2017.

KODO, K. et al. Erythropoietin (EPO) ameliorates obesity and glucose homeostasis by promoting thermogenesis and endocrine function of classical brown adipose tissue (BAT) in diet- induced obese mice. v. 1, p. 1–21, 2017.

KONRAD, S. et al. Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1209–1214, 1 out. 2012.

LAZAREVA, G. A.; PROKOPENKO, L. G.; UTESHEV, B. S. [Immune and metabolic effects of carnitine and biotin in hemolytic anemia]. **Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya**, v. 65, n. 3, p. 35–9, [s.d.].

LAZARIS, I. A.; GOL'DBERG, R. S.; BOGUSLAVSKAIA, D. M. Effect of fasting on the function of the islands of Langerhans in rats with hypothalamic obesity. **Problemy endokrinologii**, v. 22, n. 4, p. 54–7, 1976.

LEAL, V. DE O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87–94, abr. 2013.

LEE, J. et al. Influence of Body Mass Index on the Growth Hormone Response to Provocative Testing in Short Children without Growth Hormone Deficiency. **Journal of Korean Medical Science**, v. 28, n. 9, p. 1351, 2013.

LEE, M.; KORNER, J. Review of physiology, clinical manifestations, and management of hypothalamic obesity in humans. **Pituitary**, v. 12, n. 2, p. 87–95, 8 jun. 2009.

LIU, Y. et al. Nonerythropoietic Erythropoietin- Derived Peptide Suppresses Adipogenesis , Inflammation , Obesity and Insulin Resistance. **Nature Publishing Group**, v. 1, n. November 2014, p. 1–15, 2015.

LUSTIG, R. H. Hypothalamic obesity after craniopharyngioma: mechanisms , diagnosis , and treatment. **Frontiers in Endocrinology**, v. 2, n. November, p. 1–8, 2011.

MACIA, L. et al. Interleukin-7, a New Cytokine Targeting the Mouse Hypothalamic Arcuate Nucleus: Role in Body Weight and Food Intake Regulation. **BMC Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1–9, 1 abr. 2010.

MAKIMURA, H. et al. Adrenalectomy stimulates hypothalamic proopiomelanocortin expression but does not correct diet-induced obesity. **BMC Physiology**, v. 3, n. 1, p. 4, 2003.

MALTA, D. C. et al. Doenças crônicas não transmissíveis e o suporte das ações intersectoriais no seu enfrentamento. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 19, n. 11, p. 4341–4350, 2014.

MARKOVIĆ, S. et al. Energy production and redox status of rat red blood cells after

reticulocytosis induced by various treatments. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 2, p. 122–132, jun. 2011.

MARTINS, É. et al. Mice That Are Fed a High-Fat Diet Display Increased Hepcidin Expression in Adipose Tissue. **Journal of Nutrition Science and vitaminology**, n. 59, p. 454–461, 2013.

MASARATANA, P. et al. Iron metabolism in hepcidin1 knockout mice in response to phenylhydrazine-induced hemolysis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 49, n. 2, p. 85–91, ago. 2012.

MATTE, A. et al. Peroxiredoxin-2 expression is increased in β -thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 3, p. 457–466, 1 ago. 2010.

MEHRAN, A. E. et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 723–737, 2012.

MIRANDA, R. A. et al. HPA axis and vagus nervous function are involved in impaired insulin secretion of MSG-obese rats. **Journal of Endocrinology**, v. 230, n. 1, p. 27–38, jul. 2016.

MOHR, A. M. HHS Public Access. v. 81, n. 4, p. 705–712, 2017.

MOREAU, R. et al. Alterations in Bone and Erythropoiesis in Hemolytic Anemia: Comparative Study in Bled, Phenylhydrazine-Treated and Plasmodium-Infected Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2012.

MORENO-NAVARRETE, J. M. et al. Increased adipose tissue heme levels and exportation are associated with altered systemic glucose metabolism. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 7, n. February, p. 1–9, 2017.

NAM, S. Y.; MARCUS, C. Growth Hormone and Adipocyte Function in Obesity. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 53, n. 1, p. 87–97, 2000.

NAUGHTON, B. A. et al. Immune activation is associated with phenylhydrazine-induced anemia in rats. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 116, n. 4, p. 498–507, 1990.

NELSON, L. D.; COX, M. M. **Equipe de tradução**. 6. ed. [s.l.: s.n.].

NOGUCHI, C. T. Erythropoietin regulates metabolic response in mice via receptor expression in adipose tissue, brain, and bone. **Experimental Hematology**, v. 92, p. 32–42, 2020.

OGUNRINOLA, O. O. et al. Disruption of Lipid Profile and Alteration of Hepatic Lipoprotein Metabolism Gene Expression in Anaemia-induced Rat. [s.d.].

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science (New York, N.Y.)**, v. 164, n. 3880, p. 719–21, 9 maio 1969.

PAES DA SILVA, M. et al. Obesidade e qualidade de vida. **Acta Medica Portuguesa**, v. 19, n. 3, p. 247–250, 2006.

PANDEY, K. et al. Molecular Mechanism of Phenylhydrazine Induced Haematotoxicity: A Review. n. August, 2018.

- PIEROZAN, P. et al. HHS Public Access. v. 121, n. 2, p. 113–118, 2018.
- PINTO, W. D. J. A FUNÇÃO ENDÓCRINA DO TECIDO ADIPOSEO. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111–120, 2014.
- PRENTICE, A. M. Clinical Implications of New Insights into Hepcidin-Mediated Regulation of Iron Absorption and Metabolism Clinical Implications of New Insights into Hepcidin-Mediated Regulation of Iron Absorption and Metabolism. **Annals of Nutrition e Metabolism**, v. 71, p. 3221–3229, 2017.
- RAMANA, K. V; SRIVASTAVA, S.; SINGHAL, S. S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016. v. 2017, p. 2–4, 2017.
- RAMOT, Y. et al. Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties. **British journal of haematology**, v. 140, n. 6, p. 692–700, mar. 2008.
- REGINA, C. et al. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. **Metabolism**, v. 64, n. 9, p. 1122–1133, 2015.
- RISIKESAN, J.; RISIKESAN, J. No effect of 10 weeks erythropoietin treatment on lipid oxidation in healthy men. p. 1148–1155, [s.d.].
- RODRIGUES, A. et al. Ecocardiografia de pacientes talassêmicos sem insuficiência cardíaca em tratamento com transfusões sanguíneas e quelação. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, p. 75–81, 2013.
- ROMAN-RAMOS, R. et al. Monosodium Glutamate Neonatal Intoxication Associated with Obesity in Adult Stage is Characterized by Chronic Inflammation and Increased mRNA Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, n. 6, p. 406–413, jun. 2011.
- SCALLET, A. C.; OLNEY, J. W. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. **Brain research**, v. 374, n. 2, p. 380–4, 28 maio 1986.
- SCOMPARIN, D. X. et al. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 510–517, 24 dez. 2009.
- SHIH, H.; WU, C.; LIN, S. ScienceDirect Physiology and pathophysiology of renal. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 11, p. 955–963, 2018.
- SHUKLA, P. et al. PHENYLHYDRAZINE INDUCED TOXICITY: A REVIEW ON ITS HAEMATOTOXICITY PHENYLHYDRAZINE INDUCED TOXICITY: A REVIEW ON ITS. n. May 2012, 2014.
- SOUSA, W. DE. Infant iron deficiency anemia in Brazil: a systematic review of the literature Infant iron deficiency anemia in Brazil: a systematic review of the literature. **Revista Científica Multidisciplinar**, v. 5, p. 24–36, 2016.
- SUKHBAATAR, N.; WEICHHART, T. Iron Regulation: Macrophages in Control. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 137, p. 2–20, 2018.
- SURESH, S.; LEE, J.; NOGUCHI, C. T. Effects of Erythropoietin in White Adipose Tissue and Bone Microenvironment. v. 8, n. November, p. 1–10, 2020.

TENG, R. et al. HHS Public Access. p. 1–24, 2013.

TÚLIO, M.; CAMPOS, G. Estresse oxidativo : fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial
Oxidative stress : pathophysiology and laboratory diagnosis. p. 1–8, 2017.

VANNUCCHI, A. M. et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. **Blood**, v. 95, n. 8, p. 2559–2568, 15 abr. 2000.

VIGITEL BRASIL 2016. [s.l: s.n.].

VIGITEL BRASIL 2018. [s.l: s.n.].

WHO. a Vital Investment. **World Health**, 2005.

WOLF, Y. et al. Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. **Nature Immunology**, v. 18, n. 6, p. 665–674, 2017.

YAĞCI, S. et al. The relationship between serum erythropoietin , hepcidin , and haptoglobin levels with disease severity and other biochemical values in patients with COVID- . n. January, p. 1–10, 2021.

YAHAGI, N. Hepatic Control of Energy Metabolism via the Autonomic Nervous System. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 24, n. 1, p. 14–18, 2017.

YANG, P.-C.; MAHMOOD, T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429, 2012.

YANOFF, L. B. et al. NIH Public Access. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 9, p. 1412–1419, 2008.

ZHAO, L. et al. Obesity and iron deficiency : a quantitative. **Word Obesity**, v. 16, n. December, p. 1081–1093, 2015.

ZHOU, Y. et al. Iron overloaded polarizes macrophage to proinflammation phenotype through ROS/acetyl-p53 pathway. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 8, p. 4012–4022, 2018.

ZYUZ'KOV, G. N. et al. Mechanisms of regulation of erythropoiesis during hemolytic anemia. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 4, p. 334–337, out. 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The global burden of chronic. [s.l.], 2019.

Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso em: 23/04/2019.

____ Anemia. [s.l.], 2019. Disponível em: <https://www.who.int/topics/anaemia/en/> Acesso em: 28/06/2019.

____ Obesity and overweight. [s.l.], Feb. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso em: 25/03/2019.

____ Preventing Chronic Diseases a Vital Investment. **World health Organization**, [s.l.], 2005. Disponível em :

https://www.who.int/chp/chronic_disease_report/full_report.pdf
07/05/2019.

Acesso em: