

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**REBECA PRISCILA DE MELO SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE MGLUR5 NA MODULAÇÃO DE  
PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE OBESIDADE EM ANIMAIS  
BACHD**

**BELO HORIZONTE**  
**2019**

REBECA PRISCILA DE MELO SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE MGLUR5 NA MODULAÇÃO DE PARÂMETROS  
INFLAMATÓRIOS E DE OBESIDADE EM ANIMAIS BACHD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciene Bruno Vieira

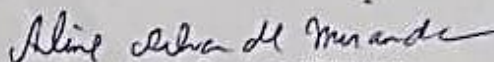
BELO HORIZONTE

2019

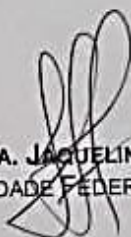
**"INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR  
METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO DO SUBTIPO 5 NA  
MODULAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE  
OBESIDADE EM ANIMAIS BACHD"**

**REBECA PRISCILA DE MELO SANTOS**

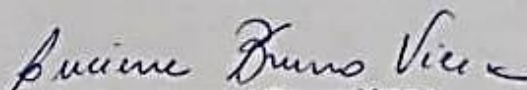
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 06 de maio de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROFA. DRA. ALINE SILVA DE MIRANDA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DRA. JACQUELINE ALVAREZ LEITE**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DRA. LUCIENE BRUNO VIEIRA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 06 de maio de 2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, que me sustentou em todos os momentos e me fez vencer desafios que eu pensei serem impossíveis. Ele que continuamente me demonstra seu amor incondicional e faz com que eu sinta paz, mesmo em momentos de muita turbulência. Ele que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e, principalmente, pelo amor que vocês me proporcionam todos os dias. Obrigada por me mostrarem o valor da educação e pelo exemplo de que jamais devemos desistir de nossos sonhos. Sem vocês eu com certeza não teria chegado até aqui. Agradeço também ao meu irmão, Samuel, pela amizade, pelos abraços, pelo carinho e por sempre me fazer sorrir quando eu estava nervosa. Agradeço aos meus avós, Maria da Penha e José dos Santos que sempre oraram por mim e continuamente me lembravam que com Deus ao meu lado tudo daria certo. Aos meus tios e primos pelo amor e apoio dedicados a mim.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Luciene Bruno Vieira, eu aprendi muito com você nesses quase 5 anos de projetos e pesquisas. Obrigada pelo respeito, educação, carinho e consideração com que você sempre me tratou. Obrigada pela disponibilidade em discutir artigos, resultados e, principalmente, obrigada por sempre se esforçar em fazer o melhor por seus discentes. Você é admirável!

Durante a seleção de mestrado tive a oportunidade de conhecer uma pessoa super especial e espontânea, minha amiga Mariane. Quem diria que duas pessoas tão diferentes se tornariam tão amigas? Como eu sempre te digo, ter sua amizade é um presente maravilhoso de Deus. Obrigada pelas conversas, pelo carinho, por seus conselhos e confiança. Agradeço até pelos micos que pagamos juntas e que você fez questão de postar nas redes sociais. Agradeço por sempre me contagiar com sua alegria e, especialmente, por me oferecer uma amizade tão sincera. Você estará sempre no meu coração!

Também não poderia deixar de fora desse agradecimento minha amiga Anna Paula. Nossa amizade surgiu de uma forma tão repentina e se consolidou tão rapidamente! Ela realmente estava nos planos de Deus! Obrigada por se abrir comigo e por deixar que eu fizesse parte de sua vida. Obrigada por me ouvir e me aconselhar em momentos difíceis e por me deixar fazer o mesmo com você.

Agradeço pelos passeios, pelas idas à igreja e pelos lanches da tarde. Todos esses momentos foram muito especiais. Nunca se esqueça do seu potencial, você é inteligente, dedicada e com certeza obterá sucesso em tudo o que fizer.

Aos amigos que fiz durante esse período no ICB também deixo o meu muito obrigada. Esse agradecimento inclui, principalmente, a Mariana Prata, que conquista a todos com sua educação e amabilidade.

Aos meus aos professores e colegas do laboratório NeuroFar: Antônio, Anna Luiza, Camila, Carla, Carolina Ferrari, Gabriela, Giovanna, Giovanni, Helton, Luciene, Maria Carolina, Suélyn, Roberta, Vívian e Wenderson. Muito obrigada pelo ambiente de trabalho harmonioso, pela disposição em ajudar uns aos outros e pelo vasto crescimento científico e pessoal que vocês me proporcionaram. Em especial quero agradecer ao Giovanni pela ajuda nos experimentos de imunofluorescência e na parte estatística do trabalho. Também agradeço de forma muito especial a Anna Luiza, Carolina Ferrari e Janine pela ajuda com meus experimentos, pelo companheirismo e pelos conselhos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fabíola Ribeiro e aos seus alunos por ter cedido às amostras para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço a Toniana por toda a ajuda que me deu. Todos vocês contribuíram muito para essa pesquisa.

Não posso esquecer-me de agradecer também aos meus amigos: Audrey, Bruna, Karla, Luciano, Edna, Paulo, Elza, além de todos os irmãos em Cristo, muito obrigada pelas orações e por me apoiarem nos momentos difíceis. Amo todos vocês!

A todos os professores e demais funcionários do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realizar o mestrado e pela excelência em ensino e pesquisa.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que me apoiaram nesta etapa de minha vida acadêmica.

## RESUMO

A obesidade, bem como suas comorbidades, representa um grave problema de saúde pública mundial. Em pacientes obesos, o tecido adiposo (TA) apresenta características de um estado inflamatório crônico de baixo grau, o que pode aumentar o risco de desenvolvimento de comorbidades como: aterosclerose, diabetes e resistência à insulina. Nesse estudo utilizou-se o camundongo BACHD, que possui um fenótipo de obesidade, exibindo aumento de peso corporal e ingestão alimentar, além de resistência à insulina e à leptina. Dados da literatura demonstraram que a modulação negativa do receptor metabotrópico de glutamato do subtipo 5 (mGluR5) leva a um menor ganho de peso corporal, menor ingestão alimentar e menores concentrações plasmáticas de insulina e leptina. Assim, decidiu-se investigar se mGluR5 possui a capacidade de modular parâmetros inflamatórios e de obesidade em camundongos BACHD. Para isso, inicialmente foi realizado o cruzamento de camundongos BACHD e mGluR5 *knockout* (mGluR5<sup>-/-</sup>) a fim de obter os seguintes grupos: WT, mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Os resultados obtidos demonstraram que o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou menor ganho de peso corporal e de adiposidade visceral quando comparado aos camundongos BACHD. Adicionalmente, demonstrou-se que aos 12 meses de idade, a concentração de adiponectina no TA epididimal dos animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi maior que nos camundongos BACHD. Além disso, a expressão de leptina no TA retroperitoneal e no somatório médio dos tecidos adiposos viscerais (TAVs) do grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi menor que em camundongos BACHD. O grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> também apresentou maior razão adiponectina / leptina que os camundongos BACHD nos tecidos adiposos epididimal e mesentérico e também no somatório médio dos TAVs. Ademais aos 12 meses de idade, os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentaram maior razão IL-10 / TNF quando comparado ao grupo BACHD no TA epididimal e no somatório médio dos TAVs. Estes resultados indicam que animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuem um menor estado inflamatório nos TAVs, o que então sugere um menor risco de comorbidades. Assim, os dados obtidos sugerem que o mGluR5 pode modular parâmetros de obesidade aos 6 e 12 meses. Além disso, acredita-se que aos 12 meses esse receptor também possa modular parâmetros inflamatórios.

**Palavras-chave:** obesidade; inflamação; mGluR5<sup>-/-</sup>; BACHD; BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>

## ABSTRACT

Obesity, as well as its comorbidities, represents a serious global public health problem. In obese patients, the adipose tissue presents characteristics of a low-grade chronic inflammatory state, which can increase the risk of developing comorbidities, such as: atherosclerosis, diabetes, insulin resistance. In this study was used BACHD mice, which have obesity phenotype. Moreover, BACHD mice show increased body weight and food intake, besides insulin and leptin resistance. Data from the literature have shown that negative modulation of metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) lead to decrease of: body weight, food intake and plasma concentrations of insulin and leptin. Thus, it was decided investigate whether mGluR5 has the ability to modulate obesity and also inflammatory parameters in BACHD mice. For that, crossing of BACHD and mGluR5 (mGluR5<sup>-/-</sup>) knockout mice were initially performed to obtain the groups: WT, mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. The results showed that BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> group presented decreased body weight gain and lower visceral adiposity when compared to BACHD mice. Additionally, it was demonstrated that at 12 months of age, the concentration of adiponectin in epididymal adipose tissue of BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> animals was even higher than in BACHD mice. Moreover, the expression of leptin in the retroperitoneal adipose tissue and also in the average sum of visceral adipose tissues (VATs) of BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> group was lower than in BACHD mice. BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> group also had a higher ratio of adiponectin / leptin than BACHD mice in epididymal and mesenteric adiposo tissue and also in the average sum of VATs. Furthermore, at 12 months of age, BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> mice presented higher ratio of IL-10 / TNF as compared to BACHD group in the epididymal adipose tissue and also in the average sum of VATs. These results indicate that BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> animals have a lower inflammatory state in VATs, which suggests a lower cardiometabolic risk. Thus, the data obtained propose that the absence of mGluR5 seems to reduce weight gain and visceral adiposity in BACHD animals at 6 and 12 months. In addition, it is believed that at 12 months of age, this receptor may promoting an anti-inflammatory environment in the VATs.

**Keywords:** obesity; inflammation; mGluR5<sup>-/-</sup>; BACHD; BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da divisão dos tecidos adiposos.....	20
Figura 2 - Diferenças entre o TA na ausência e presença de obesidade.....	24
Figura 3 - Equilíbrio das respostas imunes na regulação da função do tecido adiposo.....	25
Figura 4 - Mecanismo de resistência à insulina.....	26
Figura 5 - Mecanismo de elevação da lipólise devido a RI.....	27
Figura 6 - Controle hipotalâmico da homeostase energética.....	33
Figura 7 - Obtenção dos genótipos de interesse.....	48
Figura 8 - Genotipagem dos camundongos BACHD.....	50
Figura 9 - Genotipagem dos camundongos mGluR5 <sup>-/-</sup> , mGluR5 <sup>+/-</sup> e mGluR5 <sup>+/+</sup> ..	52
Figura 10 - Curva de peso representativa dos grupos de 2 a 12 meses de idade. ....	58
Figura 11- Camundongos BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam peso corporal igual ao grupo WT em todas as idades.....	60
Figura 12 - Camundongos BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> exibem menor adiposidade visceral que os BACHD aos 6 meses de idade.....	61
Figura 13 - Camundongos BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam menor adiposidade visceral que os WT aos 12 meses.....	61



Figura 14 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam redução da adiposidade visceral no TAE aos 6 e 12 meses de idade.....	62
Figura 15 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> possuem menor adiposidade visceral que os BACHD no TAM aos 6 e 12 meses de idade.....	63
Figura 16 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam menor adiposidade visceral que os BACHD no TAR aos 6 e 12 meses de idade.....	64
Figura 17 - A ausência de mGluR5 reverte a redução de adiponectina observada em animais BACHD no TAE aos 12 meses.....	67
Figura 18 - O grupo BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> possui menor nível de leptina que o BACHD no TAR, aos 12 meses e no somatório médio dos TAVs.....	69
Figura 19 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> exibem maior razão adiponectina / leptina nos TAE e TAM, e no somatório médio de TAVs.....	72
Figura 20 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam maior nível de IFN que os WT e os BACHD aos 12 meses nos tecidos analisados.....	75
Figura 21 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> possuem maior expressão de IL-2 aos 12 meses nos tecidos analisados.....	77
Figura 22 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam maior nível de TNF aos 12 meses nos tecidos analisados.....	79
Figura 23 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam elevação na expressão de IL-6 no TAE, TAR e hipotálamo aos 12 meses de idade.....	81
Figura 24 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> possuem maior expressão de IL-4 aos 12 meses nos tecidos analisados.....	83

Figura 25 - O grupo BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> possui aumento na expressão de IL-10 nos tecidos analisados aos 12 meses de idade.....	85
Figura 26 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> apresentam elevação na expressão de IL-17 A nos tecidos analisados aos 12 meses de idade.....	87
Figura 27 - Há alteração na razão IL-4 / IFN no grupo BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> e BACHD no TAM e hipotálamo, respectivamente aos 12 meses de idade.....	89
Figura 28 - Animais BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> exibem maior razão IL-10 / TNF no TAE aos 12 meses de idade, o que se reflete no somatório médio de TAVs.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estado nutricional de acordo com índice de massa corporal (IMC)...	17
Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação do DNA e identificação de animais BACHD.....	49
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação do DNA e identificação de animais mGluR5 <sup>-/-</sup> , mGluR5 <sup>+/-</sup> e mGluR5 <sup>+/+</sup> .....	51
Tabela 4 – Concentração de adiponectina (pg/mg de proteína) no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	66
Tabela 5 – Concentração de leptina (pg/mg de proteína) no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	68
Tabela 6 – Razão adiponectina/leptina (pg/mg de proteína) no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	71
Tabela 7 – Concentração de interferon (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	74
Tabela 8 – Concentração de IL-2 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	76

Tabela 9 – Concentração de TNF (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	78
Tabela 10 – Concentração de IL-6 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	80
Tabela 11 – Concentração de IL-4 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	82
Tabela 12 – Concentração de IL-10 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	84
Tabela 13 – Concentração de IL-17 A (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	86
Tabela 14 – Razão IL-4 / IFN no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	88
Tabela 15 – Razão IL-10 / TNF no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AdipoR - Receptor para adiponectina
- AGL - Ácidos graxos livres
- AgRP - Peptídeo relacionado à Agouti
- AGS - Ácidos graxos saturados
- AMP - Adenosina monofosfato
- AMPK - Proteína quinase ativada por AMP
- ARC - Núcleo arqueado
- BACHD - Animal transgênico para a doença de Huntington
- BHE - Barreira hematoencefálica
- BSA - Albumina de soro bovino
- cAMP - AMP cíclico
- CART - transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina
- CBA - Cytometric Bead Array
- CHPG - (RS) -2-cloro-5-hidroxifenilglicina
- DAC - Doença arterial coronariana
- DH - Doença de Huntington
- DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica
- DM II - Diabetes mellitus tipo II
- EDTA - Etilenodiamino tetra-acético
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima
- G - Força gravitacional
- GET 73 - (N- [4- (trifluorometil) benzil] -4-metoxibutiramida)
- Glut-4 - Transportador de glicose tipo 4
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico

HFD - Dieta rica em gordura

HL - Hipotálamo lateral

HRP - Enzima peroxidase de rábano

HSL -Lipase hormônio-sensível

htt - Huntingtina

htt - Proteína huntingtina

IFN - Interferon

IKK $\beta$  - IKappa $\beta$  Kinase

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-17 A - Interleucina 17 A

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IMC - Índice de massa corporal

JNK - Jun N-terminal quinase

L - Litros

LEP-R - Receptor para leptina

LT - Linfócitos

MBH - Hipotálamo mediobasal

MC4R - Receptor de melanocortina- 4

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

mGluR1 - Receptor metabotrópico de glutamato do subtipo 1

mGluR5 - Receptor metabotrópico de glutamato do subtipo 5

mGluRs - Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

mhtt - Huntingtina mutante

Min - Minutos

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MPEP - 2-Metil-6-(feniletinil)-piridina

MTEP - 3-[(2-Metil-1,3-tiazol-4-il)etinil]-piridina

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fostato de sódio monobásico

NDM – Núcleo dorsomedial

nM - Nanomolar

NMDAR - Receptor N-metil D-Aspartato

NPV - Núcleo paraventricular

NTS - Núcleo do trato solitário

NVM - Núcleo ventromedial

NYP - Neuropeptídeo Y

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - Ortofenilenodiamina

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PD3B - Fosfodiesterase 3B

pg/mL - Picogramas/mililitros

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsufonila

POMC - Pró-opiomelanocortinas

RI - Resistência à insulina

RNAm - RNA mensageiro

RPM - Rotações por minuto

SDS - sulfato dodecil de sódio

SEM - Erro padrão da média

TA - Tecido adiposo

TAB - Tecido adiposo branco

TAE - Tecido adiposo epididimal

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TAM - Tecido adiposo mesentérico

TAR - Tecido adiposo retroperitoneal

TAS - Tecido adiposo subcutâneo

TAV - Tecido adiposo visceral

TLR4 - Receptor do tipo Toll 4

TNF - Fator de necrose tumoral

Treg - Células T regulatórias

Tris HCl - Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto

WT - Animal do tipo selvagem

$\alpha$ -MSH - Hormônio estimulador de  $\alpha$  –melanócito

$\mu$ g - Micrograma

$\mu$ L - Microlitro

$\mu$ M - Micromolar

5-HT<sub>1A</sub>R - Receptor 1A de serotonina

5-HT<sub>2C</sub>R - Receptor 2C de serotonina



## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
1 REVISÃO DE LITERATURA .....	20
1.1 Obesidade.....	20
1.2 Subdivisões do tecido adiposo .....	21
1.2.1 Composição do tecido adiposo em indivíduos não obesos.....	23
1.2.2 Composição do tecido adiposo em indivíduos com obesidade .....	25
1.3 Obesidade e neuroinflamação.....	32
1.4 Regulação da homeostase energética pelo hipotálamo.....	33
1.5 Tratamento farmacológico da obesidade.....	37
1.6 Obesidade e camundongos BACHD .....	38
1.6.1 A doença de Huntington.....	38
1.6.2 Alterações metabólicas em animais BACHD .....	39
1.7 Papel fisiológico do receptor metabotrópico de glutamato do subtipo 5.....	41
1.8 Influência de mGluR5 na obesidade.....	42
1.9 Papel de mGluR5 na inflamação.....	43
1.9.1 Inflamação central .....	43
1.9.2 Inflamação periférica.....	44
2 JUSTIFICATIVA .....	46
3 OBJETIVOS .....	47
3.1 Objetivos gerais .....	47
3.2 Objetivos específicos .....	47
3 MATERIAIS.....	48
3.1 Genotipagem .....	48
3.1.1 Solução de extração de DNA .....	48
3.1.2 Solução Tris - EDTA 50x.....	48
3.1.3 Solução Tris- EDTA 0,5x.....	48
3.1.4 Solução para PCR para identificação de animais BACHD .....	48
3.1.4 Gel de agarose 2%.....	48

3.1.5 Tampão de amostra (PCR).....	49
3.1.6 Solução para PCR para identificação de animais mGluR5 <sup>-/-</sup> , mGluR5 <sup>+/-</sup> e mGluR5 <sup>+/+</sup> ..	49
3.2 Processamento de tecido adiposo e hipotálamo .....	49
3.2.1 Tampão de extração de citocinas .....	49
3.3 ELISA.....	50
3.3.1 PBS.....	50
3.3.3 Tampão de Lavagem .....	50
3.3.4 Diluente de amostra .....	50
3.3.5 Solução do substrato .....	50
3.3.6 Tampão citrato .....	51
3.3.7 Solução stop.....	51
3.3 CBA.....	51
4 MÉTODOS .....	51
4.1 Animais experimentais .....	51
4.2 Genotipagem .....	52
4.2.1 Extração de DNA .....	52
4.2.2 Amplificação do DNA para identificação de animais BACHD .....	53
4.2.3 Amplificação do DNA para identificação de animais mGluR5 <sup>-/-</sup> , mGluR5 <sup>+/-</sup> e mGluR5 <sup>+/+</sup> .....	55
4.3 Quantificação da gordura visceral.....	56
4.4 Mensuração de peso corporal .....	57
4.5 Processamento de tecido adiposo e hipotálamo .....	57
4.6 Dosagens de adiponectina e leptina por ELISA .....	57
4.7 Dosagem de citocinas por Cytometric Bead Array.....	59
4.8 Dosagem de proteína total .....	60
4.9 Cálculo do somatório médio dos TAVs e das concentrações de adiponectina, leptina, razão adiponectina/leptina, razão IL-4 / IFN e razão IL-10 / TNF.....	61
4.10 Cálculo das razões .....	61
4.11 Análise estatística.....	61
5 RESULTADOS .....	63
5.1 Efeito da ausência de mGluR5 sobre o peso corporal e adiposidade visceral de animais BACHD.....	63
5.2 Ausência de mGluR5 em animais BACHD leva a redução da adiposidade visceral. ....	67
5.3 Ausência de mGluR5 gera aumento de adiponectina, redução de leptina e eleva a razão entre adiponectina e leptina.....	69

5.4 A ausência de mGluR5 promove aumento do perfil anti-inflamatório em um contexto de obesidade .....	78
6 DISCUSSÃO .....	97
7 CONCLUSÃO .....	106
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é uma doença crônica caracterizada por um excesso de adiposidade corporal, resultante de um balanço energético positivo, no qual o consumo calórico é maior que o gasto. A obesidade ainda possui causas multifatoriais, onde observam-se uma sobreposição entre fatores genéticos e ambientais (WILLIAMS et al., 2015).

O indicador epidemiológico para o diagnóstico de sobrepeso e de obesidade é o índice de massa corporal (IMC), que é a razão entre o peso corporal em quilograma (kg) e a altura do indivíduo em metros (m) elevada ao quadrado. No entanto, para diagnóstico individual outros métodos além do IMC devem ser utilizados (WORLD HEALTH ORGANIZATION. BODY MASS INDEX – BMI), como, por exemplo, a medida da circunferência abdominal, que reflete bem o conteúdo de gordura visceral (ABESO, 2016). Para a população adulta a OMS definiu a classificação do IMC de acordo com o exposto abaixo (tabela 1).

**Tabela 1 – Estado nutricional de acordo com índice de massa corporal (IMC)**

<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Estado nutricional</b>
Abaixo de 18,5	Baixo peso
18.5–24.9	Peso normal
25.0–29.9	Pré-obesidade (sobrepeso)
30.0–34.9	Obesidade classe I
35.0–39.9	Obesidade classe II
Acima de 40	Obesidade classe III

De acordo com dados da OMS de 2018, a obesidade quase triplicou mundialmente considerando os anos de 1975-2016 no mundo. Em 2016, 39% dos indivíduos com 18 anos ou mais tinham sobrepeso (39% dos homens e 40% das mulheres) e aproximadamente 13% tinham obesidade (11% dos homens e 15% das mulheres). Esses números correspondem a uma população superior a 650 milhões de pessoas com obesidade. Além disso, em 2016 mais de 340 milhões de crianças e

adolescentes entre 5 e 19 anos tinham sobrepeso ou obesidade. Ainda segundo a OMS, a maioria da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade geram uma maior mortalidade que o baixo peso (WORLD HEALTH ORGANIZATION. OBESITY AND OVERWEIGHTY, 2018).

O excesso de adiposidade é um fator de risco para diversas doenças crônicas, incluindo: doenças cardiovasculares, metabólicas, distúrbios músculo-esqueléticos, como osteoartrite, e certos tipos de câncer, como por exemplo, de mama na pós-menopausa e câncer de colo (ZHENG et al., 2017). Ademais, o sobrepeso e a obesidade estão associados ao comprometimento da qualidade de vida do indivíduo, além de gerar problemas de saúde mental como depressão e ansiedade (BELUE, FRANCIS e COLACO, 2009; KASS et al., 2017; KOLOTKIN e ANDERSEN, 2017). Todas essas comorbidades associadas ao excesso de adiposidade corporal aumentam o risco de mortalidade prematura, além de aumentar os gastos em saúde pública (BUCHMUELLER e JOHAR, 2015).

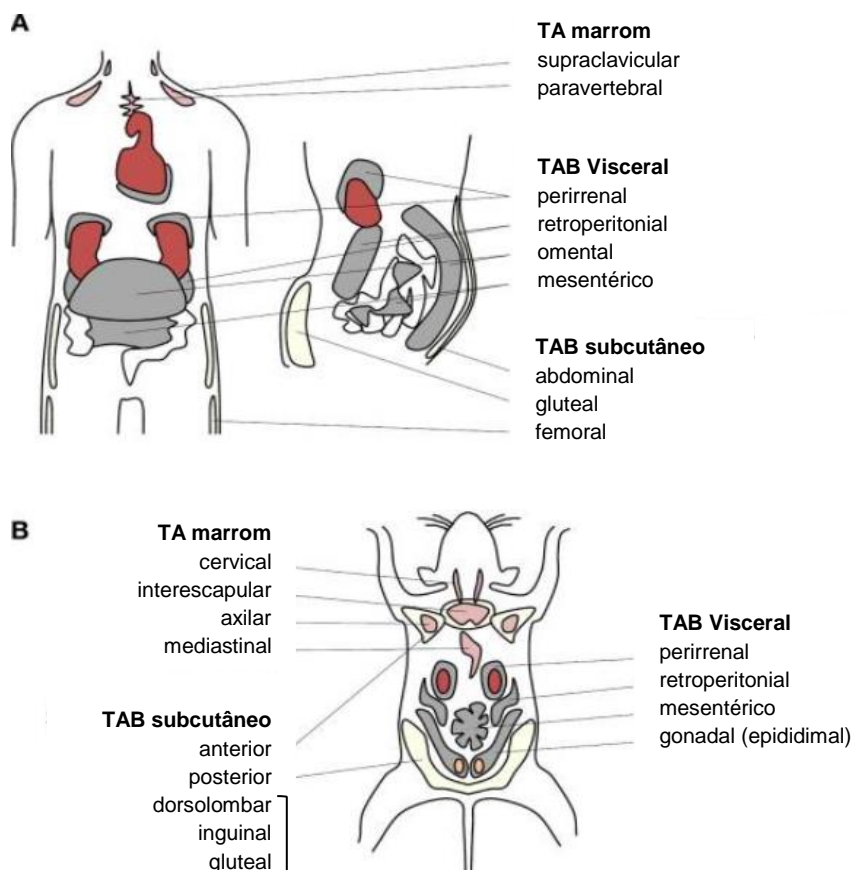
Os fármacos para tratamento da obesidade registrados no Brasil são: anfepramona, femproporex, mazindol, sibutramina, lorcasserina, liraglutida e orlistate (ANVISA, 2017). De forma geral, esses medicamentos não apresentam eficácia em longo prazo e, principalmente os quatro primeiros, podem apresentar vários efeitos adversos como: insônia, cefaleia, hipertensão arterial, risco de acidente vascular encefálico, dependência e distúrbios psicóticos (ANVISA, 2011). Segundo a ABESO (2016) não há um tratamento farmacológico que promova uma adequada redução do peso corporal sem que haja mudança no estilo de vida do paciente. Portanto, devido às poucas opções terapêuticas, baixa eficácia e efeitos adversos provocados pelos medicamentos anti-obesidade, existe a necessidade de se investigar mais profundamente os mecanismos que envolvem essa doença, bem como descobrir novos alvos farmacológicos para o tratamento da obesidade.

## **1.2 Subdivisões do tecido adiposo**

Na figura 1 temos a representação das divisões do tecido adiposo (TA) em seres humanos (figura 1A) e em murinos (figura 1B). O TA em seres humanos é geralmente dividido em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom. O TAB é composto, principalmente, por adipócitos, mas outros tipos celulares também

contribuem para o seu funcionamento. Dentre esses tipos celulares estão: pré-adipócitos, linfócitos, macrófagos com características predominantemente anti-inflamatórias, fibroblastos e células vasculares (OUCHI et al., 2011). O TAB está localizado nos tecidos subcutâneo e visceral, suas principais funções são: isolamento térmico, armazenamento de energia e regulação da homeostase energética. Particularmente, essa última é mediada por adipocinas, que são moléculas de sinalização produzidas pelo TAB (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN 1993; STEPPAN et al., 2001). Contudo sabe-se que o excesso de TAB, em especial o visceral, está associado a complicações metabólicas, como por exemplo, a resistência à insulina (RI) (FUJIOKA et al., 1987). O TAV está mais associado à inflamação sistêmica crônica que o tecido adiposo subcutâneo (TAS), além disso, na obesidade o acúmulo de macrófagos é maior no TAV que no TAS (BRUUN et al., 2005; YU et al., 2006; ALVEHUS et al., 2010). Em adição, de acordo com McLaughlin et al. (2014) células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN $\gamma$  estão mais presentes no TAV que no TAS

O TA marrom tem como principal função gerar calor (termogênese) através da oxidação lipídica, que é realizada pelas mitocôndrias. Acreditava-se que, em humanos, esse tecido só estivesse presente em recém-nascidos, mas estudos evidenciaram a presença de TA marrom em adultos (CYPESS et al., 2009). Ademais, foi demonstrado que a exposição ao frio pode induzir adipócitos do TAB a adquirirem capacidade termogênica, passando assim a serem denominados de adipócitos bege (VITALI et al., 2012).



**Figura 1: Representação da divisão dos tecidos adiposos.** Representação do tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom juntamente com suas subdivisões. (A) No ser humano, o TAB visceral e o subcutâneo armazenam energia na forma de lipídeos. O TAS se localiza abaixo da pele, enquanto o TAV circunda os órgãos intra-abdominais. (B) Em camundongos adultos, o TA marrom é bem mais desenvolvido que no ser humano adulto. Os depósitos de gordura gonadais compõem o TAV e estes são inexistentes em humanos. TA: tecido adiposo; TAB: tecido adiposo branco. Figura adaptada de Choe et al., 2016

### 1.2.1 Composição do tecido adiposo em indivíduos não obesos

O TA em indivíduos não obesos é composto por células imunes anti-inflamatórias, que promovem uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13 (KANG et al., 2008; DAI et al., 2017). Nesses indivíduos o TA apresenta, principalmente, macrófagos com um perfil

predominantemente anti-inflamatório, também chamados de M2 ou alternativamente ativado, que produzem, principalmente, IL-10 (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007).

Ricardo-Gonzalez et al. (2010) demonstraram que a administração de IL-4 em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) foi capaz de reduzir a gordura corporal, a inflamação e melhorar a sensibilidade à insulina. Segundo os autores supracitados estes efeitos ocorreram devido a uma ativação de respostas do tipo Th2 via IL-4, que promoveu a polarização dos macrófagos para um estado predominantemente anti-inflamatório em um contexto de obesidade. Nos TAs, a IL-4 pode ser produzida por eosinófilos e LT CD4<sup>+</sup> (WU et al., 2011). De acordo com Winer et al. (2009), a transferência de LT CD4<sup>+</sup> para animais obesos melhoraria a sensibilidade à insulina dos mesmos predominantemente através de uma resposta do tipo Th2.

De acordo com Feuerer et al. (2009) nos TAs de seres humanos com obesidade e modelos animais dessa doença, há uma redução das células Treg. Além disso, esses autores demonstraram que nos TAs de camundongos deficientes nesse tipo celular, há um aumento da RI induzida por HFD e uma elevação da concentração de citocinas pró-inflamatórias. Devido ao fato de IL-10 estar associada com redução da inflamação no TA e na melhora da sensibilidade à insulina, sugere-se que os efeitos das células Treg sejam mediados por essa citocina (KIM et al., 2004; BLÜHER et al., 2005)

Como supracitado, os adipócitos do TAB secretam adipocinas, as quais possuem papel na regulação do metabolismo sistêmico e podem gerar alterações nas respostas imunológicas no TA (DE ROSA et al., 2007; OUCHI et al., 2011). Uma adipocina importante é a adiponectina, que ativa os receptores para adiponectina AdipoR1 e AdipoR2, estes atuam via proteína quinase ativada por AMP (AMPK), promovendo ações antiobesogênicas, antiaterogênicas e antidiabéticas (YAMAUCHI et al., 2002). A adiponectina pode ainda diminuir a gliconeogênese no fígado, aumentar a captação e utilização de glicose, reduzir a resistência à insulina e aumentar a oxidação lipídica (YAMAUCHI et al., 2002; YAMAUCHI et al., 2003; YOON, et al., 2006). Hotta et al. (2000) demonstraram que o nível plasmático de adiponectina em indivíduos diabéticos é inferior ao nível de indivíduos não diabéticos. Ademais, demonstraram que a perda de peso aumentou a concentração plasmática dessa adipocina tanto em indivíduos diabéticos quanto em não diabéticos. Além disto, a adiponectina também pode atuar no hipotálamo, reduzindo



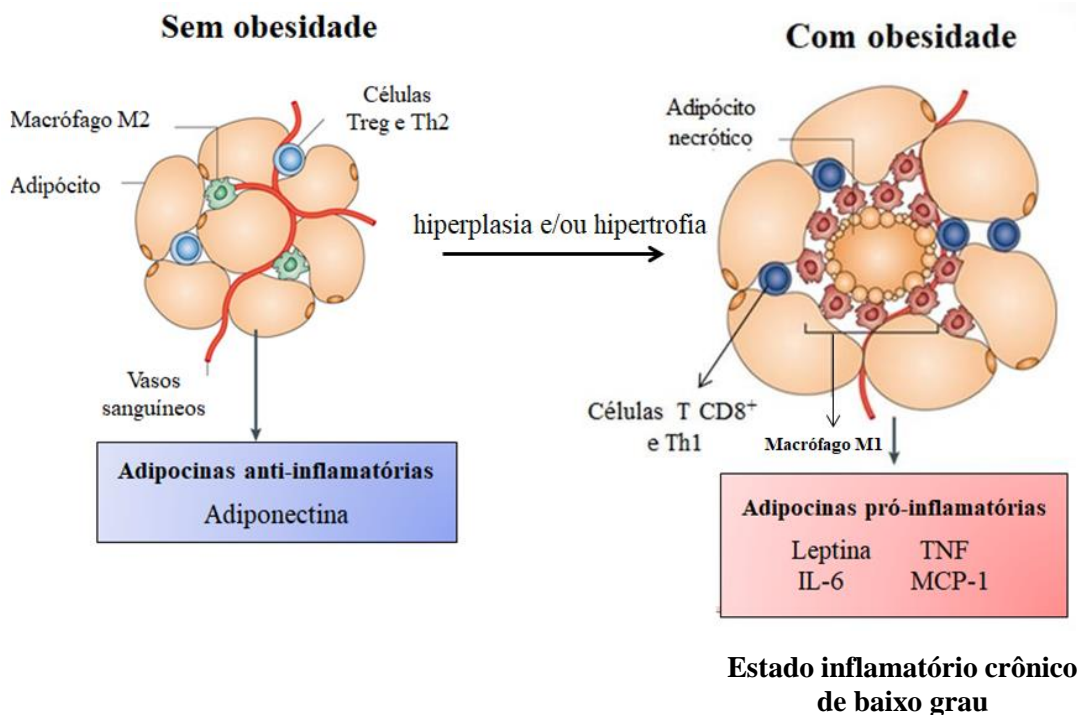
o peso corporal através da diminuição da ingestão alimentar (COOPE et al., 2008) e/ou através da estimulação do gasto energético (QI et al., 2004). Estudos epidemiológicos também sugerem que a deficiência de adiponectina está associada ao desenvolvimento de doença arterial coronariana e de hipertensão (SATTAR et al., 2006).

A adiponectina ainda estimula respostas anti-inflamatórias (FOLCO et al., 2009), promovendo a polarização de macrófagos M1 para M2 (MANDAL et al., 2011). Estes autores trataram macrófagos com adiponectina e observaram que houve um aumento na produção de IL-4, juntamente com aumento da expressão de marcadores para macrófagos M2. Van Stijn et al. (2015) isolaram, cultivaram e diferenciaram macrófagos da medula óssea de camundongos com IFN- $\gamma$  e LPS para um perfil M1 ou com IL-4 e IL-10 para um perfil M2. Esses autores observaram que os níveis de RNAm de AdipoR1 e AdipoR2 foram reduzidos em macrófagos M1. No entanto, em macrófagos M2, os níveis de AdipoR1 e AdipoR2 foram maiores que os encontrados em M1, embora ainda menores que no grupo controle. Desta forma, os autores evidenciaram que a ativação clássica de macrófagos reduz a expressão de AdipoRs. Dados na literatura apontam que a adiponectina é capaz de suprimir a sinalização do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) (MANDAL et al., 2010), que é uma via de sinalização importante na geração de resistência à insulina induzida por dieta (SHI et al., 2006).

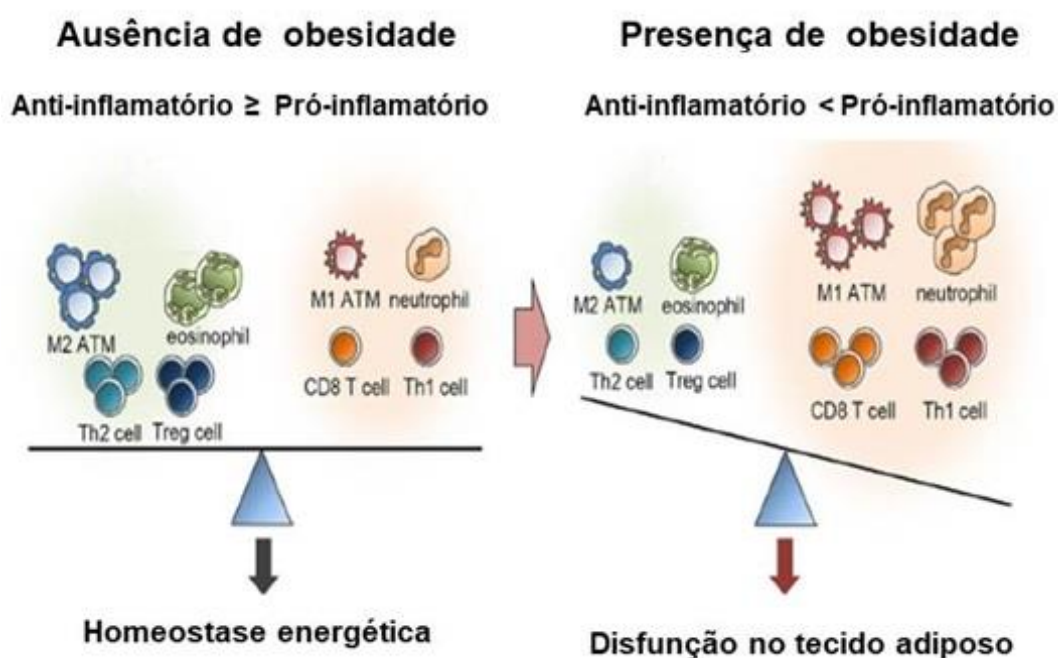
### 1.2.2 Composição do tecido adiposo em indivíduos com obesidade

Em indivíduos com obesidade podem ocorrer alterações na composição do TA, que passa a apresentar características de um estado inflamatório crônico de baixo grau, como mostrado nas figuras 2 e 3 (BULLÓ et al., 2003; SUGANAMI et al., 2007). Ainda na obesidade ocorre hiperplasia (aumento do número) e/ou hipertrofia (aumento do tamanho) de adipócitos, sendo que principalmente, a hipertrofia é responsável por desencadear disfunções metabólicas (KLÖTING et al., 2010; COTILLARD et al., 2014). A hipertrofia de adipócitos pode gerar redução do fluxo sanguíneo, induzindo a hipóxia e, conseqüentemente necrose de adipócitos, o que promove recrutamento de macrófagos e inflamação (CINTI et al., 2005; GIORDANO et al., 2013). Os macrófagos então produzem quimiocinas e citocinas pró-

inflamatórias como IL-8, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). As quimiocinas promovem o recrutamento de outras células imunológicas como linfócitos T (LT) e monócitos, que no TA se transformam em macrófagos com características pró-inflamatórias, aumentando assim a inflamação (HAM et al., 2013). Kintscher et al. (2008) demonstraram através de imuno-histoquímica, que o TA de indivíduos com obesidade é infiltrado por LT CD4<sup>+</sup>. Esses linfócitos produzem citocinas pró-inflamatórias (Th1) em um contexto de obesidade, dentre elas o interferon (IFN), que pode promover a ativação de macrófagos com um perfil predominantemente pró-inflamatório, aumentando assim a inflamação (ROCHA et al., 2008). Ademais, sabe-se que ácidos graxos saturados (AGS) como o palmítico ou o esteárico promovem ativação da cascata de sinalização do TLR4, presente em células como macrófagos. O reconhecimento de AGS por TLR4 ativa a via de sinalização de NF-κB, que ativa a transcrição de vários genes inflamatórios, aumentando desta forma, a expressão de TNF, IL-6 e MCP-1 no TA, o que aumenta a inflamação crônica e promove RI (SHI et al., 2006).



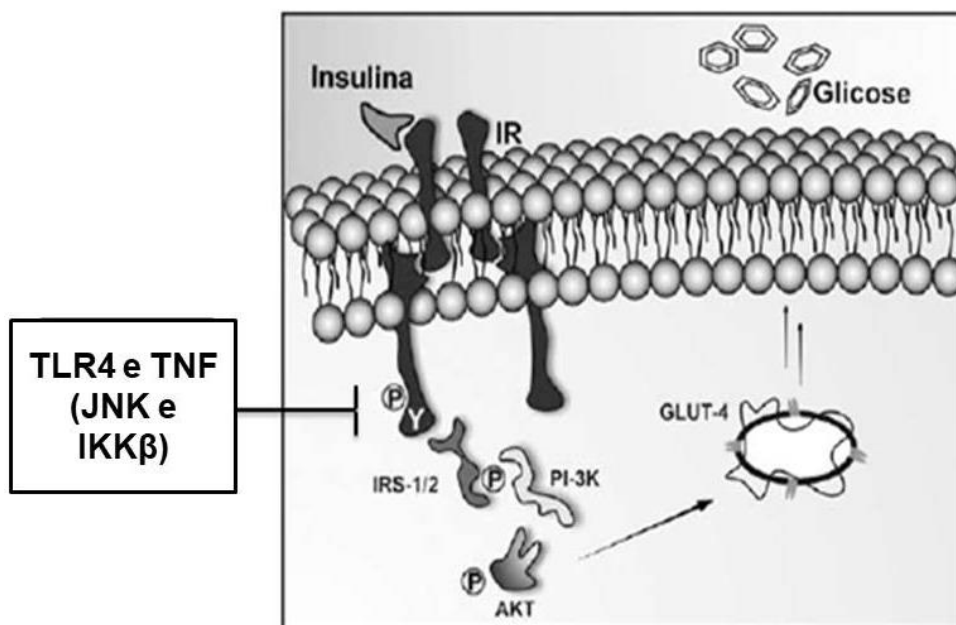
**Figura 2: Diferenças entre os TAs na ausência e presença de obesidade.** Em indivíduos sem obesidade, o TA apresenta macrófagos com um perfil predominantemente anti-inflamatório, células Treg e CD4<sup>+</sup> (Th2). Além disso, as adipocinas produzidas são, principalmente, anti-inflamatórias como, por exemplo, a adiponectina. À medida que a obesidade se desenvolve, os adipócitos sofrem hipertrofia e/ou hiperplasia, e ocorre um acúmulo de macrófagos com um perfil predominantemente pró-inflamatório, LT CD8<sup>+</sup> e LT CD4<sup>+</sup> (Th1). Ademais, o TA produz maiores quantidades de mediadores pró-inflamatórios como: leptina, TNF, IL-6, IL-18 e MCP-1. Figura adaptada de OUCHI et al., 2011.



**Figura 3: Equilíbrio das respostas imunes na regulação funcional do tecido adiposo.** O tecido adiposo de indivíduos não obesos possui várias células imunes, que apresentam um papel anti-inflamatório em um contexto de obesidade, como eosinófilos, macrófagos M2, células Th2 e Treg. Essas células imunológicas ajudam a manter a sensibilidade à insulina além de armazenarem energia extra na forma de triglicerídeos. Contudo, no tecido adiposo de indivíduos com obesidade, o número de células imunes pró-inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos M1, células Th1 e células T CD8 são elevadas. Figura adaptada de CHOE et al., 2016

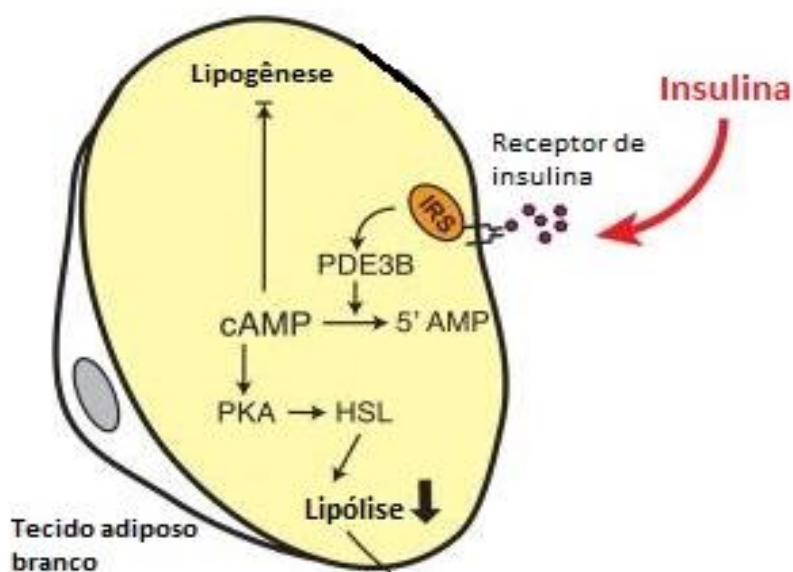
Como supracitado, na obesidade ocorre um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF, que pode levar ao desenvolvimento de RI (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN, 1993). Isso porque TNF ativa serinas quinases como a Jun N-terminal quinase (JNK) e IKK $\beta$ , que promovem a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) em serina (KANETY et al., 1995; HOTAMISLIGIL et al., 1996). Contudo para uma correta sinalização desse hormônio, e consequente translocação do transportador de glicose do tipo 4 para a membrana plasmática da células, é necessário que o IRS seja fosforilado em tirosina e não em serina (figura 4) (LACKEY et al., 2016). Portanto, através desse mecanismo TNF pode promover a ocorrência de RI (UYSAL

et al., 1997). Em adição, sabe-se que JNK e IKK $\beta$  também são ativadas por TLR-4 em resposta aos AGS, o que contribui para a ocorrência de RI na obesidade (WEATHERILL et al., 2005).



**Figura 4: Mecanismo de resistência à insulina.** Ao se ligar ao seu receptor, a insulina promove a autofosforilação da subunidade beta em resíduos de tirosina, ativando-o. A ativação do receptor de insulina resulta na fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). A fosforilação dos IRS cria sítios de ligação para a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo sua ativação. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) e isso promove a translocação do transportador de glicose tipo 4 (Glut-4) para a membrana celular, permitindo assim o transporte de glicose para o meio intracelular. As quinases Ikk $\beta$  e JNK são ativadas na via de sinalização de TNF e de TLR4 em resposta à AGS. Essas quinases podem interferir na sinalização da insulina, pois podem fosforilar diretamente IRS-1 e IRS-2 em resíduos de serina, inibindo assim o transporte de Glut-4 para a membrana celular, o que gera a RI. Figura adaptada de Pauli et al., 2009.

A RI nos adipócitos aumenta a lipólise, elevando assim a liberação de ácidos graxos livres (AGL), que podem se acumular em tecidos como o fígado e o músculo, gerando lipotoxicidade e RI nesses tecidos (BODEN et al., 1994). Isso ocorre, pois, fisiologicamente a insulina ativa a fosfodiesterase 3B, inibindo a formação de AMP cíclico, o que impede a ativação da lipase hormônio-sensível, e conseqüentemente, reduz a lipólise (SCHERER et al., 2011). Contudo, com a RI nos adipócitos esse processo é inibido, gerando aumento da lipólise e da liberação de AGL (figura 5). A presença de AGL no fígado ainda promove a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a RI hepática, o que compromete as ações da insulina para inibir a gliconeogênese, promovendo hiperglicemia (RUTKOWSKI, STERN e SCHERER, 2015). Na obesidade as células de Kupffer são ativadas, contribuindo para a inflamação no fígado, além disso, ocorre um recrutamento de macrófagos, que leva ao aumento da inflamação e reduz a sinalização de insulina, promovendo resistência à mesma (MORINAGA et al., 2015).



**Figura 5: Mecanismo de elevação da lipólise devido a RI.** Fisiologicamente a insulina ativa a fosfodiesterase 3B (PD3B), o que promove degradação de AMP cíclico (cAMP). Isso impede a ativação da lipase hormônio-sensível (HSL), reduzindo a lipólise. Com a RI nos adipócitos essa via de sinalização é inibida, gerando assim aumento da lipólise. Figura adaptada de SCHERER et al., 2011.

Na obesidade, o excesso de ingestão calórica juntamente com a disfunção hepática induzida por AGL, que gera um aumento na produção hepática de lipoproteínas VLDL ricas em triglicerídeos, pode elevar o nível circulante desses triglicerídeos, promovendo a dislipidemia (CARVALHO et al., 2019). Isso ocorre, pois os triglicerídeos podem ser hidrolisados aos seus ácidos graxos de cadeia longa por lipases de lipoproteínas presentes no endotélio vascular, neurônios e glia (SEO et al., 2000). Estes lipídios podem então se depositar nos vasos sanguíneos, gerando aterosclerose, o que pode causar problemas cardiovasculares como trombose, infarto e acidente vascular cerebral (O'BRIEN et al., 2017).

Outra mudança que ocorre no TA de indivíduos com obesidade é a redução na produção de adiponectina (HOTTA et al., 2000), o que resulta em diminuição da captação de glicose (YAMAUCHI et al., 2003), da oxidação lipídica (YOON et al., 2006) e da regulação anti-inflamatória (FOLCO et al., 2009).

Outra adipocina que apresenta sua produção alterada na obesidade é a leptina. A concentração desta adipocina na circulação sanguínea é proporcional à quantidade de TA, e ela age inibindo os neurônios AgRP e ativando os neurônios POMC, gerando redução da ingestão calórica e aumento do gasto energético (COWLEY et al., 2001). Camundongos com deficiência em leptina (ob/ob) ou no receptor de leptina (db/db) são obesos devido ao apetite descontrolado que apresentam (PELLEYMOUNTER et al., 1995; CHEN et al., 1996). A leptina também possui a capacidade de promover oxidação lipídica e biogênese mitocondrial, além de aumentar o gasto energético (MINOKOSHI et al., 2002; GUO et al., 2008). Com a obesidade, ocorre um aumento na produção de leptina (WENSVEEN et al., 2015), contudo isso não gera redução do apetite em indivíduos obesos, pois eles apresentam resistência hipotalâmica à leptina, o que inibe o controle do apetite (MÜNZBERG et al., 2004). A leptina também exerce efeitos no sistema imunológico, seu receptor (LEP-R) sinaliza através de Stat3 e é expresso na maioria das células imunológicas, incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T (BANKS et al., 2000; PÉREZ-PÉREZ et al., 2017). Animais ob/ob e db/db além de apresentarem obesidade, possuem deficiência imunológica devido à falta de sinalização leptínica (MORAES-VIEIRA et al., 2014). Estudos utilizando tais modelos animais revelaram reduções na fagocitose de macrófagos e na expressão de citocinas pró-inflamatórias, efeitos que foram revertidos após a administração do hormônio em questão (LOFFREDA et al., 1998). Em pacientes com resposta imune debilitada

foram encontrados baixos níveis plasmáticos de leptina, e o tratamento da doença elevou os níveis desse hormônio até a normalidade (PERNA et al., 2013). Nas células T e B ocorre um aumento na expressão do LEP-R em resposta à sua ativação (PAPATHANASSOGLU et al., 2006). Ademais, Haas et al. (2008) demonstraram que o tratamento periférico com leptina resultou em aumento específico de granulócitos, monócitos e células NK na circulação de ratos. Esses autores observaram também que o tratamento central não foi capaz de gerar os efeitos supracitados.

### **1.3 Obesidade e neuroinflamação**

O núcleo arqueado (ARC) faz parte do hipotálamo médio basal (HMB) e é uma importante região para o controle da ingestão alimentar e do gasto energético (MINEUR et al., 2011). Segundo Valdearcos et al. (2014) o estado inflamatório que ocorre em tecidos periféricos na obesidade pode alcançar o HMB, pois a barreira hematoencefálica (BHE) que envolve essa região possui uma natureza fenestrada. Assim, tanto AGS quanto elementos pró-inflamatórios presentes na circulação sanguínea de indivíduos com obesidade podem alcançar o HMB e produzir neuroinflamação (VALDEARCOS et al., 2014). O consumo excessivo de AGS pode aumentar o número e o tamanho de células microgliais no ARC, além de aumentar o nível de citocinas pró-inflamatórias, indicando que essas células podem induzir neuroinflamação independentemente de uma inflamação periférica (THALER et al., 2012). Thaler et al. (2012), através de exames de ressonância magnética, encontraram evidências de microgliose no HMB de seres humanos com obesidade. Ainda, segundo André et al. (2017), a inflamação nessa região hipotalâmica ocorre antes mesmo do estabelecimento da obesidade.

Devido à inflamação no hipotálamo, pode ocorrer resistência à leptina e à insulina nos neurônios que regulam a homeostase energética, o que pode aumentar a ingestão calórica, reduzir o gasto energético, gerando assim ganho de peso (JAIS e BRÜNING, 2017). A inibição da sinalização central do TLR4 reverte a resistência à leptina (MILANSKI et al., 2012) e à insulina (POSEY et al., 2009) induzida por HFD, sugerindo que a redução da inflamação hipotalâmica pode restaurar a sensibilidade a estes hormônios. Além disso, a inibição de TLR4 reduziu a massa corporal de



animais com obesidade induzida por dieta (MILANSKI *et al.*, 2012). Como dito anteriormente, AGS podem promover aumento no número e no tamanho de células microgлияis, gerando neuroinflamação (THALER *et al.*, 2012). Valdearcos *et al.* (2014, 2017) demonstraram que a depleção da microglia pode anular a inflamação induzida por AGS no HMB e o estresse neuronal induzido pelo seu consumo excessivo. Além disso, pode aumentar a sinalização da leptina, diminuindo a ingestão de alimentos. Esses autores também observaram que a restrição da sinalização microglial dependente de NF- $\kappa$ B reduziu a microgliose, o que impediu a entrada de células mielóides derivadas de medula óssea no HMB, além de reduzir a hiperfagia e ganho de peso pela dieta rica em gordura.

#### **1.4 Regulação da homeostase energética pelo hipotálamo**

Uma das funções do hipotálamo é regular o balanço energético (MINEUR *et al.*, 2011). Algumas regiões do hipotálamo, como hipotálamo lateral (HL), núcleo dorsomedial (NDM), núcleo paraventricular (NPV) e núcleo ventromedial (NVM) promovem mecanismos neurais que afetam a ingestão de alimentos. A destruição dos NPV (LEIBOWITZ, HAMMER e CHANG, 1981), NVM (SHIMIZU *et al.*, 1987) e NDM (BERNARDIS e BELLINGER, 1987) gera hiperfagia e obesidade. Contudo uma lesão no HL gera hipofagia e perda de peso (ANAND e BROBECK, 1951a; ANAND e BROBECK, 1951b). O sistema de melanocortina é responsável por essa função reguladora do balanço energético e está localizado no ARC do hipotálamo mediobasal (MBH) (LUQUET *et al.*, 2005). Esse sistema consiste em duas populações neuronais funcionalmente antagônicas: os neurônios anorexígenos e os orexígenos. O grupo anorexígeno é composto pelos neurônios que expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART). Já o grupo orexígeno é composto pelos neurônios que expressam o neuropeptídeo Y (NYP) e o peptídeo relacionado à Agouti (AgRP). Esses neurônios são de primeira ordem e atuam sobre eles hormônios como leptina e insulina (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Neurônios POMC se projetam para neurônios de segunda ordem em áreas hipotalâmicas, como o NPV, hipotálamo ventromedial e o HL. Por sua vez, esses neurônios de segunda ordem então se projetam para neurônios pré-ganglionares autônomos no tronco cerebral e na medula espinhal

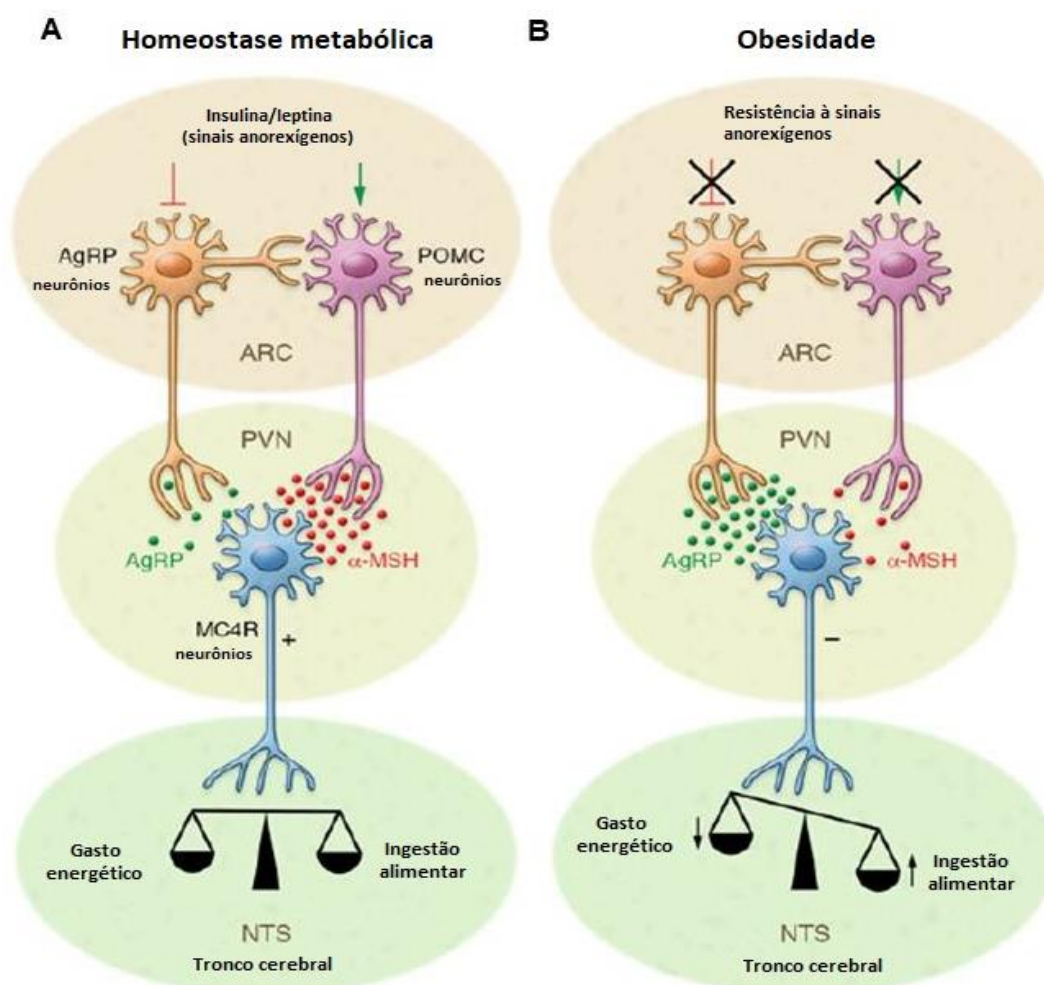
(BOURET, DRAPER e SIMERLY, 2004). O peptídeo POMC é expresso como um peptídeo precursor, o qual é processado pós-transducionalmente em outros peptídeos como os hormônios estimuladores de melanócitos (MSHs). Os MSHs são liberados das terminações sinápticas dos neurônios POMC e atuam nos receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R e MC4R) expressos em neurônios de segunda ordem. Nesses neurônios o  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanócito) ativa vias catabólicas, que geram uma redução da ingestão alimentar e um aumento do gasto energético como mostrado na figura 6 A (JAIS e BRÜNING, 2017). AgRP é liberado a partir de neurônios produtores de NPY/AgRP e compete com  $\alpha$ -MSH pela ligação aos MC3Rs e MC4Rs nos neurônios de segunda ordem, sendo portanto o antagonista endógeno desses receptores (OLLMANN et al., 1997). Por conseguinte, esse peptídeo é capaz de elevar a ingestão alimentar. NPY é o outro peptídeo orexígeno, e sua administração estimula a ingestão de alimentos através dos receptores Y1 ou Y5 (MARSH et al., 1998).

A insulina e a leptina são sinais periféricos que podem atuar no sistema de melanocortina. Os níveis de insulina e leptina presentes na circulação sanguínea são proporcionais ao estado nutricional do indivíduo, bem como a sua quantidade de tecido adiposo (BAGDADE et al., 1967; WOODS et al., 1974; MAFFEI et al., 1995). Esses sinais periféricos inibem os neurônios AgRP e ativam os neurônios POMC, o que promove redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (COWLEY et al., 2001; BENOIT et al., 2002). Benoit et al. (2002) demonstraram que neurônios hipotalâmicos expressando receptores de insulina co-expressam também a molécula precursora de POMC. Além disso, esses autores observaram que a administração de uma dose subliminar de SHU-9119 (antagonista de melanocortina) impediu a redução da ingestão de alimentos causada pela administração de insulina no terceiro ventrículo. Sabe-se que a sinalização neuronal da insulina promove fosforilação da proteína FOXO1 (*forkhead box O1*), gerando exclusão nuclear de FOXO1 e, conseqüentemente não ocorre a inibição da expressão do gene POMC, mediada pela FOXO1 (KITAMURA et al., 2006). Com relação à ação da leptina, Satoh et al. (1997) observaram que a injeção de leptina no ARC reduziu a ingestão de alimentos e o peso corporal dos animais. Huo et al. (2009) demonstraram que a leptina também estimula a locomoção através da sinalização nos neurônios POMC. Schwartz et al. (1997) evidenciaram que a administração intraperitoneal de leptina elevou os níveis de RNAm de POMC no ARC de camundongos ob/ob, efeito que

não ocorreu em animais db/db, indicando que a sinalização de leptina através de seu receptor é essencial para o aumento da expressão de POMC. Estes autores também demonstraram que a sinalização do receptor de leptina leva à fosforilação de STAT3, que se dimeriza e se transloca para o núcleo, induzindo a expressão do gene POMC.

O  $\alpha$ -MSH estimula a atividade do TA marrom, portanto a termogênese também está intimamente relacionada ao sistema de melanocortina (YASUDA et al., 2004). Um dos estudos que demonstrou tal fato foi o de Chao et al. (2011), no qual observou-se que animais *knockdown* para a expressão de NPY no HDM, tratados com dieta padrão, tiveram seus depósitos de gordura reduzidos. Quando se induziu obesidade nos animais através do tratamento com dieta HFD, estes apresentaram uma menor hiperfagia. Ademais, esses animais tiveram desenvolvimento de adipócitos marrons no TAB inguinal com aumento da resposta termogênica.

Sabe-se que uma dieta rica em gordura pode gerar inflamação hipotalâmica e, portanto, aumento de resistência à insulina e à leptina em neurônios anorexígenos e orexígenos, impedindo o adequado funcionamento do sistema de melanocortina, como mostrado na figura 6 B (THALER et al., 2012).



**Figura 6: Controle hipotalâmico da homeostase energética.** (A) O hipotálamo detecta e integra o feedback dos hormônios adipostáticos, que circulam em níveis proporcionais ao estado nutricional e às reservas de tecido adiposo. A insulina e a leptina atuam diretamente nos subconjuntos neuronais do ARC do hipotálamo para controlar a homeostase energética. Através da ativação dos neurônios POMC e da inibição dos neurônios AgRP, os sinais adipostáticos ativam os neurônios que expressam MC4R no NPV. Durante o jejum, a expressão de AgRP aumenta, enquanto a expressão de POMC é reduzida, resultando na diminuição da sinalização de MC4R. Quando o indivíduo se alimenta, ocorre o oposto, desencadeando a sinalização de MC4R e, conseqüentemente a saciedade e aumento do gasto de energia. (B) A inflamação neuronal e a subsequente resistência à insulina e à leptina nos neurônios ARC interrompe este circuito de feedback metabólico, promovendo ainda mais o aumento da ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal. PVN: núcleo paraventricular. Adaptado de JAIS e BRÜNING, 2017.

## 1.5 Tratamento farmacológico da obesidade

O tratamento farmacológico da obesidade é uma abordagem terapêutica adjuvante às terapias que visam à modificação dos hábitos alimentares e a prática de exercícios físicos (ABESO, 2016). Isso porque, em casos mais graves da doença, apenas as modificações no estilo de vida não são suficientes para a redução do peso corporal (SRIVASTAVA e APOVIAN, 2018). De acordo com as diretrizes da Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) de 2016, deve-se implementar um tratamento farmacológico em um paciente nos seguintes casos: falha do tratamento não farmacológico,  $IMC \geq 30\text{Kg/m}^2$  ou  $IMC \geq 25\text{Kg/m}^2$  na presença de comorbidades (ABESO, 2016).

Atualmente, são aprovados pela agência FDA (Food and Drug Administration) seis medicamentos anti-obesidade: fentermina, orlistate, fentermina/topiramato, lorcaserina, naltrexona/bupropiona e liraglutida (NIDDK, 2016). No Brasil, além dos medicamentos supracitados, também é aprovado para o tratamento da obesidade o uso de: anfepramona, femproporex, mazindol e sibutramina (ANVISA, 2011). A fentermina, anfepramona, femproporex e mazindol exercem seu efeito por serem aminas simpatomiméticas (LUCCHETTA et al., 2017). A fentermina pode ser utilizada em associação com o topirato, contudo o mecanismo anorexigênico desse medicamento não está bem elucidado, seus efeitos podem ser gerados pelo bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes, antagonismo de receptores de glutamato, inibição da anidrase carbônica e a potencialização da atividade de  $\gamma$ -aminobutirato (ANTEL e HEBEBRAND, 2012). Outro anorexígeno é a sibutramina, que bloqueia a recaptação de noradrenalina e serotonina, promovendo redução da ingestão alimentar e aumentando a termogênese (CONNOLEY et al., 1999). Ainda outro medicamento antiobesidade é a lorcaserina, que é agonista do receptor 5HT-2C e através do mesmo influencia a sinalização que envolve NPY, POMC e outros neurotransmissores, gerando redução do apetite e peso corporal (THOMSEN et al., 2008; ARONNE et al., 2014). Uma associação de medicamentos também utilizada para tratamento da obesidade é naltrexona, um antagonista opióide, com bupropiona, um inibidor da recaptação de monoaminas. Essa associação promove aumento da atividade de neurônios POMC no hipotálamo, reduzindo assim o apetite (PADWAL, 2009). Além dos medicamentos supracitados, a liraglutida também é aprovado como fármaco antiobesidade, pois é agonista do receptor para peptídeo

semelhante ao glucagon-1 (GLP-1). Esse receptor ao ser ativado potencializa a secreção de insulina dependente de glicose pelas células beta pancreáticas (SRIVASTAVA e APOVIAN, 2018). Ademais a liraglutida reduz a secreção indevidamente alta de glucagon, prolonga o esvaziamento gástrico e reduz o apetite por estimular a produção de POMC e CART, além de inibir a neurotransmissão de NPY (SECHER et al., 2014). Entre os medicamentos aprovados para o uso no tratamento da obesidade, o orlistate é o único que não possui ação no SNC, seu mecanismo de ação consiste em inibir a ação das lipases gástricas e pancreáticas, reduzindo assim a absorção de ácidos graxos livres e colesterol (TORGERSON et al., 2004).

Os medicamentos antiobesidade não apresentam eficácia em longo prazo e podem apresentar vários efeitos adversos como: insônia, hipertensão arterial, risco de acidente vascular encefálico, dependência, distúrbios psicóticos, entre outros (ANVISA, 2011). Assim, devido ao baixo número de opções terapêuticas para o tratamento da obesidade, baixa eficácia em longo prazo e efeitos adversos provocados pelos mesmos, conclui-se que são necessárias mais pesquisas que investiguem os mecanismos que envolvem essa doença, e assim impulsionem a descoberta de novos alvos terapêuticos.

## **1.6 Obesidade e camundongos BACHD**

### **1.6.1 A doença de Huntington**

O BACHD é um animal modelo para a doença de Huntington (DH) (GRAY et al., 2008) e possui um forte fenótipo de obesidade (HULT et al., 2011). A DH é um distúrbio neurodegenerativo, progressivo e autossômico dominante (VONSATTEL et al., 1985; LOIS et al., 2018). Essa doença é causada por uma mutação no gene da proteína huntingtina (htt), caracterizada por um aumento da repetição do trinucleotídeo CAG, presente no primeiro exon do gene, o que gera uma expansão da repetição de glutamina (MACDONALD et al., 1993; CROTTI et al., 2014). Em indivíduos cujas repetições estão presentes mais do que 39 vezes, ocorre a DH (DUYAO et al., 1993; BRINKMAN et al., 1997). A alteração genética supracitada promove alterações estruturais e funcionais na proteína htt, gerando a formação de inclusões citoplasmáticas e intranucleares neuronais da proteína huntingtina mutante

(mhtt) (DIFIGLIA et al., 1997). Durante a progressão da DH ocorre uma perda neuronal extensa primeiramente no núcleo caudado do estriado, e que pode estender-se para outras regiões como: córtex, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo e cerebelo (ROSAS et al., 2003; GABERY et al., 2010; REINER, 2011). Essa doença é caracterizada por movimentos involuntários, especialmente coreiformes; além de distúrbios comportamentais; demência; alterações neuroendócrinas e metabólicas (BATES et al., 2015). Os sintomas motores e cognitivos são desenvolvidos por volta dos 40 anos e pioram de forma progressiva durante 15-20 anos, até a morte do paciente (ROSS e TABRIZI, 2011). Sendo que quanto maior o número de repetições de glutamina, mais precocemente se iniciam os sintomas da doença e maior é a gravidade deles (MACDONALD et al., 1993). Entre as alterações neuroendócrinas e metabólicas que ocorrem nos pacientes com DH estão perda de peso, resistência à insulina, diabetes mellitus, disfunção autonômica, distúrbios do sono e do ritmo circadiano (LALIĆ et al., 2008). Muitos desses distúrbios podem estar relacionados aos problemas causados pelas ações da mhtt no hipotálamo, já que a mesma é expressa de forma generalizada nessa região (VAN WAMELEN et al., 2014). Embora a caquexia, que é caracterizada pela perda de peso, fraqueza e perda de apetite, seja comum no estágio terminal da DH; nos estágios iniciais da doença ou em indivíduos pré-sintomáticos ocorre um aumento do apetite e da ingestão calórica (TREJO et al., 2004; MARDER et al., 2009).

#### 1.6.2 Alterações metabólicas em animais BACHD

O modelo animal BACHD foi criado utilizando-se técnicas de cromossomo artificial de bactéria (GRAY et al., 2008). Os camundongos transgênicos BACHD expressam um gene de Huntingtina (fl-mhtt) mutante humana, neuropatogênica, que abriga uma sequência de 97 repetições CAA-CAG mistas que codificam um trecho contínuo de poliglutamina (YU-TAEGER et al., 2012; CLEMENSSON et al., 2017). O BACHD exhibe agregados de mhtt em idades mais avançadas e tem sobrevida semelhante a camundongos do tipo selvagem (GRAY et al., 2008). Este apresenta déficit motor pronunciado aos 6 e 12 meses de idade (YANG e GRAY, 2011). Além disso, apresenta pronunciada neurodegeneração, atrofia estriatal e cortical aos 12

meses de idade (RIBEIRO et al., 2013). Os animais modelos para DH que expressam apenas um fragmento do gene mutante, como R6/2 e N171-82Q, normalmente apresentam um peso corporal reduzido em relação aos animais controles (VON HÖRSTEN et al., 2003; SHE et al., 2011). Em contrapartida, os animais que expressam o gene completo, apresentam um aumento no peso corporal, entre eles está o BACHD (VAN RAAMSDONK et al., 2006). Entretanto, independentemente do peso corporal, o aumento do TA é um fenótipo comum entre animais modelos de DH. Jansson et al. (2014) e Hult et al. (2011) observaram que animais BACHD apresentam quantidade excessiva de TA. Weydt et al., 2006 e She et al., 2011 demonstraram que animais R6/2 e N171-82Q também possuem uma quantidade excessiva de massa gorda. Acredita-se que este aumento de TA seja devido ao aumento da ingestão de alimentos, diminuição da atividade física, anormalidades metabólicas ou uma combinação desses fatores (JANSSON et al., 2014). Hult et al. (2011) demonstraram que animais BACHD apresentavam maior peso e gordura corporal que animais WT de uma mesma linhagem e com idades entre 2-12 meses. Estes autores ainda observaram que os animais BACHD possuíam uma maior ingestão alimentar quando comparados aos WT de 2 e 4 meses de idade, além de apresentarem prejuízo na tolerância à glicose, resistência à insulina e à leptina. Hult et al. (2011) também demonstraram que os camundongos BACHD não exibiram redução de atividade física e nem alteração na taxa metabólica aos 4 meses, idade na qual já eram obesos. Portanto, provavelmente os animais BACHD desenvolveram obesidade devido ao aumento crônico da ingestão alimentar, resistência à insulina e à leptina. Hult et al. (2011) promoveram a expressão de um grande fragmento N-terminal da mhtt, seletivamente no hipotálamo de animais WT. Os resultados obtidos deste experimento demonstraram as mesmas alterações metabólicas observadas em animais BACHD. Como os animais BACHD possuem dois sítios LoxP flanqueando o exon 1 da mhtt, a remoção seletiva da expressão da mhtt em qualquer tipo de célula que expresse a Cre recombinase é permitida (GRAY et al., 2008). Utilizando-se então desse recurso Hult et al. (2011) silenciaram a expressão da mhtt em neurônios hipotalâmicos e observaram que o aumento do peso corporal, resistência à insulina e à leptina em camundongos BACHD foi abolido. Demonstrando assim, que a expressão hipotalâmica de mhtt é responsável pela ocorrência de distúrbios metabólicos em camundongos BACHD.



### 1.7 Papel fisiológico do receptor metabotrópico de glutamato do subtipo 5.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e ativa duas classes de receptores: os receptores glutamatérgicos ionotrópicos e os metabotrópicos (HOLLMANN et al., 1989; SHIGEMOTO et al., 1996; MORAN et al., 2005). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos medeiam a transmissão rápida do glutamato. Enquanto, os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) medeiam a transmissão desse neurotransmissor de forma mais lenta (PACHECO et al., 2006). Bisaga, Danysz e Foltin, 2008 demonstraram que tanto o antagonismo de receptores de glutamato ionotrópicos quanto o de mGluRs reduzem o consumo alimentar. Entretanto em testes clínicos para se verificar segurança e tolerabilidade de fármacos, os antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos apresentaram efeitos adversos graves (OLIVE, 2009), já os ligantes de mGluRs mostraram um perfil mais seguro (HAASS-KOFFLER et al., 2017).

Os mGluRs são divididos em três grupos com base na semelhança de sua sequência gênica, sinalização intracelular e propriedades farmacológicas. O grupo I é composto pelos subtipos mGluR1 e mGluR5; o grupo II por mGluR2 e mGluR3; e o grupo III por mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8. Os mGluRs do grupo I acoplam-se a G $\alpha$ q/11, ativam a fosfolipase C, que hidrolisa fosfatidilinositóis, mobilizando Ca<sup>2+</sup> intracelular, que ativa a proteína quinase C (CONN e PIN, 1997; SLASSI et al., 2005). Os mGluRs do grupo I são primariamente pós-sinápticos e estão próximos aos receptores NMDA, que já foram implicados no controle da alimentação (GUARD et al., 2009). Os mGluR1 e mGluR5 são expressos em locais diferentes do SNC, sugerindo que estes possuem funções distintas (ROMANO et al., 1995). Os mGluR1 são expressos, principalmente, no cerebelo (SLASSI et al., 2005), enquanto os mGluR5 são expressos no córtex frontal, caudado, putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfativo, hipocampo, chifre dorsal da medula espinhal e hipotálamo (SHIGEMOTO et al., 1993; ROMANO, VAN DEN POL e O'MALLEY, 1996). mGluR5 também é expresso em micróglia, astrócitos e oligodendrócitos (BYRNES et al., 2009; LOANE, STOICA, e FADEN, 2012). Jong et al. (2014) relataram que mGluR5 não está restrito a regiões pós-sinápticas e extra-sinápticas, mas também está presente em membranas intracelulares como membranas nucleares internas e externas, e retículo endoplasmático. Adicionalmente, diversos estudos têm demonstrado a presença de mGluR5 em células periféricas, tais como: macrófagos

(SHANSHIASHVILI et al., 2017), linfócitos T e B (PACHECO et al., 2004) boca (gânglio trigêmeo, músculo masseter, região terminal da inervação da polpa dentária humana e língua), vias vagais gastroesofágicas, sistema nervoso entérico (FERRIGNO et al., 2017), pâncreas (STORTO et al., 2006), fígado (STORTO et al., 2000b), mucosa estomacal (NAKAMURA et al., 2010), testículos de ratos e humanos (STORTO et al., 2001) e ovários de primatas (GILL, BARKER e PULIDO, 2008). A ativação dos mGluRs periféricos se dá através de glutamato não-sináptico, que é sintetizado a partir do  $\alpha$ -oxo-glutarato, subproduto do ciclo de Krebs. O glutamato produzido no meio intracelular pode ser transportado para fora da célula, onde pode ativar mecanismos parácrinos de comunicação célula-a-célula ou mecanismos autócrinos de autorregulação. (NICOLETTI et al., 2007).

### **1.8 Influência de mGluR5 na obesidade**

Bisaga, Danysz e Foltin, 2008 compararam os efeitos de memantina (antagonista do receptor NMDA) e MTEP (modulador alostéricos negativo de mGluR5) à dexfenfluramina (agonista serotoninérgico) em modelo babuíno. Nestes experimentos, os animais tinham acesso periódico a alimentos altamente palatáveis (doces) e acesso *ad libitum* à ração padrão. O tratamento com dexfenfluramina, memantina e MTEP reduziu o consumo de alimentos altamente palatáveis. Além disso, a dexfenfluramina e a memantina, mas não o MTEP, geraram uma redução no consumo de ração padrão. Bradbury et al. (2005) demonstraram que animais mGluR5<sup>-/-</sup> alimentados com HFD apresentavam um menor peso corporal quando comparados aos animais mGluR5<sup>+/+</sup> da mesma linhagem, apesar de não haver sido observada diferença na ingestão alimentar entre os grupos. Ademais o grupo mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou redução nas concentrações plasmáticas de insulina e leptina. Esses autores ainda observaram que após 12 dias de tratamento com MTEP, dexfenfluramina ou veículo em animais com obesidade induzida por dieta e animais sem obesidade, verificou-se redução da ingestão alimentar diária e cumulativa em animais obesos, que receberam MTEP e dexfenfluramina. Em adição, a administração de MTEP (3mg/kg) preveniu o ganho de peso, e o tratamento farmacológico com MTEP (10 mg/kg) ou dexfenfluramina gerou redução do ganho de peso e de adiposidade.

As possíveis explicações para estes resultados são que diversos sistemas de neurotransmissores podem interagir com vias de sinalização contendo mGluR5, incluindo o sistema serotoninérgico (KELLEY e BERRIDGE, 2002; KELLEY et al., 2002). Além disso, moduladores negativos de mGluR5 podem promover um aumento da liberação de serotonina (BRADBURY et al., 2003). Sabe-se que a administração de compostos serotoninérgicos pode promover um aumento da expressão de RNAm de POMC e redução de RNAm de NPY (CHOI et al., 2006). Em adição, a serotonina pode induzir despolarização de neurônios POMC / CART através do receptor 2C de serotonina (5-HT<sub>2C</sub>R) (HEISLER et al., 2002) e hiperpolarização de neurônios AgRP / NPY via receptor 1B de serotonina (HEISLER et al., 2006). Ademais, foi demonstrado por Lam et al. (2008) que um agonista seletivo de 5-HT<sub>2C</sub>R promoveu redução do peso e da gordura corporal, além do consumo alimentar sem alterar a atividade locomotora ou o consumo de oxgênio dos animais. Além disso, esses autores evidenciaram que o sistema de melanocortina é necessário para as ações supracitadas do agonista seletivo de 5-HT<sub>2C</sub>R. Portanto sugere-se que moduladores negativos de mGluR5 podem aumentar a liberação de serotonina e assim, gerar seus efeitos antiobesogênicos através dos mecanismos supracitados.

## **1.9 Papel de mGluR5 na inflamação**

### **1.9.1 Inflamação central**

Em astrócitos reativos, inclusive naqueles que estão ao redor de uma lesão, há o aumento na expressão do mGluR5 (GWAK et al., 2005). Por meio de estudos de microscopia, Ding et al. (2007) observaram que a ativação de mGluR5 em astrócitos gera um aumento da liberação de glutamato, o que contribui para a morte neuronal mediada por esse neurotransmissor, após o status epilepticus. Adicionalmente esses autores demonstraram que MPEP, um modulador alostérico negativo de mGluR5, atenua os sinais de Ca<sup>2+</sup> em astrócitos, sendo então neuroprotetor. mGluR5s são regulados negativamente em cultura de astrócitos tratada com as citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 $\beta$  e TNF, ou com meio coletado de microglia ativada por LPS (TILLEUX , BERGER e HERMANS, 2007; ARONICA et al., 2005). Em relação às células microgliais, observou-se que após uma lesão cerebral a micróglia ativada

próxima a essa lesão também apresentou aumento da expressão de mGluR5 (DROUIN-OUELLET et al., 2011). A ativação seletiva de mGluR5 através de uma combinação de CHPG ou DHPG (agonistas de mGluR1 e mGluR5) e CPCCOEt (antagonista de mGluR1) em cultura de micróglia, atenuou a ativação microglial induzida por LPS ou IFN- $\gamma$  e reduziu espécies reativas de oxigênio e TNF, promovendo assim efeitos anti-inflamatórios (LOANE, STOICA, e FADEN, 2012). O tratamento com CHPG demonstrou ser neuroprotector *in vitro* e *in vivo* (BYRNES et al., 2009; LOANE et al., 2009), contudo algumas publicações sugeriram que MPEP também pode gerar benefícios (BAO et al., 2001). Segundo Lea et al. (2005), a neuroproteção gerada por MTEP e MPEP não se dava por uma ação em mGluR5, mas sim pela inibição do receptor NMDA, um receptor glutamatérgico ionotrópico. Estes autores chegaram a essa conclusão, pois a aplicação de MTEP e MPEP em culturas de animais *knockout* para mGluR5 produziu efeitos neuroprotetores semelhantes às culturas do tipo selvagem.

Juntamente com células cerebrais residentes, os glóbulos brancos advindos da periferia são os tipos celulares envolvidos primordialmente no dano inflamatório cerebral após uma lesão traumática (HÄRTL et al., 1997). Portanto, contribuem de forma importante na inflamação durante a fase aguda (CORPS, ROTH e MCGAVERN, 2015). Yang et al. (2017) observaram que animais *knockout* para mGluR5 apresentaram redução na infiltração de neutrófilos e na expressão de citocinas inflamatórias no cérebro 24 horas após a lesão, o que foi acompanhado por uma melhora na disfunção neurológica. Além disso, estes animais demonstraram uma redução na permeabilidade da BHE e dos níveis de RNAm de quimiocinas associadas a neutrófilos no tecido cerebral, como CXCL1 e CXCL2. Um estudo realizado em modelo animal de depressão induzida por LPS, evidenciou que em animais *knockout* para mGluR5 ocorre uma drástica redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 das células da medula óssea (LIU et al., 2019).

### 1.9.2 Inflamação periférica

Os mGluRs parecem ter um papel na maturação, diferenciação, ativação e função de linfócitos. A maturação dos timócitos, ou linfócitos imaturos, se inicia a

partir de células duplamente negativas ( $CD4^-/CD8^-$ ) e passa por múltiplas vias de diferenciação, incluindo células duplamente positivas ( $CD4^+ CD8^+$ ) até se tornarem timócitos maduros positivos apenas para CD4 ou para CD8 (MIYAZAKI, 1997; XIONG, ARMATO e YANKEE, 2011). Storto et al. (2000a) demonstraram que a expressão de mGluRs varia de acordo com o estágio de maturação dos timócitos: mGluR1 foi expresso apenas em timócitos imaturos  $CD4^-/CD8^-$ , enquanto mGluR5 foi expresso em células  $CD4^+/CD8^+$  e  $CD4^+/CD8^-$ , o que sugere que este subtipo de receptor é expresso em estágios mais tardios da via de diferenciação de linfócitos T. Rezzani et al (2003) observaram que um tratamento de 2 dias com a ciclosporina A, inibe a expressão de todos os subtipos de mGluRs no timo, isso poderia indicar um possível mecanismo pelo qual a ciclosporina A produz seus efeitos imunossupressores. Segundo Pacheco et al. (2004) tanto mGluR1 quanto mGluR5 são altamente expressos na linhagem de células T humana Jurkat. Já na linhagem de células B humanas SKW6, só mGluR5 é expresso. Pacheco et al. (2006) demonstraram que células dendríticas humanas submetidas a maturação e expostas a linfócitos T liberam glutamato, estimulando mGluR5s presentes em linfócitos T, inibindo assim a ativação das células T. No entanto, após a apresentação do antígeno, o mGluR1 passa a ser expresso em linfócitos T e promove a proliferação dessas células e a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Os mGluR5s também parecem atuar sobre o perfil pró ou anti-inflamatório de macrófagos. Shanshiashvili et al. (2017) realizaram transfecção de cDNAs de mGluR5 em macrófagos da linhagem RAW-264.7 e observaram que esses macrófagos apresentavam uma maior concentração de glutamato no meio intracelular e secretavam mais IL-10 que os controles. Segundo os autores esses fatores podem promover a formação de um fenótipo imunossupressor em macrófagos.

## 2 JUSTIFICATIVA

A prevalência mundial da obesidade tem alcançado números alarmantes, e de acordo com dados da OMS (2018) o número de pessoas atingidas por essa doença quase triplicou entre os períodos de 1975-2016. Um dos maiores problemas causados pela obesidade é o aumento do risco de desenvolvimento de comorbidades como RI, DM II, dislipidemia, aterosclerose e DHGNA. Além disso, a obesidade promove um grande impacto econômico. Na obesidade, o TA passa a apresentar características de um estado inflamatório crônico de baixo grau, o que pode promover o desenvolvimento das comorbidades supracitadas. De forma geral, os medicamentos para tratamento da obesidade não apresentam eficácia em longo prazo e podem apresentar vários efeitos adversos. Portanto, devido às poucas opções terapêuticas, baixa eficácia e efeitos adversos provocados pelos medicamentos antiobesidade, existe a necessidade de se investigar mais profundamente os mecanismos que envolvem essa doença, e assim descobrir novas vias e alvos terapêuticos para futuras intervenções farmacológicas.

Estudos têm apontado os receptores metabotrópicos de glutamato do subtipo 5 como um possível alvo para tratamento da obesidade. Pois foi demonstrado que a modulação negativa de mGluR5 leva a redução do peso corporal, ingestão alimentar e das concentrações plasmáticas de insulina e leptina, o que é um indicativo de ausência de resistência a esses hormônios.

Existe ainda na literatura uma infinidade de modelos animais para estudo de obesidade. Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com animais BACHD com o intuito de estudar a DH. Contudo, sabe-se que estes animais apresentam forte fenótipo de obesidade. Os camundongos BACHD apresentam maior peso e gordura corporal. Além disso, possuem maior ingestão alimentar e prejuízo na tolerância à glicose, além de resistência à insulina e à leptina.

Assim, face às evidências presentes na literatura de que os animais BACHD apresentam fenótipo de obesidade além de complicações metabólicas, e que a modulação negativa de mGluR5 levaria a redução do peso corporal. Somando-se ainda o fato da obesidade e suas comorbidades estarem intimamente relacionadas com a inflamação, justifica-se investigar se mGluR5 tem a capacidade de modular parâmetros de obesidade em animais BACHD.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

- Investigar o papel do receptor metabotrópico de glutamato do subtipo 5 (mGluR5) na modulação da obesidade em animais BACHD.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Obter os genótipos de interesse.
- Investigar os parâmetros de obesidade dos animais
- Investigar o papel pró-inflamatório ou anti-inflamatório no hipotálamo, TA epididimal, mesentérico e retroperitoneal aos 6 e 12 meses de idade.

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Genotipagem

##### 3.1.1 Solução de extração de DNA

Quantidade de reagentes por animal: 400  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 10  $\mu\text{L}$  de sulfato dodecil de sódio (SDS) a 10%; 50  $\mu\text{L}$  de Tris - EDTA 50x; 40  $\mu\text{L}$  de NaCl ( $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e 5  $\mu\text{L}$  de Proteinase K.

##### 3.1.2 Solução Tris - EDTA 50x

Constituição da solução: 5 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 8,0 ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ); 25 mL de Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (Tris HCl) pH 8,0 ( $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e 20 mL de água para injeção.

##### 3.1.3 Solução Tris- EDTA 0,5x

Solução Tris- EDTA 50x diluída 100 vezes em água para injeção.

##### 3.1.4 Solução para PCR para identificação de animais BACHD

Quantidade de reagentes por animal: 5,28  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 0,24  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10,0 mM); 0,60  $\mu\text{L}$  de DMSO (concentração 5%); 1,20  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10,0 nM) (tabela 2); 1,20  $\mu\text{L}$  do tampão 10 x fornecido pelo fabricante da enzima; 2,40  $\mu\text{L}$  de betaína ( $5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e e 0,60 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Homogeneizaram-se todos os reagentes da solução antes e após acrescentá-los ao tubo eppendorf.

##### 3.1.4 Gel de agarose 2%

Reagentes: 100 mL de solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X; 2 gramas de agarose e 10  $\mu\text{L}$  de SYBR® Safe (Life Technologies).



Adicionou-se os reagentes em um erlenmeyer, que foi aquecido em um micro-ondas durante 30 segundos. Em seguida homogeneizou-se a solução e realizou-se novo aquecimento por 20 segundos, para que houvesse completa dissolução da agarose. Essa solução foi vertida em uma cuba de gel e inseriu-se um pente na mesma para formar as canaletas. Essa solução foi deixada à temperatura ambiente até adquirir consistência de gel.

### 3.1.5 Tampão de amostra (PCR)

Reagentes: azul de bromofenol (0,25%), xileno cianol (0,25%), glicerol (30%) e água destilada (q.s.p).

### 3.1.6 Solução para PCR para identificação de animais mGluR5<sup>-/-</sup>, mGluR5<sup>+/-</sup> e mGluR5<sup>+/+</sup>

Quantidade de reagentes por animal: 1,92 µL de água para injeção; 0,24 µL de dNTPs (10,0 mM); 0,60 µL de DMSO (concentração 5%); 0,96 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 1,20 µL de cada iniciador (10,0 nM) (tabela 3); 1,20 µL do tampão 10 x fornecido pelo fabricante; 2,40 µL de betaína (1 mol.L<sup>-1</sup>) e 0,60 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Homogeneizou-se todos os reagentes da solução antes e após acrescentá-los ao tubo eppendorf.

## 3.2 Processamento de tecido adiposo e hipotálamo

### 3.2.1 Tampão de extração de citocinas

Constituição: Tris-HCl 20mM – pH 8; NaCl 137 mM; Igepal 1% v/v; Glicerol 10% v/v; PMSF 1mM ou aprotinina A 0,5 µg/mL, Pesptatina A 1 µM, EDTA 10 mM, E-64 10 µM, Vanadato de sódio 0,5 mM e água destilada em quantidade suficiente para o volume desejado.

### 3.3 ELISA

A quantificação de leptina foi realizada através do kit: Mouse Leptin - DuoSet® ELISA (R&D Systems – Minneapolis, USA). Enquanto a de adiponectina foi feita pelo kit: Mouse Adiponectin/Acrp30 - DuoSet® ELISA (R&D Systems – Minneapolis, USA). Ambos os kits eram constituídos por: anticorpo de captura e anticorpo de detecção de camundongo, padrão de leptina de camundongo e estreptavidina-HRP B.

Para lavagem da placa utilizou-se lavadora de microplaca (BioTek ELx50)

#### 3.3.1 PBS

Constituição: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM diluídos em água destilada (qsp).

#### 3.3.2 Tampão de bloqueio

Quantidade de reagentes para 20 mL - volume usado em uma placa: 200 mg de BSA 1% diluída em PBS.

#### 3.3.3 Tampão de Lavagem

Quantidade de reagentes para um volume final de 1,3 L - volume usado em uma placa: 1,3 mL de Tween 20 a 0,1% em solução PBS de pH 7,4.

#### 3.3.4 Diluente de amostra

Quantidade de reagentes para um volume final de 40 mL- volume usado em uma placa: BSA a 0,1%, solução de Tween 20 à 0,1% diluídos em PBS (pH 7,4).

#### 3.3.5 Solução do substrato

Quantidade de reagentes para uma placa: 4 mg de OPD; 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10 mL de tampão citrato (pH 5,0).

### 3.3.6 Tampão citrato

13,41 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 5,19 g de ácido cítrico e água destilada qsp 1000 mL.  
Foi acertado o pH da solução para 5,0.

### 3.3.7 Solução stop

$\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol.L<sup>-1</sup>

## 3.3 CBA

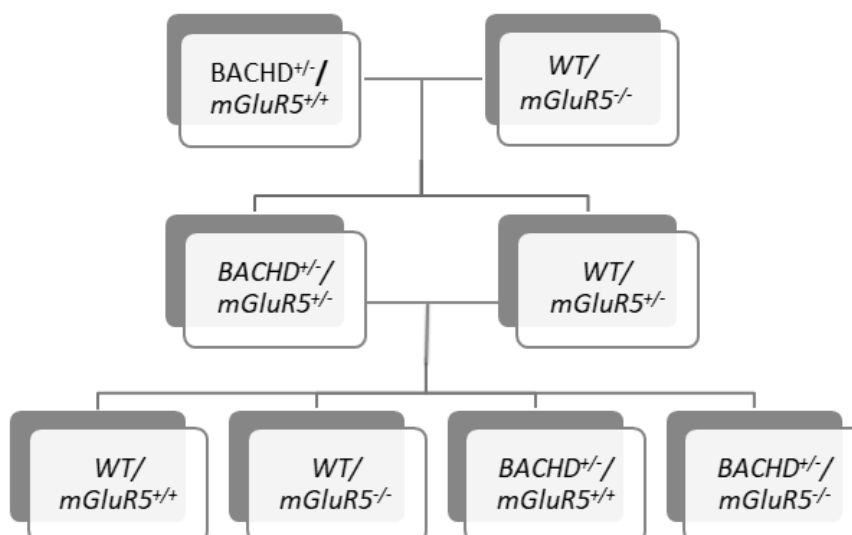
O kit de CBA Mouse Th1/Th2/Th17 continha as microesfera de captura: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A, reagente de detecção de ficoeritrina, padrão de citocinas, microesferas para configuração do citômetro, detector de controle positivo de ficoeritrina, detector de controle positivo de FITC, tampão de lavagem e diluente do ensaio.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Animais experimentais

Todos os procedimentos experimentais *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA / UFMG) sob o protocolo de número 234/2016. Neste trabalho utilizou-se camundongos transgênicos para a DH, FVB/N-Tg(HTT\*97Q)IXwy/J (BACHD) (GRAY et al., 2008) provenientes do The Jackson's Laboratory e camundongos *knockout* para mGluR5, o C57/B6;129-Grm5tm1Rod/J (mGluR5<sup>-/-</sup>). Utilizou-se material biológico de camundongos machos com os seguintes genótipos: WT/mGluR5<sup>+/+</sup>, WT/mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD/mGluR5<sup>+/+</sup> e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Esses animais foram obtidos da seguinte forma: primeiramente aumentou-se a colônia de animais BACHD<sup>+/+</sup>/mGluR5<sup>+/+</sup> e WT/mGluR5<sup>-/-</sup>. Foi realizado um cruzamento entre esses animais, produzindo animais heterozigotos para o gene mGluR5 com a presença ou ausência da huntingtina mutante. Animais BACHD<sup>+/+</sup>/mGluR5<sup>-/-</sup> foram cruzados com WT/mGluR5<sup>+/+</sup>, gerando os genótipos de interesse, como mostrado na figura 7. Os

camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Eles foram alocados em microisoladores com ciclos de 12h claro/escuro, temperatura constante de 23°C e oferta de ração padrão e água *ad libitum*.



**Figura 7: Obtenção dos genótipos de interesse.** Processo de obtenção dos genótipos de interesse: inicialmente realizou-se o cruzamento de animais BACHD<sup>+/-</sup>/mGluR5<sup>+/+</sup> e WT/mGluR5<sup>-/-</sup>. Isso resultou em animais BACHD<sup>+/-</sup>/mGluR5<sup>+/-</sup> e WT/mGluR5<sup>+/-</sup>, estes foram cruzados gerando animais: WT/mGluR5<sup>+/+</sup>, WT/mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD/mGluR5<sup>+/+</sup> e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>.

## 4.2 Genotipagem

### 4.2.1 Extração de DNA

Para realização da extração de DNA dos camundongos, utilizou-se como amostra o dedo do animal, que foi cortado cerca de 10 dias após seu nascimento a fim de possibilitar a marcação e identificação do mesmo. Esse material foi armazenado em freezer a - 80 °C até o momento da realização da extração. Preparou-se uma solução de extração de DNA em um tubo falcon e depois colocou-se 500 µL da mesma em tubos eppendorf, contendo as amostras. Fez-se a homogeneização dos mesmos. Os tubos com suas respectivas amostras e solução foram colocados em banho seco a 55 °C por 14 -16 horas. Após isso, realizou-se

centrifugação a 15871 G por 10 min à temperatura ambiente. Recolheu-se e transferiu-se o sobrenadante para novos tubos eppendorf, nos quais acrescentou-se 500 µL de isopropanol. Fez-se a homogeneização por inversão aproximadamente 10 vezes e então realizou-se nova centrifugação, seguindo os mesmos parâmetros da anterior. Descartou-se o sobrenadante, em seguida colocou-se os tubos eppendorf sobre duas folhas de papel toalha, de modo que a abertura deles estivesse completamente sobre o mesmo. Eles foram mantidos nessa posição durante 1 hora. Após isso, adicionou-se 200 µL de solução Tris-EDTA 0,5x e então, os tubos foram novamente colocados em banho seco a 37 °C por 1 hora. Armazenou-se os tubos em freezer - 20 °C.

#### 4.2.2 Amplificação do DNA para identificação de animais BACHD

Os iniciadores utilizados foram obtidos do Jackson Laboratory e desenvolvidos a partir da sequência presente no GenBank sob o identificador NM\_010414.2. A sequência e tamanho dos iniciadores são mostrados na tabela 2.

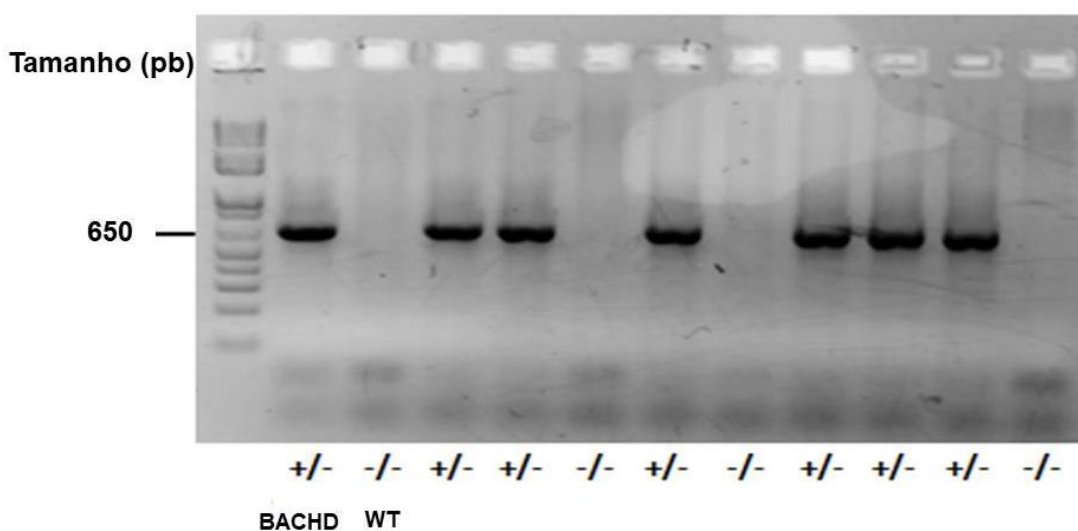
**Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação do DNA e identificação de animais BACHD.**

<b>Nome no estoque</b>	<b>Sequência</b>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>% GC</b>
HTT-M4F	TGAATTGTACAGCCGATGGA	157	53,4
HTT-M4R	CCGTAGTTCTGTCAGCGTCA	157	57,5

Inicialmente fez-se a solução para PCR para identificação do DNA da huntingtina mutante em um tubo eppendorf numa quantidade suficiente para todas as amostras. Posteriormente colocou-se 11 µL da mesma em tubos eppendorf de 200 µL. Adicionou-se a esses tubos 1 µL da amostra obtida no último passo do processo de extração de DNA ou 1 µL de amostras já conhecidas de animais BACHD e WT para servirem de controle positivo e negativo, respectivamente. Todos esses procedimentos foram realizados mantendo-se os reagentes em uma caixa

com gelo. Os tubos contendo as amostras e a solução para PCR para identificação do DNA da huntingtina mutante foram colocados em um termociclador com a seguinte programação: uma etapa de 94 °C por 5 min, seguida de 37 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 20 segundos, uma etapa de anelamento a 57 °C por 20 segundos e uma etapa de extensão a 70 °C por 90 segundos. A ciclagem terminou com uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min.

Fez-se um gel de agarose 2%, que foi acondicionado em uma cuba de eletroforese e imerso em TAE 0,5x. Aplicou-se em uma canaleta do gel 3 µL do padrão de peso molecular e nas demais aplicou-se uma mistura de 12 µL do produto de PCR juntamente com 3 µL de tampão de amostra 5x. O gel foi submetido a uma corrente de 100 volts por aproximadamente 22 min. A aquisição da imagem foi realizada pelo aparelho *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences). O produto final está ilustrado na figura 8.



**Figura 8: Genotipagem dos camundongos BACHD.** Na primeira canaleta há o padrão de peso molecular de 1 Kb. Na segunda e terceira canaletas há os controles positivo e negativo, ou seja, animais BACHD e WT. Nas demais há algumas das amostras que foram testadas. A presença de bandas correspondentes ao peso molecular de 650 pb nas amostras indica a amplificação do gene da htt mutante (mhtt), evidenciando que as mesmas são de animais BACHD.

#### 4.2.3 Amplificação do DNA para identificação de animais mGluR5<sup>-/-</sup>, mGluR5<sup>+/-</sup> e mGluR5<sup>+/+</sup>

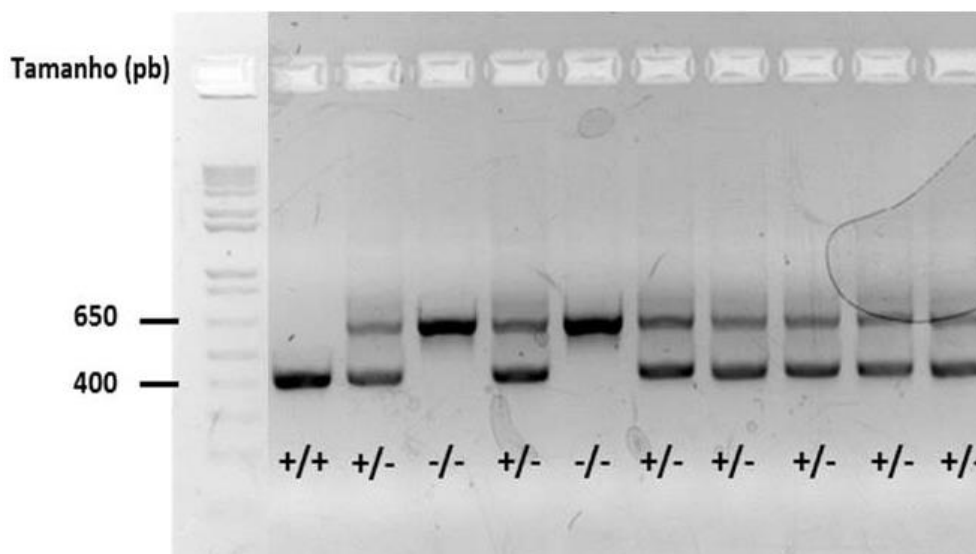
Os iniciadores utilizados para identificação de animais homocigotos mutantes (mGluR5<sup>-/-</sup>), heterocigotos (mGluR5<sup>+/-</sup>) e homocigotos selvagens (mGluR5<sup>+/+</sup>) foram obtidos a partir do Jackson Laboratory, e desenvolvidos a partir da sequência presente no GenBank sob o identificador NM\_001081414.2. A sequência e tamanho dos iniciadores são mostrados na tabela 3.

**Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação do DNA e identificação de animais mGluR5<sup>-/-</sup>, mGluR5<sup>+/-</sup> e mGluR5<sup>+/+</sup>.**

Nome no estoque	Sequência	Amplicon (pb)	% GC
Comum	CACATGCCAGGTGACATCAT		
Selvagem – reverso	CCATGCTGGTTGCAGAGTAA	442	50,0
Mutante – reverso	CACGAGACTAGTGAGACGTG	650	55,0

Primeiramente fez-se solução para PCR para identificação de animais mGluR5<sup>-/-</sup>, mGluR5<sup>+/-</sup> e mGluR5<sup>+/+</sup> em um tubo eppendorf numa quantidade suficiente para todas as amostras. Colocou-se 11 µL da mesma em tubos eppendorf de 200 µL. Adicionou-se a esses tubos 1 µL da amostra obtida no último passo do processo de extração de DNA ou 1 µL de amostras já conhecidas de animais mGluR5<sup>+/-</sup> e mGluR5<sup>-/-</sup>. Os procedimentos supracitados foram realizados mantendo-se os reagentes em uma caixa de isopor com gelo. Os tubos contendo as amostras e a solução para PCR para identificação dos animais foram colocados em um termociclador com a seguinte programação: uma etapa de 94° C por 3 min, seguida de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 60 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão a 72 °C por 45 segundos. A ciclagem terminou com uma etapa de extensão final a 72° C por 2 min. Fez-se um gel de agarose 2%, que foi acondicionado em uma cuba de

eletroforese e imerso em TAE 0,5x. Aplicou-se em uma canaleta do gel 3  $\mu$ L do padrão de peso molecular e nas demais aplicou-se uma mistura de 12  $\mu$ L do produto de PCR juntamente com 3  $\mu$ L de tampão de amostra 5x. O gel foi submetido a uma corrente de 100 volts por aproximadamente 22 min. A aquisição da imagem foi realizada pelo aparelho *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences). O produto final está ilustrado na figura 9.



**Figura 9: Genotipagem dos camundongos  $mGluR5^{-/-}$ ,  $mGluR5^{+/-}$  e  $mGluR5^{+/+}$ .** Na primeira canaleta há o padrão de peso molecular de 1 Kb. Na segunda canaleta está o amplicon gerado pelos iniciadores da linhagem  $mGluR5^{+/+}$  (442 pb), na terceira o amplicon gerado pelos iniciadores da linhagem  $mGluR5^{+/-}$  (650 e 442 pb) e na quarta canaleta o amplicon gerado pelos iniciadores da linhagem  $mGluR5^{-/-}$  (442 pb). Nas demais há algumas das amostras que foram testadas.

### 4.3 Quantificação da gordura visceral

Após a morte dos animais, os mesmos foram dissecados e seus tecidos adiposos viscerais: epididimal (TAE), mesentérico (TAM) e retroperitoneal (TAR) foram recolhidos e armazenados em freezer - 80 °C. Posteriormente pesou-se esses tecidos adiposos para quantificação da gordura visceral nos TAE, TAM e TAR. Os experimentos para quantificação da gordura visceral, dosagem de adiponectina, leptina e citocinas foram realizados com os animais nas idades de 6 e 12 meses. Essas idades representam, respectivamente, as fases inicial e tardia da DH em



animais BACHD. De acordo com a literatura, aos 2 meses de idade os animais BACHD podem apresentar sutis déficits motores, já aos 6 meses pode-se iniciar algumas alterações cognitivas e diminuição da atividade sináptica e aos 12 meses, os animais podem apresentar neurodegeneração e agregados de mhtt no córtex e estriado (GRAY et al., 2008; MENALLED et al., 2009; DORIA et al., 2015).

#### **4.4 Mensuração de peso corporal**

Os animais foram pesados por meio de balança digital (Mark, Série M; Bel Equipment Analytical LTDA). Para isso colocou-se um recipiente na balança, realizou-se a tara da mesma, os animais foram colocados nesse recipiente individualmente e o peso de cada um foi anotado. Esse procedimento foi realizado mensalmente.

#### **4.5 Processamento de tecido adiposo e hipotálamo**

Após a morte dos animais recolheu-se o hipotálamo e tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal dos mesmos. As amostras foram armazenadas em freezer - 80 °C e próximo à data de realização de ELISA e CBA adicionou-se às mesmas tampão de extração de citocinas (1 mL tampão de extração de citocinas para 100 mg de tecido). As amostras foram então processadas utilizando-se um aparelho sonicador (Ultra Autosonic India®, UPS 125) a 60 hertz, nesse processo manteve-se o fundo do eppendorf contendo o tecido no gelo, a fim de se evitar o aquecimento da amostra. Posteriormente foram centrifugadas à temperatura de 4 °C por 20 min, à 14000 rpm. Transferiu-se a fração líquida resultante das amostras para novos eppendorfs e realizou-se o armazenamento dos mesmos a - 80 °C até o momento da realização de ELISA ou CBA.

#### **4.6 Dosagens de adiponectina e leptina por ELISA**

Como supracitado, utilizou-se os seguintes kits de ELISA para quantificação de leptina e adiponectina respectivamente: Mouse Leptin - DuoSet® ELISA e Mouse

Adiponectin/Acrp30 - DuoSet® ELISA. Os ensaios foram realizados da seguinte forma: no primeiro dia do experimento diluiu-se 55,5 µL do anticorpo de captura para o composto a ser dosado em 10,5 mL de PBS 1x estéril e então realizou-se a sensibilização das placas de ELISA, adicionando as mesmas 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído. Vedou-se e incubou-se as placas ao abrigo da luz a 4 °C durante 16 horas. Isto permitiu a ligação do anticorpo às placas.

No dia seguinte removeu-se a solução contendo o anticorpo das placas e lavou-se as mesmas 4 vezes com tampão de lavagem por meio de lavadora de microplaca. Após a última lavagem foi feita a remoção de todo o líquido remanescente, batendo-se as placas contra um papel toalha. Essas lavagens possuem a função de retirar os anticorpos não aderidos à parede dos poços. Adicionou-se em cada poço das placas 200 µL de tampão de bloqueio. Cada placa foi incubada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação constante. Após esse período retirou-se o conteúdo das placas e lavou-se as mesmas 4 vezes com o tampão de lavagem por meio de lavadora de microplaca. Após a última lavagem foi feita a remoção de todo o líquido remanescente, como citado anteriormente.

Realizou-se uma diluição em série do padrão de leptina e de adiponectina em PBS/BSA 0,1% de acordo com o recomendado pelo fabricante. Adicionou-se 50 µL/poço dos padrões e das amostras às placas. Em dois poços colocou-se 50 µL de PBS/BSA 0,1%, sem adição de padrão ou amostra, pois esses poços eram o 'branco' da placa. As placas foram colocadas dentro de uma caixa com uma cama úmida na geladeira por 16 horas. Em seguida, retirou-se o conteúdo das placas e realizou-se lavagem das mesmas 4 vezes com tampão de lavagem como supracitado. Diluiu-se 55,5 µL do anticorpo de detecção biotinilado em 10,5 mL de diluente de amostra. Adicionou-se 100 µL dessa solução em cada poço das placas, que foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas, sob constante agitação. Retirou-se o conteúdo das placas e lavou-se 4 vezes as mesmas com tampão de lavagem. Após a última lavagem foi feita a remoção de todo o líquido remanescente. Diluiu-se 50 µL de estreptavidina – HRP, uma proteína estreptavidina conjugada com uma enzima, em 10,5 mL de diluente de amostra e pipetou-se 100 µL dessa solução em cada poço das placas. A estreptavidina liga-se à biotina presente nos anticorpos de detecção. Manteve-se as mesmas sob constante agitação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 min. Retirou-se o conteúdo das placas e

lavou-se as mesmas 4 vezes com tampão de lavagem, tendo o mesmo cuidado de fazer a remoção de todo o líquido remanescente após a última lavagem. Adicionou-se às placas 100 µL/poço de solução de substrato, que contém o cromógeno OPD e o substrato da peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubou-se as mesmas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Isso fez com que a peroxidase reagisse com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, essa reação é revelada pelo cromógeno, que sofre um processo de oxidação dando origem a um produto com cor na amostra reagente. Na placa de ELISA para adiponectina deixou-se as amostras reagindo com a solução de substrato por 1 min e então adicionou-se 50 µL de solução stop a cada poço da placa para interromper o processo de oxidação do cromógeno. Enquanto os poços com as concentrações padrões ficaram reagindo com a solução de substrato por 6 min até a adição da solução stop. Na placa de ELISA para leptina deixou-se as amostras reagindo com a solução de substrato por 25 min. Já os poços com as concentrações padrões ficaram reagindo por 30 min, e então adicionou-se a solução stop. Os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Os resultados finais, em picogramas/mililitros (pg/mL), foram normalizados em relação aos níveis de proteína total presente no homogenato.

#### **4.7 Dosagem de citocinas por Cytometric Bead Array**

As dosagens de citocinas no hipotálamo, TAE, TAM e TAR dos animais foram realizadas pelo método cytometric bead array (CBA), utilizando-se o kit mouse Th1/Th2/Th17. As citocinas dosadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17A. O ensaio foi realizado conforme manual de instruções fornecido pela BD Biosciences.

Inicialmente reconstituiu-se o padrão de citocinas com 2,0 mL do diluente de ensaio, resultando em uma solução cuja concentração do padrão de citocinas era de 5000 pg/mL. Em seguida, realizou-se a diluição seriada da solução padrão. Essa foi feita da seguinte forma: pipetou-se 300 µL do diluente de ensaio em eppendorfs e então transferiu-se 300 µL da solução a 5000 pg/mL do padrão de citocinas para um dos eppendorfs (diluição 1:2). Transferiu-se 300 µL da solução presente no eppendorf com diluição 1:2 para o eppendorf seguinte (diluição 1:4) e assim, sucessivamente até a diluição de 1:256 (concentração do padrão de citocinas de 20

pg/mL). Em um dos eppendorfs colocou-se apenas o diluente do ensaio, esse foi o controle negativo. Posteriormente, preparou-se o mix de microesferas de captura. Transferiu-se 25  $\mu$ L desse mix para os eppendorfs onde estavam as diluições padrão de citocinas, o controle negativo e as amostras. Adicionou-se 25  $\mu$ L da solução presente em cada eppendorf para seus respectivos poços em uma placa de 96 poços. Transferiu-se 25  $\mu$ L do reagente de detecção de Ficoeritrina do kit para os poços e realizou-se incubação por 2 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Durante esse período realizou-se a configuração do citômetro de acordo com o manual de instruções. Adicionou-se 150  $\mu$ L de tampão de lavagem em cada poço e centrifugou-se a 200G por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente em cada poço 200  $\mu$ L de tampão de lavagem, realizou-se nova centrifugação a 200G por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e transferiu-se para cada poço 300  $\mu$ L de tampão de lavagem para ressuspender o pellet de esferas. Realizou-se leitura da placa no citômetro BD FACSCanto II (Becton & Dickson, San Jose, CA, USA). Os resultados foram analisados pelo *software* FCAP Array (BD Biosciences). A normalização dos resultados obtidos foi feita através dos níveis de proteína total no homogenato, determinados pelo método Bradford.

#### **4.8 Dosagem de proteína total**

A quantificação de proteína dos homogenatos do hipotálamo, TAE, TAM e TAR foram determinados através do método Bradford. Inicialmente preparou-se em eppendorfs, soluções padrões de BSA diluída em água destilada, nas seguintes concentrações: 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL. Em seguida adicionou-se 80 $\mu$ L de água destilada, 20  $\mu$ L de Bradford e 2  $\mu$ L da amostra de interesse ou das soluções padrões de BSA nos poços de uma placa de 96 wells. Em dois dos poços adicionou-se apenas água destilada e Bradford, os quais são o “branco” do experimento. O conteúdo dos poços foi homogeneizado através de um agitador e posteriormente, realizou-se leitura de absorbância à 595 nm. Subtraiu-se o valor de absorbância do branco de todas as concentrações padrões de BSA e das amostras. Através das absorbâncias e das concentrações padrões de BSA construiu-se um gráfico x (concentração de proteína) versus y (absorbância), do qual calculou-se a equação da reta. Através dessa equação obteve-se os valores da concentração de proteína nas amostras.

#### **4.9 Cálculo do somatório médio dos TAVs e das concentrações de adiponectina, leptina, razão adiponectina/leptina, razão IL-4 / IFN e razão IL-10 / TNF**

Para o cálculo do somatório médio da adiposidade visceral (figuras 12 e 13) e das concentrações de adiponectina (tabela 4 e figura 17 A) e leptina (tabela 5 e figura 18 A) por animal, primeiramente calculou-se a média do elemento em análise somando-se a quantidade do mesmo nos TAVs epididimal, mesentérico e retroperitoneal por animal utilizado no experimento e então, dividiu-se esse valor por três. Em seguida, através do *software* GraphPad Prism® 7.00 (San Diego, USA), realizou-se a média por grupo dos valores médios calculados anteriormente. Já para o cálculo do somatório médio das razões: adiponectina / leptina (tabela 6, figura 19), IL-4 / IFN (tabela 14 e figura 27 A) e IL-10 / TNF (tabela 15 e figura 28 A), primeiramente calculou-se a média por animal dos elementos envolvidos na razão da seguinte forma: somou-se a quantidade presente dos mesmos nos TAVs epididimal, mesentérico e retroperitoneal e dividiu-se esse valor por três. Então, realizou-se a razão por animal da média desses elementos. Em seguida, através do *software* GraphPad Prism® 7.00 (San Diego, USA), realizou-se a média por grupo dos valores médios calculados anteriormente. Esses cálculos foram realizados com animais de 6 e 12 meses de idade.

#### **4.10 Cálculo das razões**

Os cálculo das razões: adiponectina / leptina, IL-4 / IFN e IL-10 / TNF foram realizados da seguinte forma: inicialmente calculou-se a razão adiponectina / leptina, IL-4 / IFN ou IL-10 / TNF de cada amostra. Posteriormente, através do *software* GraphPad Prism® 7.00 (San Diego, USA) realizou-se a média por grupo das razões. Esses cálculos foram realizados com animais de 6 e 12 meses de idade.

#### **4.11 Análise estatística**

A análise dos dados e a confecção dos gráficos foram feitas utilizando-se o *software* GraphPad Prism® 7.00 (San Diego, USA). Utilizou-se o método de ROUT

para identificação de valores outliers e quando identificados, esses foram removidos antes da análise. Verificou-se a normalidade da resposta através do teste de Shapiro-Wilk. Verificou-se a existência de diferença estatística entre os grupos através do teste One-Way ANOVA. Para a comparação de médias utilizou-se o pós-teste de Bonferroni. Consideraram-se significativas as comparações que obtiveram valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média. Realizou-se análise estatística entre os grupos WT e mGluR5<sup>-/-</sup> e verificou-se que com exceção de três casos, não houve diferença estatística entre esses grupos. Além disso, o grupo mGluR5<sup>-/-</sup> estava sendo um fator de confusão para as comparações que realmente tínhamos interesse, que são aquelas entre os grupos: WT e BACHD, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>, WT e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Assim, optou-se por excluir o grupo mGluR5<sup>-/-</sup> das análises de concentração de: adiponectina, leptina e citocinas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da ausência de mGluR5 sobre o peso corporal e adiposidade visceral de animais BACHD.

Na literatura há estudos que demonstram o forte fenótipo de obesidade de animais BACHD. Também há evidências sobre a influência de mGluR5 no controle do balanço energético do organismo. Assim, investigou-se o efeito da deleção de mGluR5 sobre o peso corporal e a quantidade de gordura visceral de animais BACHD. Para verificar o efeito da deleção de mGluR5 sobre o peso corporal, realizou-se mensalmente a pesagem dos animais dos seguintes grupos: WT (controles), mGluR5<sup>-/-</sup> (não expressam mGluR5), BACHD (expressam mh<sup>tt</sup>) e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> (expressam mh<sup>tt</sup> e não expressam mGluR5). A análise dos dados demonstrou que a partir de 2 meses de idade, os camundongos BACHD apresentaram o maior peso corporal quando comparado aos demais grupos. Além disso, os BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiram redução do ganho de peso corporal comparado aos animais BACHD. Adicionalmente, o peso do grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi estatisticamente igual ao do grupo controle, como mostrado nas figuras 10 e 11.

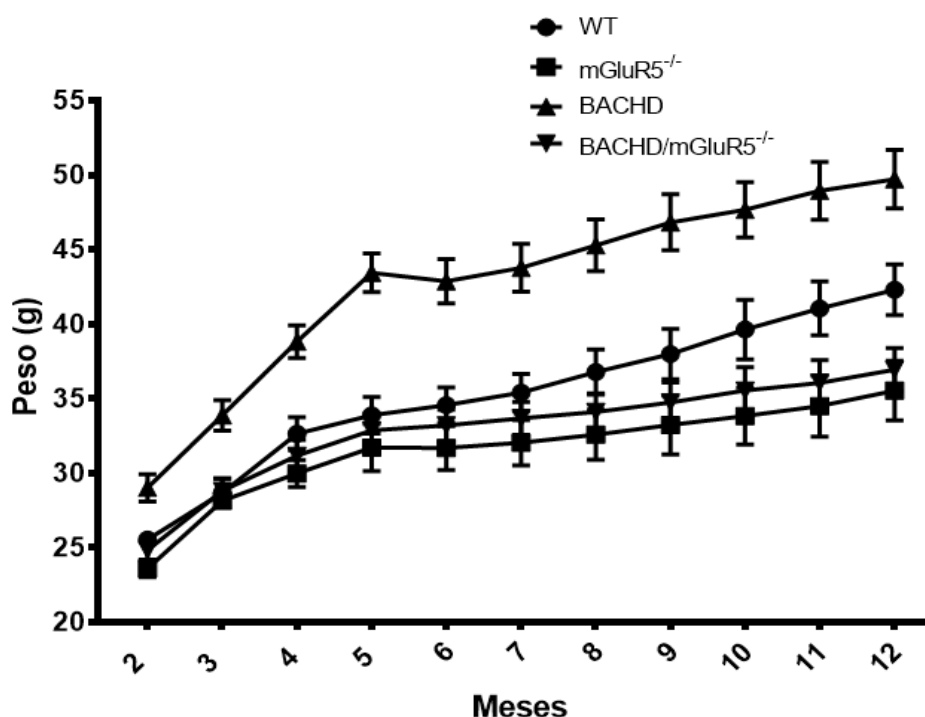
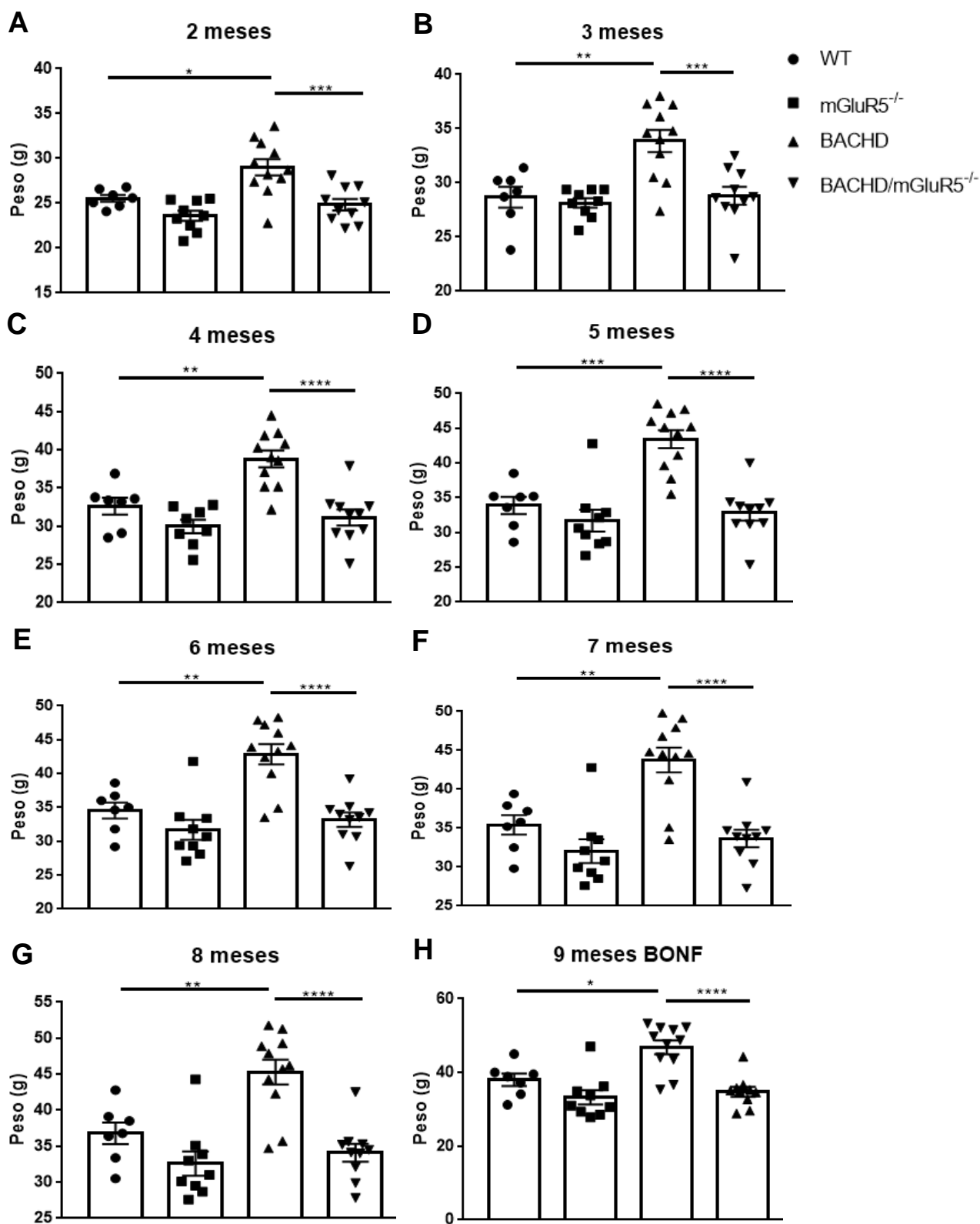
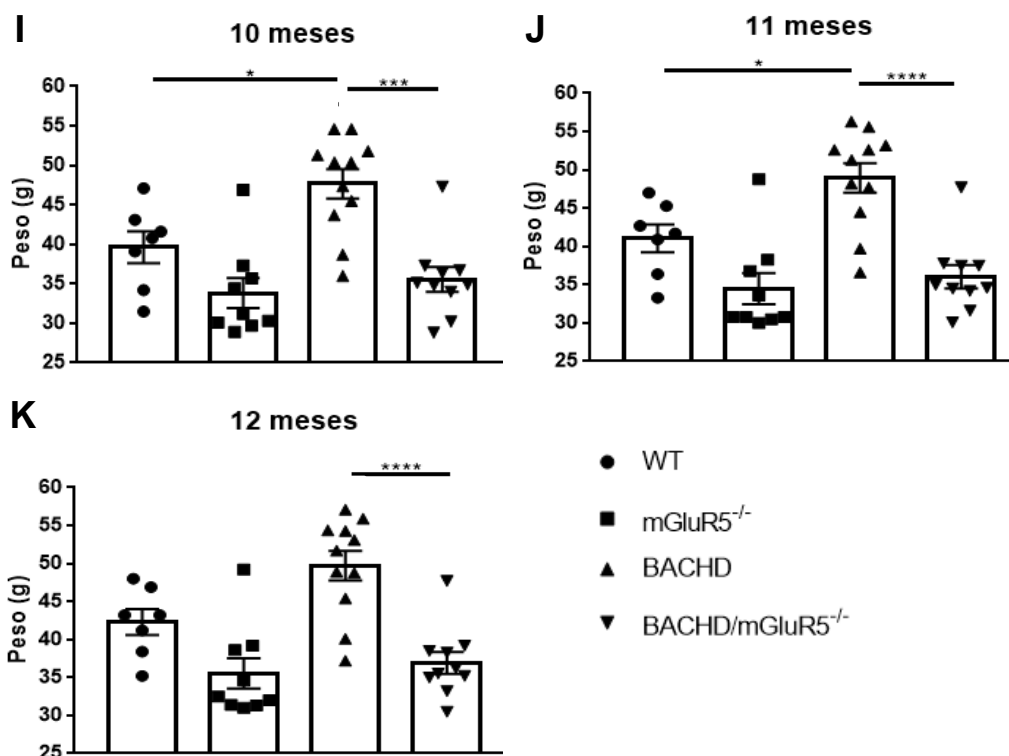


Figura 10 - Curva de peso representativa dos grupos de 2 a 12 meses. Figura representativa do peso corporal dos animais de 2 a 12 meses.

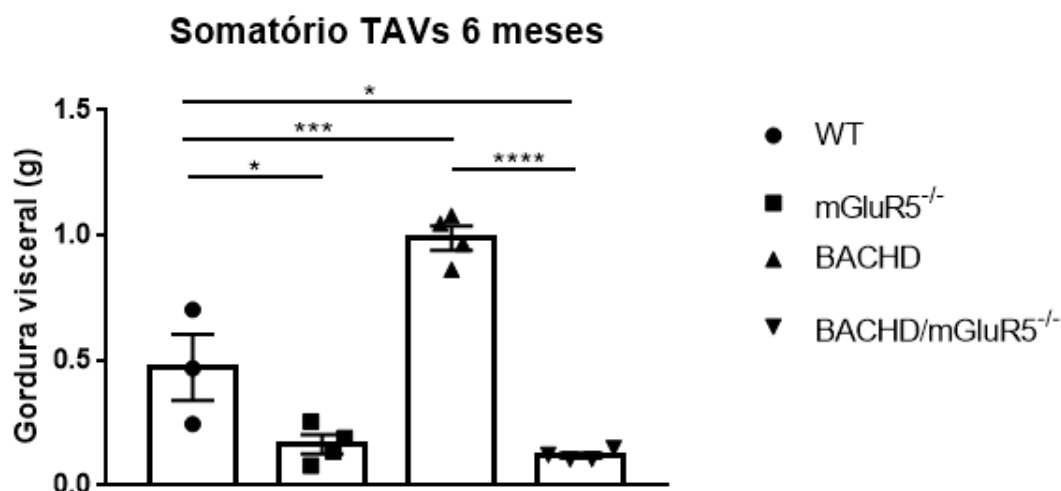




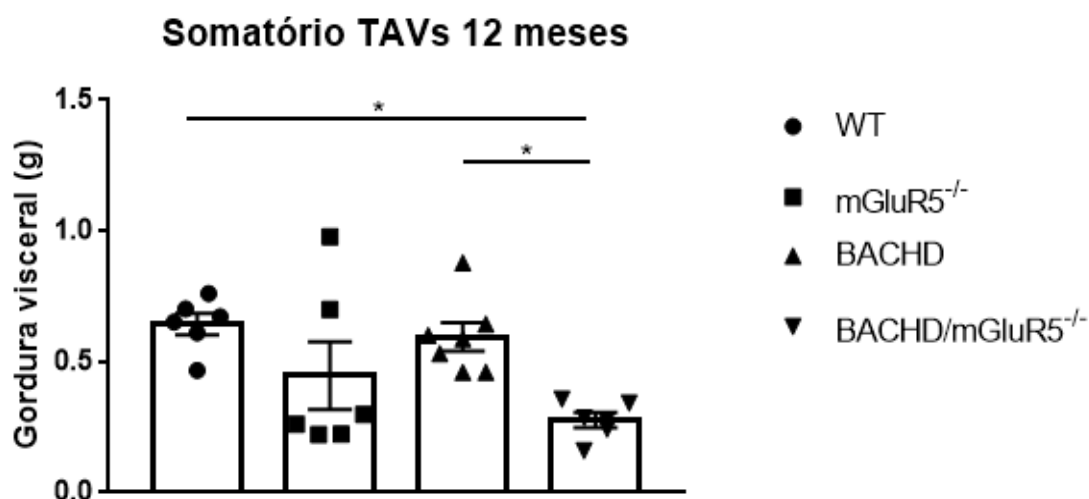


**Figura 11 - Camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam peso corporal igual ao grupo WT em todas as idade. (A-K) Peso corporal dos grupos WT, mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> de 2 - 12 meses de idade. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de Bonferroni com \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (n = 7-11).**

Nas análises de adiposidade visceral calculou-se o somatório médio de gordura visceral nos TAE, TAM e TAR dos animais aos 6 e 12 meses de idade. Escolheu-se estes períodos, pois os mesmos refletem as fases inicial e tardia da DH em animais BACHD. Ao analisar os resultados observou-se que tanto aos 6 meses de idade (figura 12) quanto aos 12 meses (figura 13), os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuíam menor adiposidade visceral quando comparados aos camundongos BACHD. Ademais, nessas duas idades a quantidade de gordura visceral do grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi menor que a do grupo WT.



**Figura 12 - Camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibem menor adiposidade visceral que os BACHD aos 6 meses de idade.** Somatório médio da quantidade de adiposidade visceral nos TAE, TAM e TAR dos animais: WT, mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 6 meses de idade. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com  $*p<0,05$ ;  $***p<0,001$ ;  $****p<0,0001$  (n = 3-4).

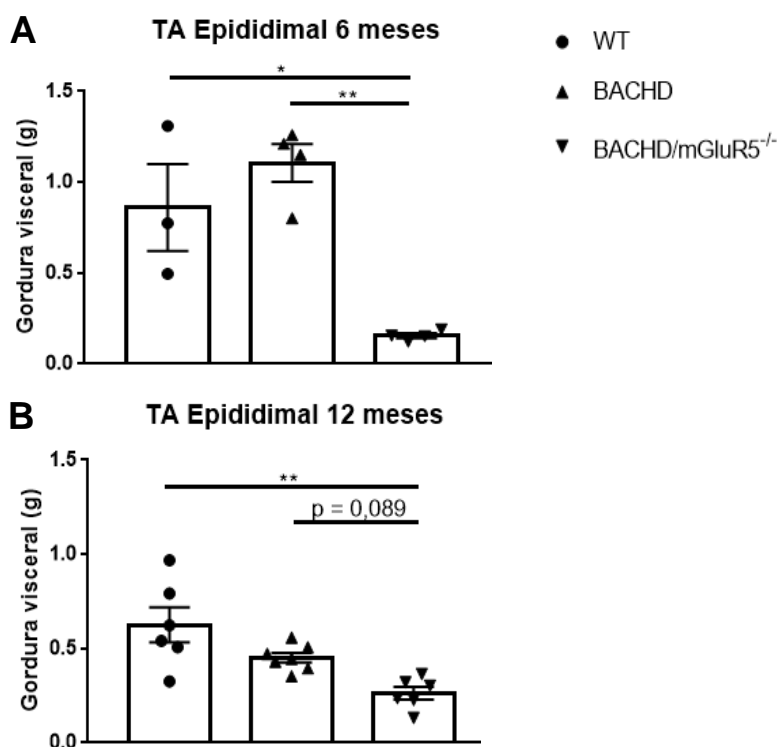


**Figura 13 - Camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam menor adiposidade visceral que os WT aos 12 meses.** Somatório médio da quantidade de adiposidade visceral nos TAE, TAM e TAR dos animais: WT, mGluR5<sup>-/-</sup>, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses de idade. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com  $*p<0,05$  (n = 6-7).

## 5.2 Ausência de mGluR5 em animais BACHD leva a redução da adiposidade visceral.

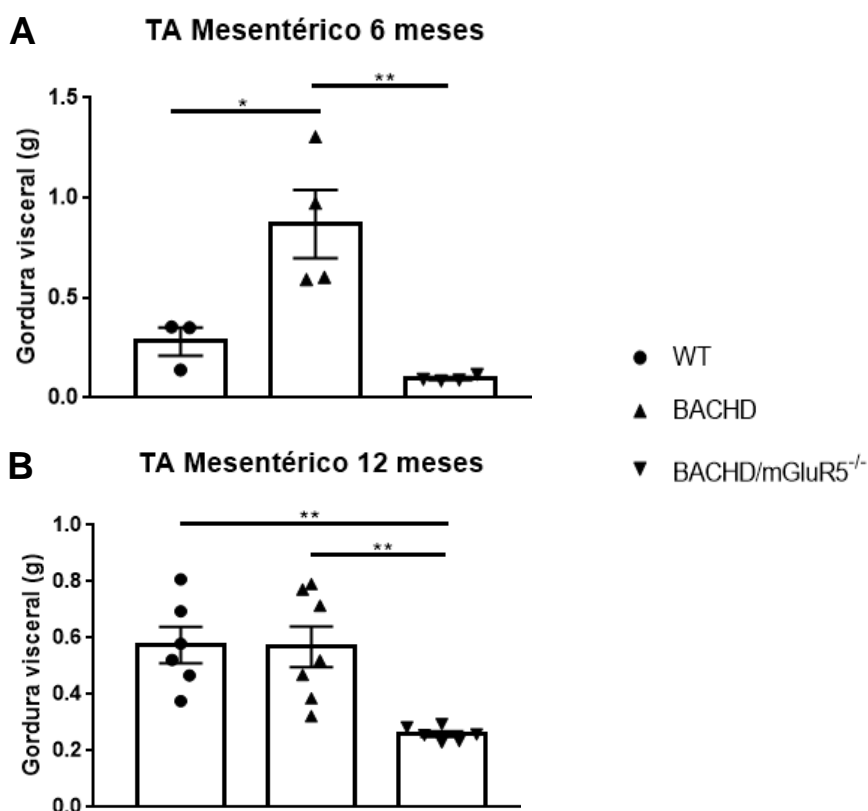
Após verificar-se que a adiposidade visceral dos genótipos diferia entre si, investigou-se em quais TAs estavam concentradas tais diferenças.

Através de nossos resultados observou-se que no TAE aos 6 meses e 12 meses de idade não houve diferença significativa entre a quantidade de gordura visceral de animais WT e BACHD. Entretanto, aos 6 meses, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi o que possuiu menor adiposidade visceral (figura 14 A). Além disso, aos 12 meses a quantidade de gordura visceral de animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi menor que a dos WT e apresentou tendência a ser menor que a dos BACHD (figura 14 B).



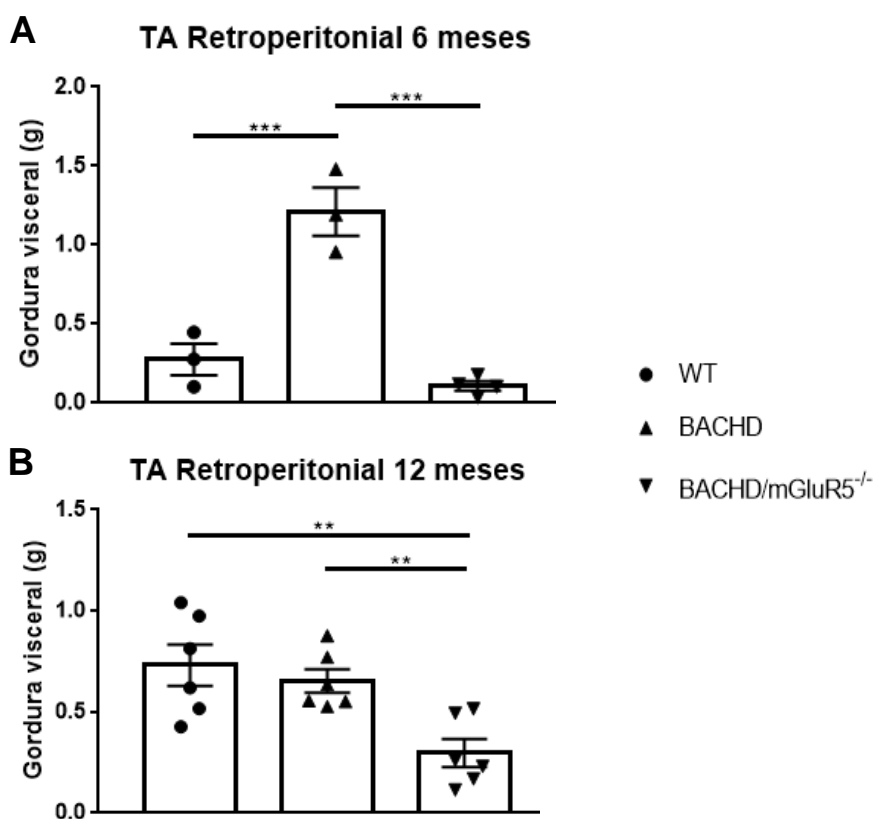
**Figura 14 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam redução da adiposidade visceral no TAE aos 6 meses e 12 meses. (A)** Aos 6 meses o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibe a menor quantidade de gordura visceral (n= 3-4). **(B)** Aos 12 meses, a adiposidade visceral de animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi menor que a dos WT e apresentou tendência a ser menor que a dos BACHD (n= 6-7). Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*p<0,05; \*\*p< 0,01.

No TAM observou-se que aos 6 meses de idade os animais BACHD apresentavam a maior adiposidade visceral. Ademais, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuía menor quantidade de gordura visceral que o BACHD e igual a do WT (figura 15 A). Aos 12 meses a adiposidade no TAM de animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi menor que a dos BACHD e dos WT (figura 15 B).



**Figura 15 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuem menor adiposidade visceral que os BACHD no TAM aos 6 e 12 meses. (A)** Aos 6 meses o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou quantidade de gordura visceral menor que o BACHD e igual ao WT (n= 3-4). **(B)** Aos 12 meses a adiposidade visceral de animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi menor que a dos WT (n= 6-7). Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*p<0,05; \*\*p< 0,01; \*\*\*p<0,001.

Tanto aos 6 meses de idade quanto aos 12 meses no TAR, observou-se um padrão de resposta muito semelhante a observada no TAM (figura 16 A e B).



**Figura 16 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam menor adiposidade visceral que os BACHD no TAR aos 6 e 12 meses. (A)** Aos 6 meses o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiu menor quantidade de gordura visceral que os BACHD e igual aos WT (n=3-4). **(B)** Aos 12 meses os animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentaram menor quantidade de gordura visceral que os BACHD e WT (n=6-7). Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### 5.3 Ausência de mGluR5 gera aumento de adiponectina, redução de leptina e eleva a razão entre adiponectina e leptina.

Devido à importância das adipocinas: adiponectina e leptina tanto no contexto do balanço energético quanto no inflamatório, investigou-se a concentração dessas adipocinas no TAE, TAM, TAR e hipotálamo em nossos grupos experimentais.

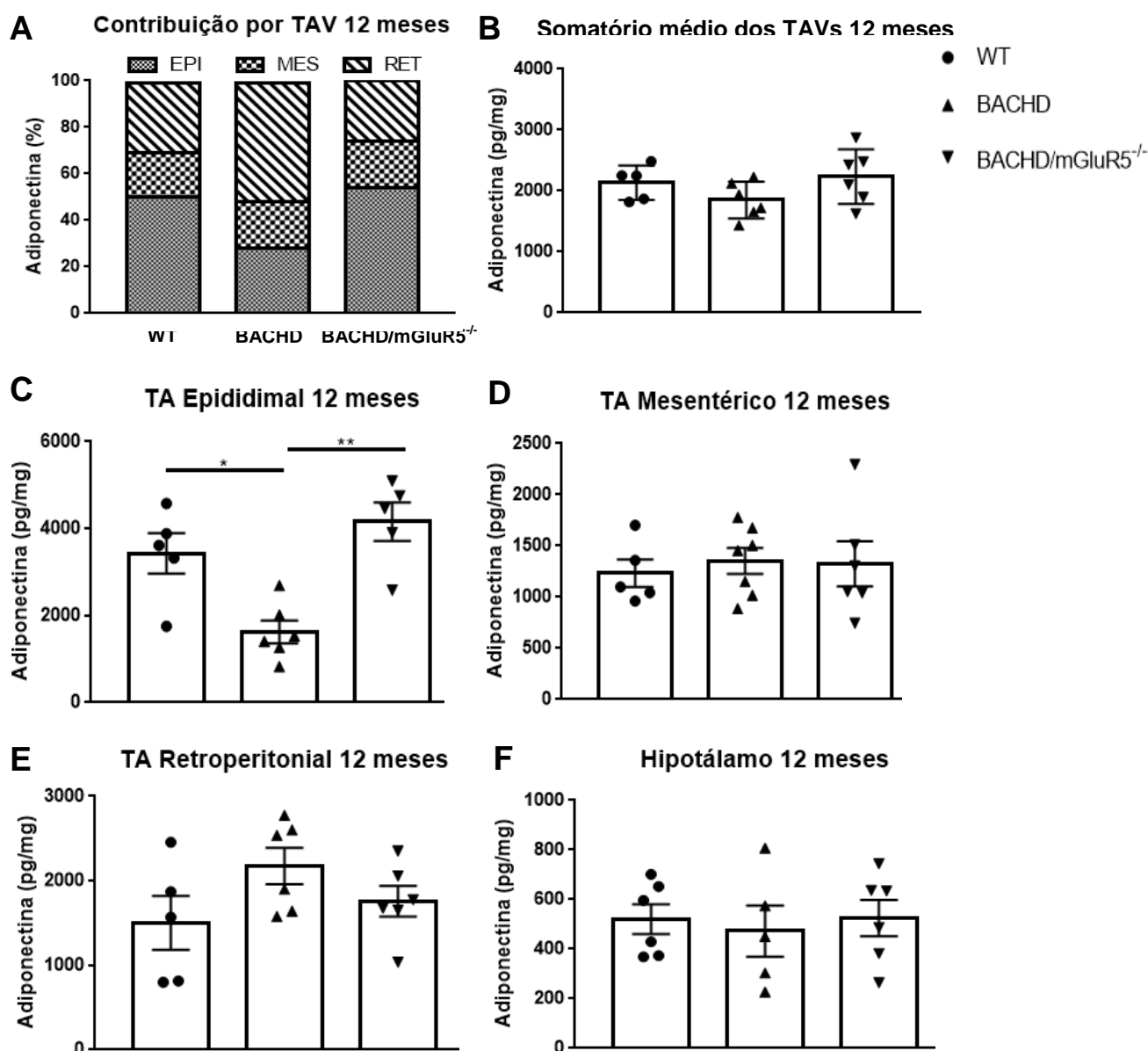
Os resultados demonstraram que aos 6 meses de idade não houve diferença significativa na concentração de adiponectina entre os genótipos em nenhum dos tecidos analisados e nem no somatório médio deles (tabela 4). Aos 12 meses, verificou-se que o TAV que mais parece contribuir para o total de leptina dos grupos WT e duplo mutante é o TAE, enquanto no grupo BACHD o TAR parece ser o que mais contribui (figura 17 A). Ademais, é possível perceber no somatório médio dos TAVs (somatório médio de TAE, TAM e TAR), que não há diferença na concentração de adiponectina entre os genótipos (figura 17 B). No TAE, o nível dessa adipocina no grupo BACHD foi menor que no WT. Além disso, a deleção de mGluR5 em animais BACHD foi capaz de reverter esse efeito (figura 17 C). Nos demais tecidos não há diferenças entre os grupos (figuras 17 D, E e F).

Na tabela 4 e figuras 17 B, C, D e E é possível observar que houve um aumento, em todos os grupos, da concentração de adiponectina nos TAs comparando 6 e 12 meses de idade.

Como supracitado, investigou-se também a concentração de leptina no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos diferentes grupos de animais. Aos 6 meses de idade houve diferença significativa na concentração de leptina apenas no TAM (tabela 5), no qual o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou maior nível dessa adipocina quando comparado ao grupo WT. Observa-se que aos 12 meses o TAV que mais parece contribuir para o total de leptina de cada um dos grupos é o TAE (figura 18 A). Em adição, foi verificado que o TAM dos animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou menor concentração de leptina que o TAM do grupo WT (figura 18 D). Ademais, em comparação ao grupo BACHD, os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiram menor nível dessa adipocina no TAR (figura 18 E), o que se refletiu no somatório médio dos TAVs analisados (figura 18 B). Sendo que no TAR a expressão de leptina se tornou menor, inclusive, que a de animais WT, e no somatório médio dos TAVs houve uma tendência a isso ( $p= 0,057$ ). Adicionado a essas observações, verificou-se que no hipotálamo, animais BACHD apresentaram maior nível de leptina que animais WT (figura 18 F). Ao comparar a tabela 5 e as figuras 18 B, C, D e E foi possível observar que de 6 para 12 meses a concentração de leptina nos TAs aumentou em todos os grupos.

**Tabela 4 – Concentração de adiponectina (pg/mg de proteína) no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

<b>Tecido</b>	<b>Grupos</b>	<b>Adiponectina ± SEM</b>	
Somatório médio dos TAVs	WT	336,5 ± 72,5	p > 0,99 p = 0,40
	BACHD	535,6 ± 141,5	
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	763,6 ± 226,3	
TAE	WT	169,5 ± 27,4	p > 0,99 p > 0,99 p > 0,99
	BACHD	196,6 ± 28,4	
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	230,9 ± 59,5	
TAM	WT	177,5 ± 48,6	p > 0,99 p > 0,99 p = 0,72
	BACHD	737,7 ± 92,41	
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	997,0 ± 344,8	
TAR	WT	662,6 ± 190,6	p > 0,99 p = 0,47 p = 0,53
	BACHD	672,5 ± 139,7	
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1063,0 ± 212,4	
Hipotálamo	WT	137,2 ± 80,34	p > 0,99 p = 0,47 p = 0,14
	BACHD	193,4 ± 46,45	
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	401,3 ± 103,5	

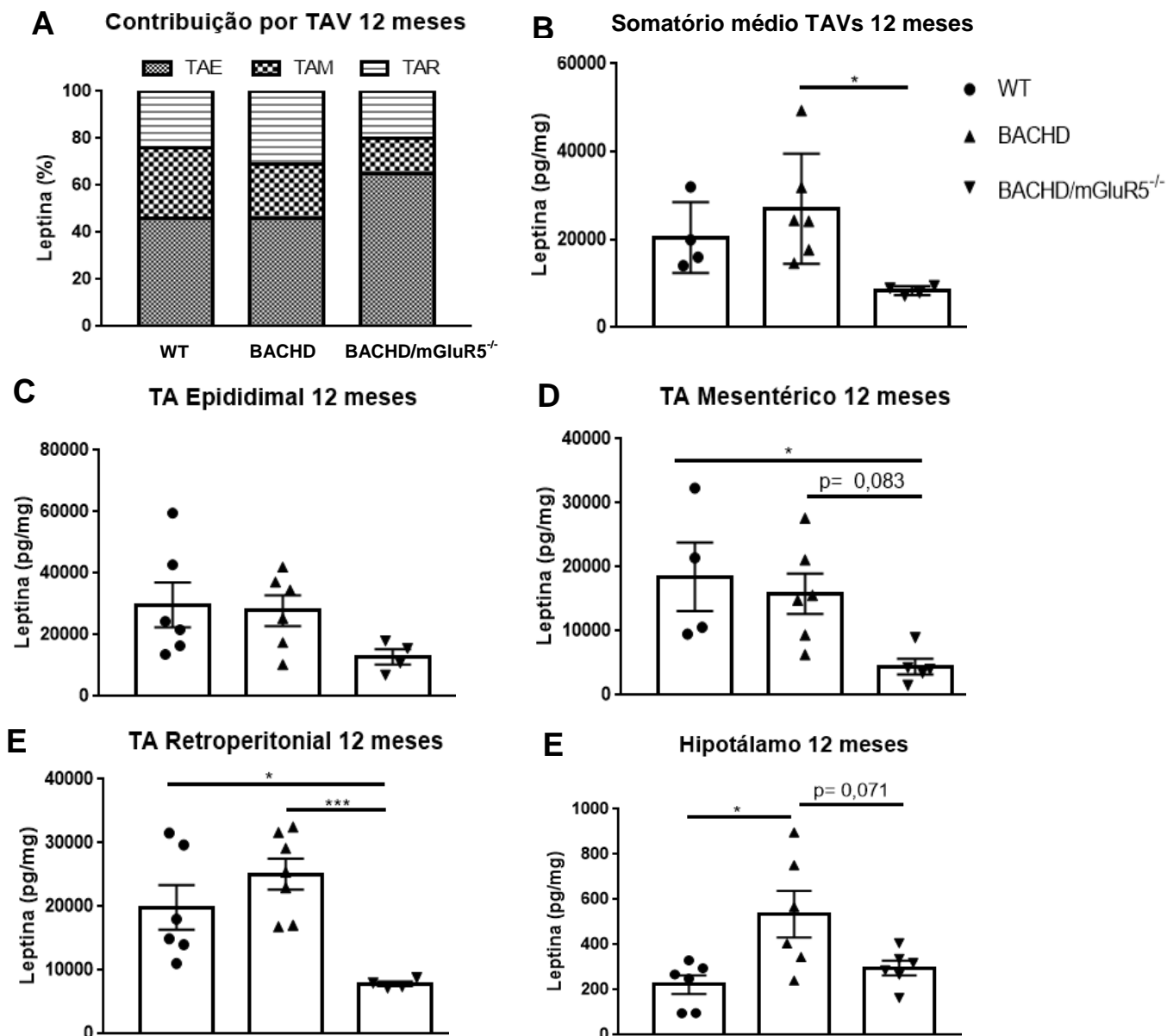


**Figura 17 - A ausência de mGluR5 reverte a redução de adiponectina observada em animais BACHD no TAE aos 12 meses. (A)** Gráfico representativo da contribuição de cada TAV para a quantidade total de adiponectina nos TAVs analisados. **(B-F)** Concentração de adiponectina no somatório médio dos TAVs, tecidos adiposos: epididimal, mesentérico, retroperitoneal e no hipotálamo dos animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses de idade (n= 6-7). Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Tabela 5 – Concentração de leptina (pg/mg de proteína) no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n = 3-4).**

Tecido	Grupos	Leptina ± SEM		
Somatório médio dos TAVs	WT	1149,0 ± 80,5	p = 0,46 p = 0,40	p > 0,99
	BACHD	1939,0 ± 578,0		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1094,0 ± 11,6		
TAE	WT	1517,0 ± 438,8	p = 0,55 p > 0,99	p = 0,14
	BACHD	853,2 ± 379,4		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	505,4 ± 96,26		
TAM	WT	504,6 ± 184,1	p > 0,99 p = 0,11	p = 0,04
	BACHD	636,5 ± 25,2		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1160,0 ± 154,4		
TAR	WT	1425,0 ± 370,5	p > 0,99 p > 0,99	p > 0,99
	BACHD	1868,0 ± 699,0		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1291,0 ± 383,1		
Hipotálamo	WT	25,70 ± 9,8	p = 0,60 p = 0,92	p > 0,99
	BACHD	99,00 ± 65,4		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	30,80 ± 0,26		



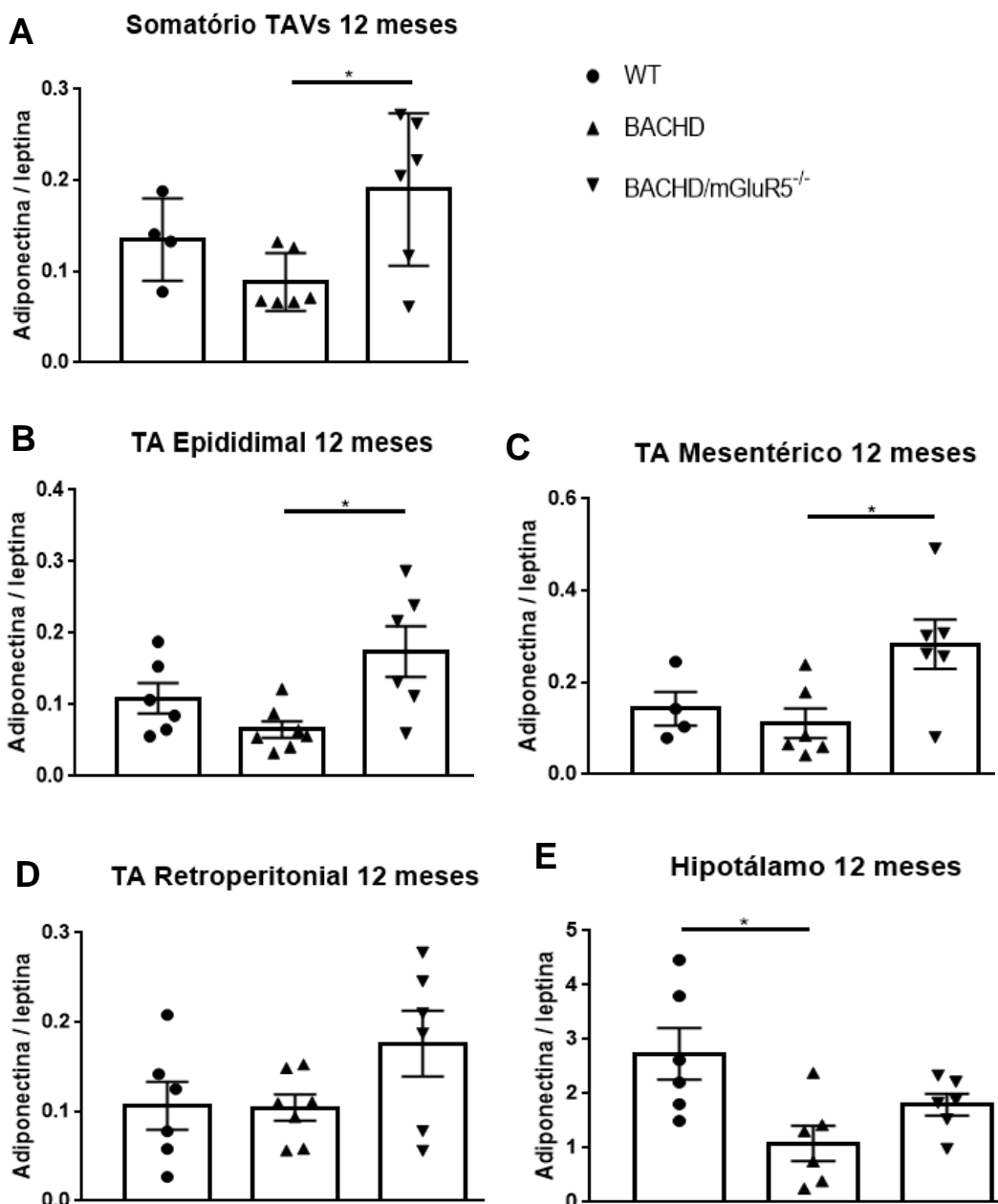
**Figura 18 - O grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possui menor nível de leptina que o BACHD no TAR, aos 12 meses, o que se reflete no somatório médio dos TAVs.**

**(A)** Gráfico representativo da contribuição de cada TAV para a quantidade total de leptina nos TAVs analisados. **(B-F)** Concentração de leptina no somatório médio dos TAVs, tecidos adiposos: epididimal, mesentérico, retroperitoneal e no hipotálamo dos animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses de idade (n= 4-7). Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Devido ao papel antagônico da adiponectina e da leptina em um contexto inflamatório, decidiu-se verificar se a razão da concentração dessas adipocinas diferiam significativamente nos tecidos analisados aos 6 e 12 meses de idade. Foi demonstrado que em todos os TAs analisados, a concentração de leptina foi maior que a de adiponectina, e a razão entre essas adipocinas variou entre os genótipos (figura 19). Aos 6 meses, não houve diferença significativa na razão adiponectina/leptina entre os grupos (tabela 6). Contudo aos 12 meses, ao considerar-se a totalidade dos TAVs analisados, verificou-se que os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiam maior razão adiponectina / leptina que os animais BACHD. Ademais, essa razão é estatisticamente igual aos animais WT (figura 19 A). Esse mesmo padrão de resposta foi observado no TAE e TAM (figura 19 B e C). Além disto, no hipotálamo o grupo BACHD apresentou menor razão adiponectina / leptina que o grupo WT (figuras 19 E).

**Tabela 6 – Razão adiponectina / leptina (pg/mg de proteína) no somatório médio dos TAVs, TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

<b>Tecido</b>	<b>Grupos</b>	<b>Adiponectina / leptina ± SEM</b>		
Somatório médio TAVs	WT	0,2934 ± 0,06	} p > 0,99	} p = 0,21
	BACHD	0,3799 ± 0,14		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,7842 ± 0,20		
TAE	WT	0,1364 ± 0,05	} p > 0,99	} p = 0,39
	BACHD	0,3406 ± 0,19		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,4762 ± 0,10		
TAM	WT	0,5245 ± 0,24	} p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	0,5714 ± 0,11		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,7491 ± 0,35		
TAR	WT	0,4542 ± 0,03	} p > 0,99	} p = 0,72
	BACHD	0,4307 ± 0,20		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1,4930 ± 0,85		
Hipotálamo	WT	4,4350 ± 1,74	} p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	1,3950 ± 0,85		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	6,3190 ± 3,36		



**Figura 19 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibem maior razão adiponectina/leptina nos TAE e TAM, o que se reflete no somatório médio de TAVs. (A-E) Razão adiponectina / leptina nos tecidos adiposos: epididimal, mesentérico, retroperitoneal e no somatório médio dos animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses de idade (n= 4-7). Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com  $*p < 0,05$ .**

#### 5.4 A ausência de mGluR5 promove aumento do perfil anti-inflamatório em um contexto de obesidade

Sabendo que a obesidade é uma doença inflamatória crônica de baixo grau, decidiu-se investigar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no TAE, no TAM, no TAR e no hipotálamo dos animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 6 e 12 meses de idade.

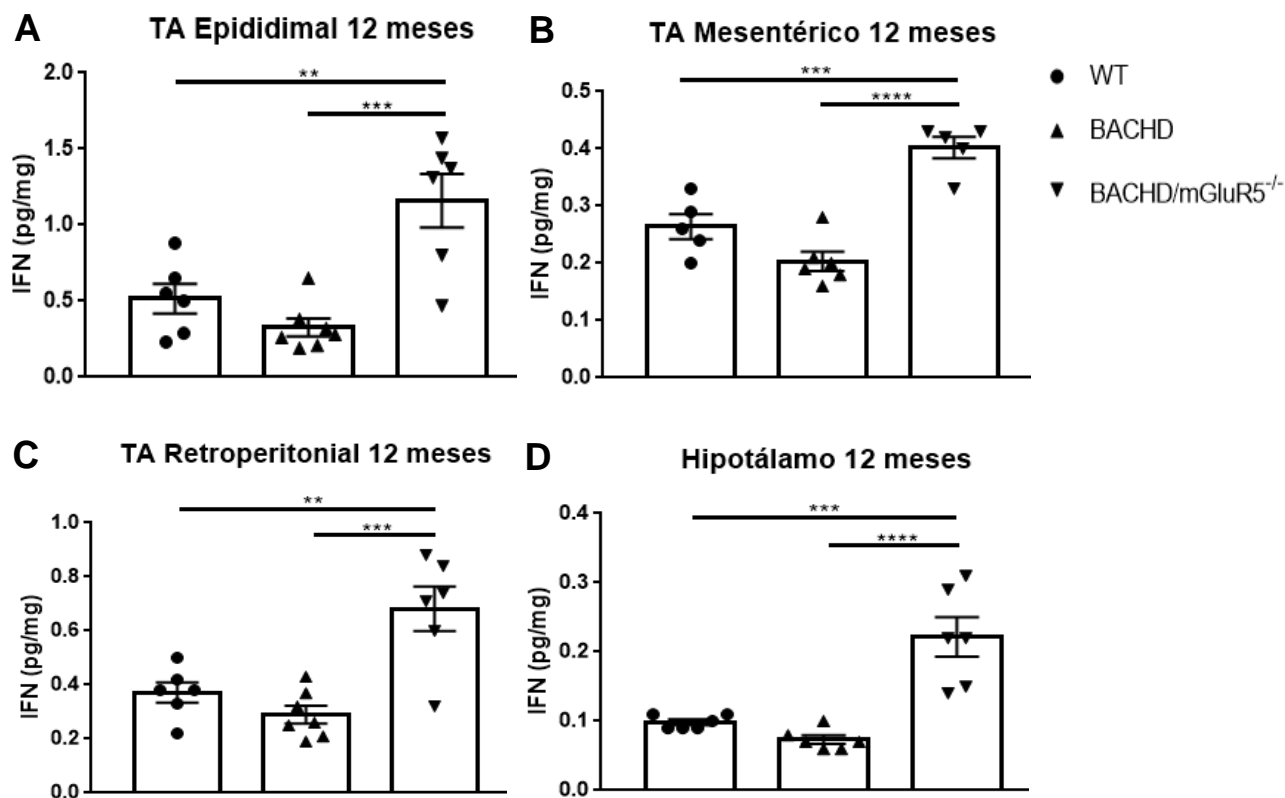
IFN é uma citocina pró-inflamatória tanto no TA quanto no hipotálamo (ROCHA et al., 2008; CARUSO et al., 2010). Células T CD4<sup>+</sup> secretoras de IFN induzem as funções pró-inflamatórias dos macrófagos, promovendo a liberação de IL-6 e TNF (WINER et al., 2009). Assim, foi verificado que aos 6 meses de idade não houve nenhuma diferença na expressão desta citocina entre os grupos em nenhum dos tecidos analisados (tabela 7). Contudo, aos 12 meses os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> expressaram mais IFN que os BACHD e WT (figura 20 A-D) em todos os tecidos analisados.

Verificou-se também a expressão de IL-2, uma citocina pró-inflamatória tanto periféricamente quanto centralmente em um contexto de obesidade (MARTIN et al., 2010; COSTANZO et al., 2015; SIMCOCKS et al., 2019). Assim como ocorreu com IFN, aos 6 meses não houve diferença na concentração desta citocina entre os grupos em nenhum dos tecidos analisados (tabela 8). Entretanto, aos 12 meses de idade, animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiram mais IL-2 que os WT e os BACHD no TAE, TAR e no hipotálamo (figura 21 A, C e D). No TAM, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou mais IL-2 somente quando comparado ao grupo BACHD (figura 21 B).

Foi quantificado também o nível de TNF, que também é uma citocina pró-inflamatória tanto periféricamente (HAM et al., 2013; ALOYSIUS et al., 2018) quanto centralmente (THALER et al., 2012) em indivíduos com obesidade. Aos 6 meses, a única diferença estatística observada entre os grupos foi entre os animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> e os BACHD, em que constatou-se um maior nível de TNF em animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> (tabela 9). Aos 12 meses, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> expressou essa citocina em maior quantidade que os grupos WT e BACHD em todos os tecidos analisados (figuras 22 A, B, C e D). Ademais, no TAM o grupo WT exibiu maior concentração de TNF que o grupo BACHD (figura 22 B).

**Tabela 7 – Concentração de interferon (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

<b>Tecido</b>	<b>Grupos</b>	<b>Interferon ± SEM</b>		
TAE	WT	0,0600 ± 0,01	] p > 0,99 ]	] p = 0,97 ]
	BACHD	0,0675 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,0450 ± 0,01		
TAM	WT	0,0700 ± 0,02	] p = 0,95 ]	] p = 0,60 ]
	BACHD	0,1433 ± 0,03		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,1600 ± 0,06		
TAR	WT	0,1800 ± 0,04	] p = 0,71 ]	] p > 0,99 ]
	BACHD	0,2225 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,1900 ± 0,00		
Hipotálamo	WT	0,0825 ± 0,01	] p > 0,99 ]	] p = 0,14 ]
	BACHD	0,0700 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,0900 ± 0,00		

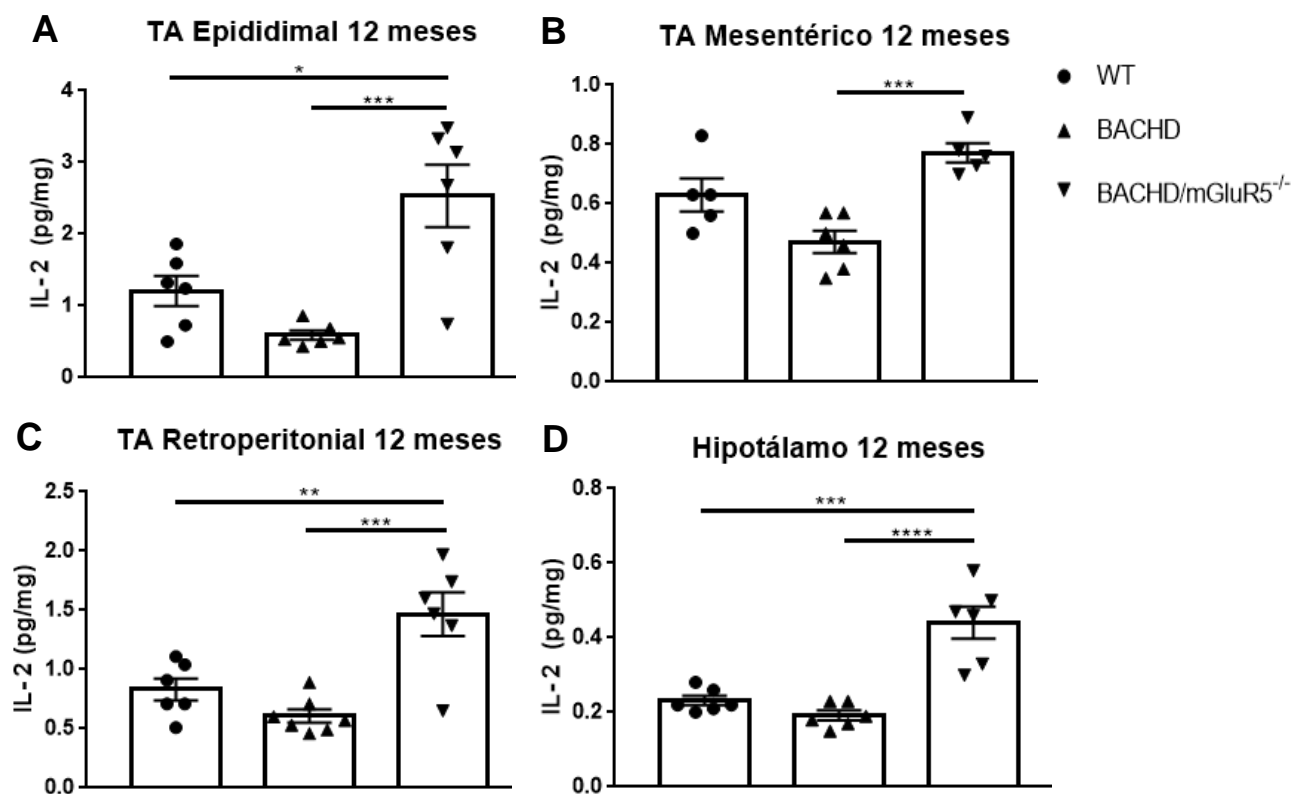


**Figura 20 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam maior nível de IFN que os WT e os BACHD aos 12 meses nos tecidos analisados. (A-D) Concentração de IFN no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ( $n = 6-7$ ).**



**Tabela 8 – Concentração de IL-2 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

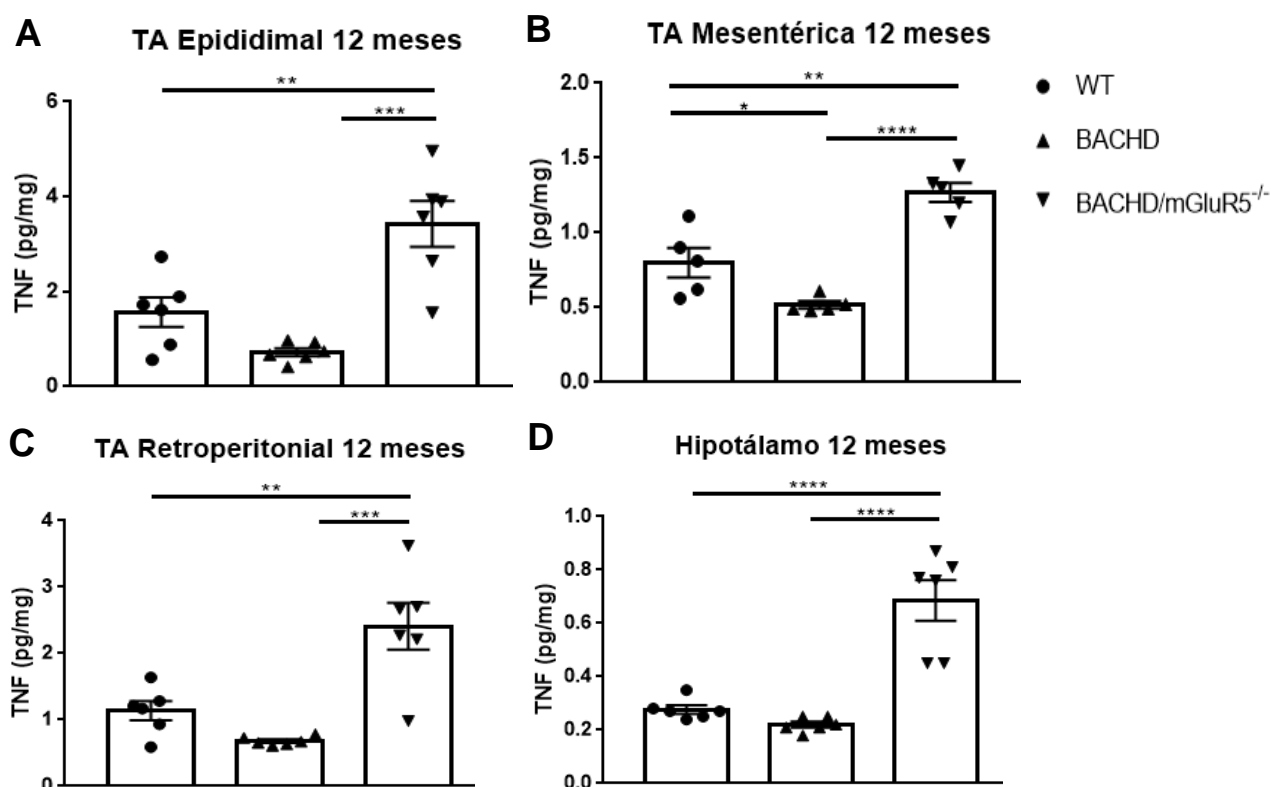
<b>Tecido</b>	<b>Grupos</b>	<b>Interferon ± SEM</b>		
TAE	WT	0,1333 ± 0,01	] p > 0,99 ]	] p = 0,86 ]
	BACHD	0,1567 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,1075 ± 0,02		
TAM	WT	0,1600 ± 0,02	] p = 0,57 ]	] p > 0,99 ]
	BACHD	0,2867 ± 0,03		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2367 ± 0,10		
TAR	WT	0,4033 ± 0,10	] p = 0,38 ]	] p > 0,99 ]
	BACHD	0,5250 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,4675 ± 0,03		
Hipotálamo	WT	0,1950 ± 0,01	] p > 0,99 ]	] p > 0,99 ]
	BACHD	0,1750 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2067 ± 0,01		



**Figura 21 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuem maior expressão de IL-2 aos 12 meses nos tecidos analisados. (A-D) Concentração de IL-2 no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ( $n = 5-7$ ).**

**Tabela 9 – Concentração de TNF (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

Tecido	Grupos	TNF ± SEM		
TAE	WT	0,1567 ± 0,03	p = 0,52	p = 0,91
	BACHD	0,2200 ± 0,04		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,1100 ± 0,02	p = 0,07	
TAM	WT	0,2367 ± 0,04	p = 0,57	p > 0,99
	BACHD	0,7825 ± 0,21		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,5925 ± 0,24	p > 0,99	
TAR	WT	0,4500 ± 0,11	p = 0,33	p = 0,50
	BACHD	0,6400 ± 0,05		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,6100 ± 0,06	p > 0,99	
Hipotálamo	WT	0,2175 ± 0,02	p > 0,99	p = 0,06
	BACHD	0,2075 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2867 ± 0,01	p = 0,03	

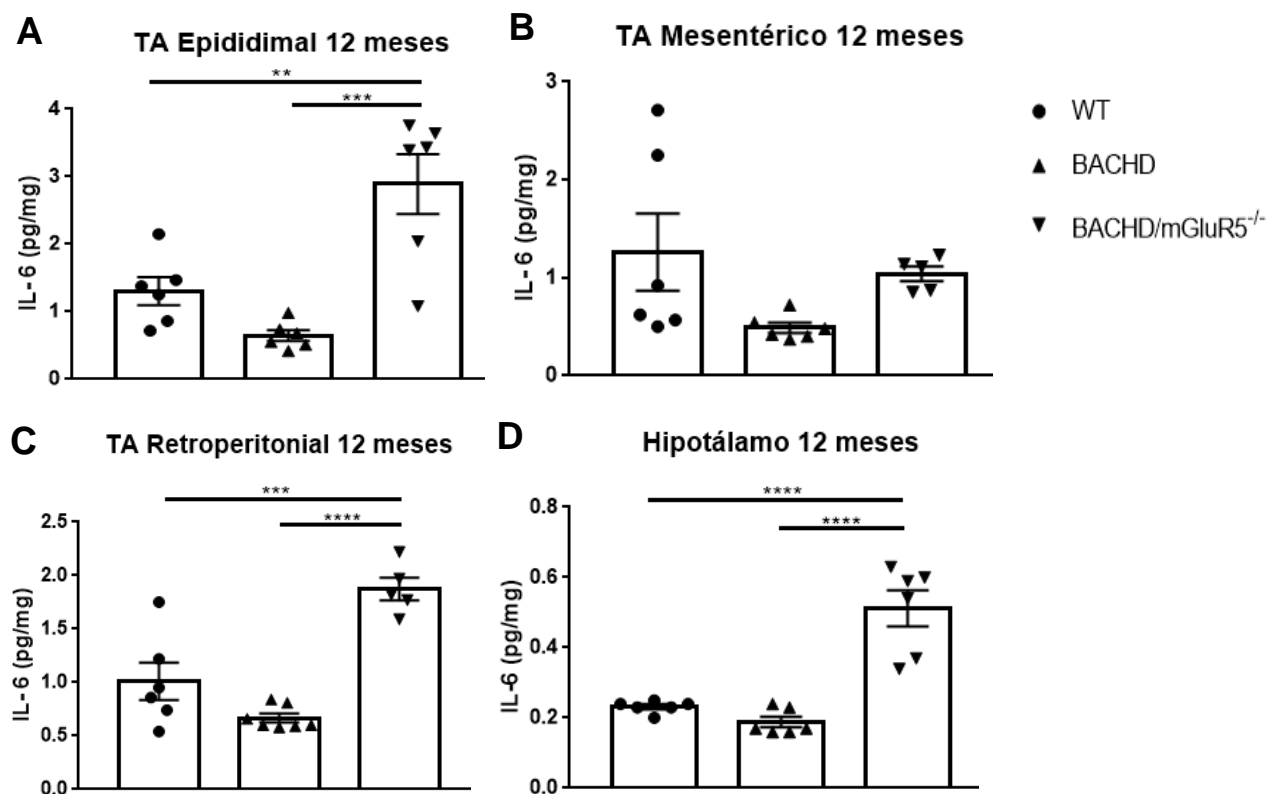


**Figura 22 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam maior nível de TNF aos 12 meses nos tecidos analisados. (A-D) Concentração de TNF no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 (n= 5-7).**

Analisou-se os níveis de expressão da citocina IL-6, que pode exercer um papel pró-inflamatório no TA (HAM et al., 2013), mas que possui um papel ainda não elucidado no SNC em um contexto de obesidade (ROPELLE et al., 2010; ARNOLDUSSEN, KILIAAN e GUSTAFSON, 2014). Foi demonstrado que no TAE e no TAM de animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>, aos 6 meses de idade, houve menor expressão desta citocina quando comparado aos animais BACHD (tabela 10). Além disso, o nível de expressão da mesma entre animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> e WT foi estatisticamente igual (tabela 10). Nos demais tecidos não houve diferença entre os grupos. Aos 12 meses, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiu maior nível de IL-6 que os grupos BACHD e WT no TAE, TAR e hipotálamo (figuras 23 A, C e D). No TAM não foram observadas diferença entre os grupos (figura 23 B).

**Tabela 10 – Concentração de IL-6 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

Tecido	Grupos	IL-6 ± SEM		
TAE	WT	0,1300 ± 0,01	p = 0,21	p > 0,99
	BACHD	0,1833 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,0975 ± 0,02	p = 0,03	
TAM	WT	0,1467 ± 0,02	p = 0,21	p > 0,99
	BACHD	0,3000 ± 0,04		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2167 ± 0,08	p = 0,03	
TAR	WT	0,4533 ± 0,13	p = 0,20	p > 0,99
	BACHD	0,7300 ± 0,09		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,4900 ± 0,05	p = 0,25	
Hipotálamo	WT	0,1975 ± 0,02	p > 0,99	p > 0,99
	BACHD	0,1775 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2033 ± 0,01	p = 0,80	



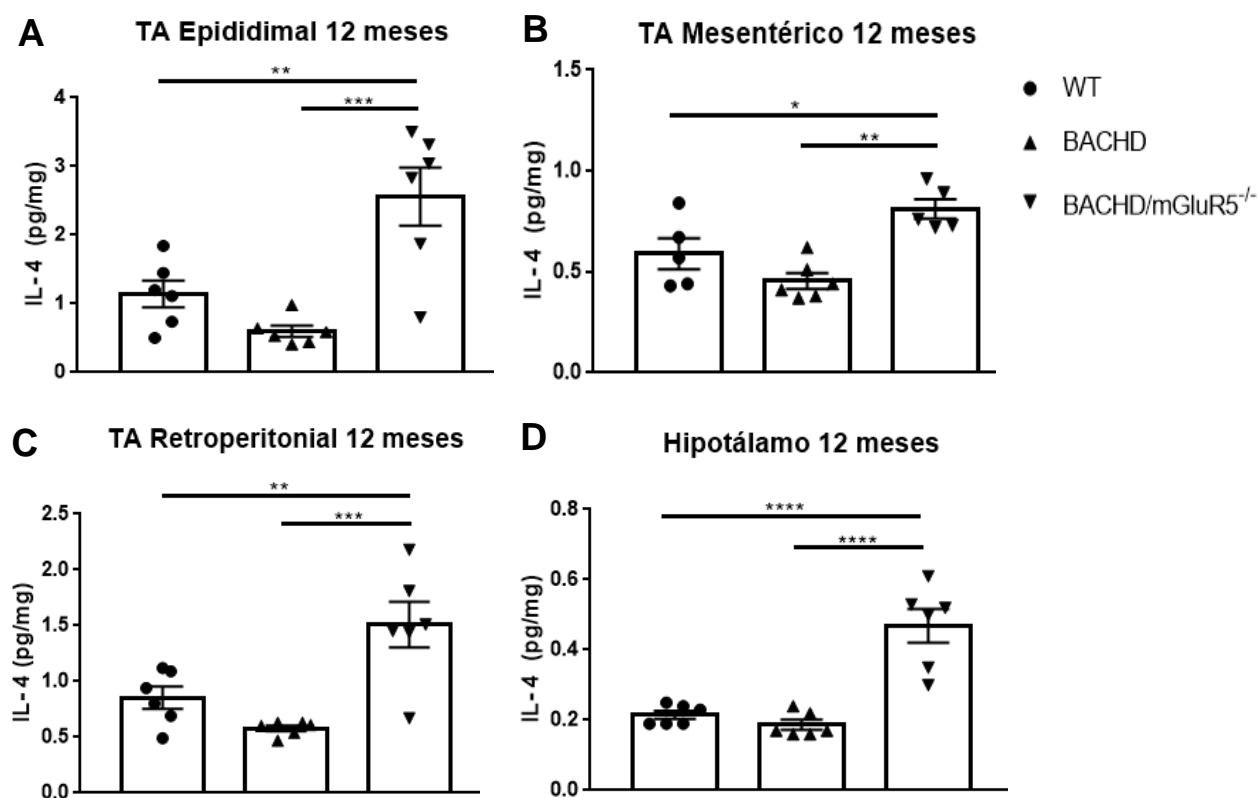
**Figura 23 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam elevação na expressão de IL-6 no TAE, TAR e hipotálamo aos 12 meses. (A-D) Concentração de IL-6 no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001 (n= 5-7).**

Quantificou-se também IL-4, uma citocina anti-inflamatória em tecidos periféricos num contexto de obesidade (WENSVEEN et al., 2015). Diversos estudos demonstraram que a IL-4 também exerce um efeito anti-inflamatório no SNC, sendo protetora em doenças como Alzheimer e esclerose múltipla (CHAO, MOLITOR e HU, 1993; SZCZEPANIK et al., 2001; BUTOVSKY et al., 2005; PARK et al., 2005). Contudo, há um artigo científico que investigou o papel de IL-4 em um contexto de obesidade e demonstrou que essa citocina promoveu um efeito pró-inflamatório no hipotálamo de animais alimentados com dieta rica em gordura (OH-I et al., 2010). Portanto, o papel de IL-4 no SNC em um contexto de obesidade ainda precisa ser melhor esclarecido. Através dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível observar que aos 6 meses de idade não houve nenhuma diferença na expressão de

IL-4 entre os grupos em nenhum dos tecidos analisados (tabela 11). Aos 12 meses, os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentaram concentração de IL-4 maior que a dos BACHD e até mesmo maior que a dos animais WT em todos os tecidos analisados (figura 24 A-D).

**Tabela 11 – Concentração de IL-4 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

Tecido	Grupos	IL-4 ± SEM		
TAE	WT	0,1367 ± 0,02	p = 0,86	p = 0,65
	BACHD	0,1700 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,0975 ± 0,01	p = 0,08	
TAM	WT	0,1633 ± 0,02	p = 0,21	p > 0,99
	BACHD	0,2900 ± 0,04		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2400 ± 0,09	p = 0,03	
TAR	WT	0,4667 ± 0,12	p > 0,99	p > 0,99
	BACHD	0,5550 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,4800 ± 0,04	p > 0,99	
Hipotálamo	WT	0,1825 ± 0,02	p > 0,99	p > 0,99
	BACHD	0,1825 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,1900 ± 0,01	p > 0,99	



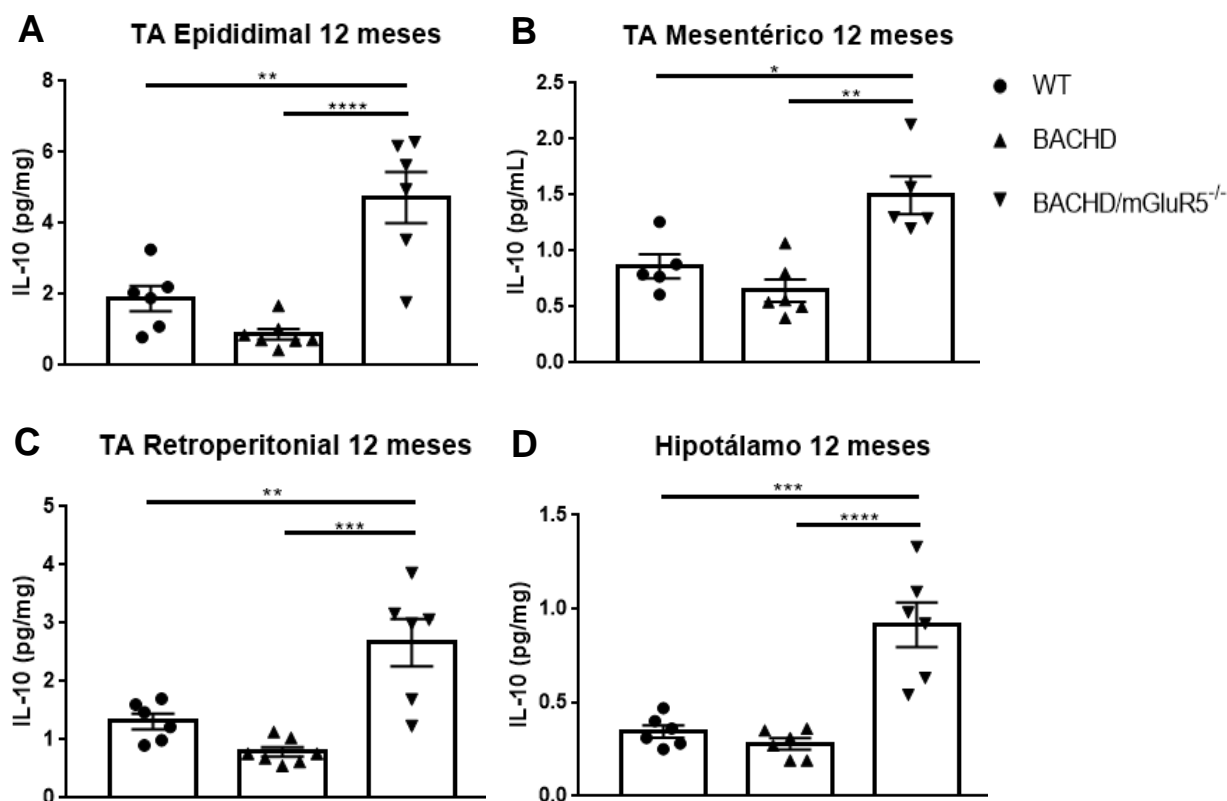
**Figura 24 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuem maior expressão de IL-4 aos 12 meses nos tecidos analisados. (A-D)** Concentração de IL-4 no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001 (n= 5-7).

A citocina IL-10 pode apresentar efeitos anti-inflamatórios tanto nos TAs (ALOYSIUS et al., 2018) quanto no hipotálamo (ROPELLE et al., 2010) em indivíduos com obesidade. Observou-se que o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou redução da expressão de IL-10 aos 6 meses no TAE e TAM quando comparado ao grupo BACHD (tabela 12). Aos 6 meses de idade não houve diferença entre os grupos nos demais tecidos. Entretanto, aos 12 meses o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou maiores níveis dessa citocina que o grupo BACHD e o WT no TAE, TAM, TAR e hipotálamo (figura 25 A-D).



**Tabela 12 – Concentração de IL-10 (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

<b>Tecido</b>	<b>Grupos</b>	<b>IL-10 ± SEM</b>		
TAE	WT	0,1467 ± 0,01	p = 0,13	p > 0,99
	BACHD	0,2225 ± 0,03		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,1225 ± 0,02	p = 0,02	
TAM	WT	2,8600 ± 0,02	p = 0,06	p > 0,99
	BACHD	6,7250 ± 1,48		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,6800 ± 0,31	p = 0,03	
TAR	WT	0,5233 ± 0,14	p = 0,84	p > 0,99
	BACHD	0,7750 ± 0,10		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,7075 ± 0,18	p > 0,99	
Hipotálamo	WT	0,2625 ± 0,03	p > 0,99	p = 0,57
	BACHD	0,2600 ± 0,04		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,3300 ± 0,02	p = 0,52	

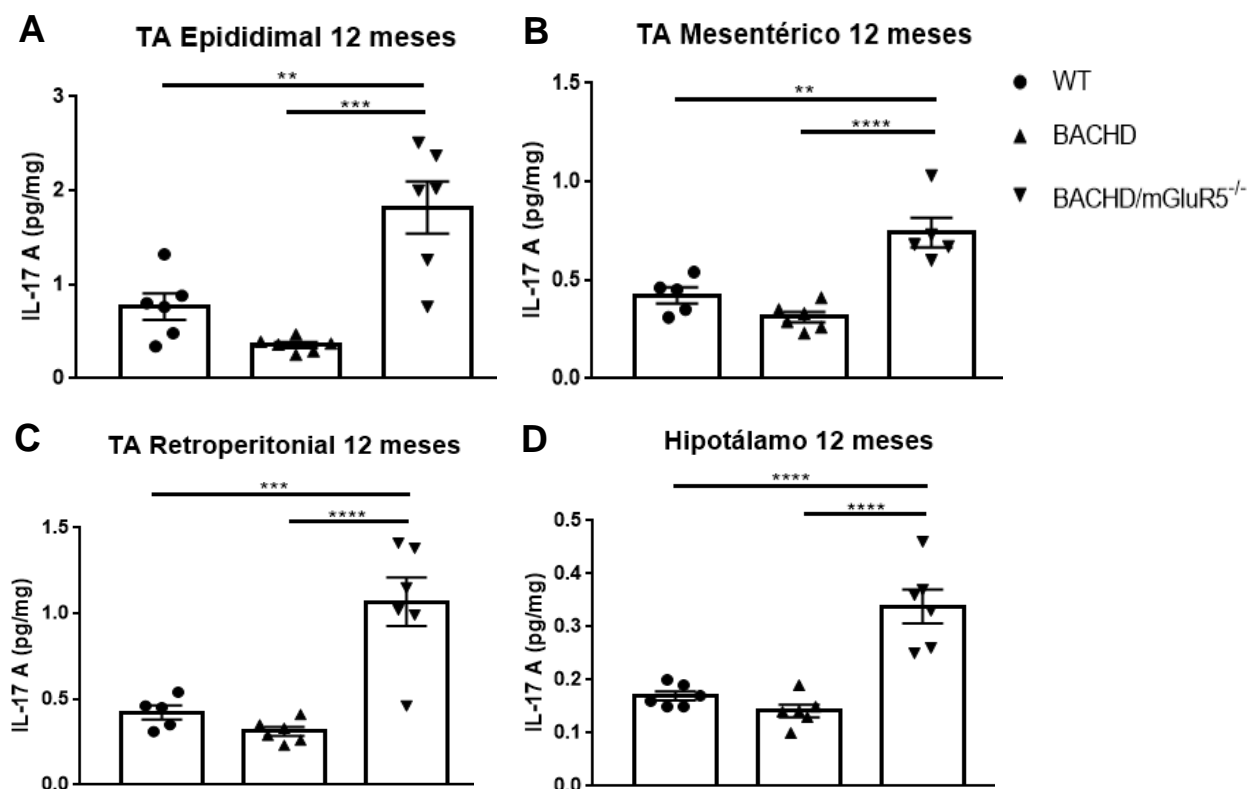


**Figura 25 - O grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possui aumento na expressão de IL-10 nos tecidos analisados aos 12 meses. (A-D) Concentração de IL-10 no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*p<0,05; \*\*p< 0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 (n= 5-7).**

Analisou-se também os níveis de expressão da citocina IL-17 A, que pode promover efeitos pró-inflamatórios na obesidade e em doenças no SNC, como esclerose múltipla (JADIDI-NIARAGH e MIRSHAFIEY, 2011; LIU et al., 2014). Assim como IFN, a IL-17 A induz ações pró-inflamatórias em macrófagos, promovendo a liberação de IL-6 e TNF (WINER et al., 2009). Aos 6 meses de idade, camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiram menor concentração de IL-17 A que os BACHD no TAE (tabela 13). Nessa idade não ocorreram mais diferenças estatísticas entre os grupos. Entretanto, aos 12 meses de idade, em todos os tecidos analisados observou-se que o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiu maior concentração de IL-17 A que os grupos WT e BACHD (figura 35 D e F).

**Tabela 13 – Concentração de IL-17 A (pg/mg de proteína) no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

<b>Tecido</b>	<b>Grupos</b>	<b>IL-17 A ± SEM</b>		
TAE	WT	0,0900 ± 0,01	p = 0,38	p = 0,50
	BACHD	0,1150 ± 0,01		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,0675 ± 0,01	p = 0,02	
TAM	WT	0,3067 ± 0,14	p = 0,40	p > 0,99
	BACHD	0,8575 ± 0,30		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,3450 ± 0,15	p = 0,39	
TAR	WT	0,2633 ± 0,06	p = 0,35	p > 0,99
	BACHD	0,3700 ± 0,03		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,3200 ± 0,03	p > 0,99	
Hipotálamo	WT	0,1375 ± 0,02	p > 0,99	p = 0,44
	BACHD	0,1175 ± 0,00		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	0,2200 ± 0,06	p = 0,24	



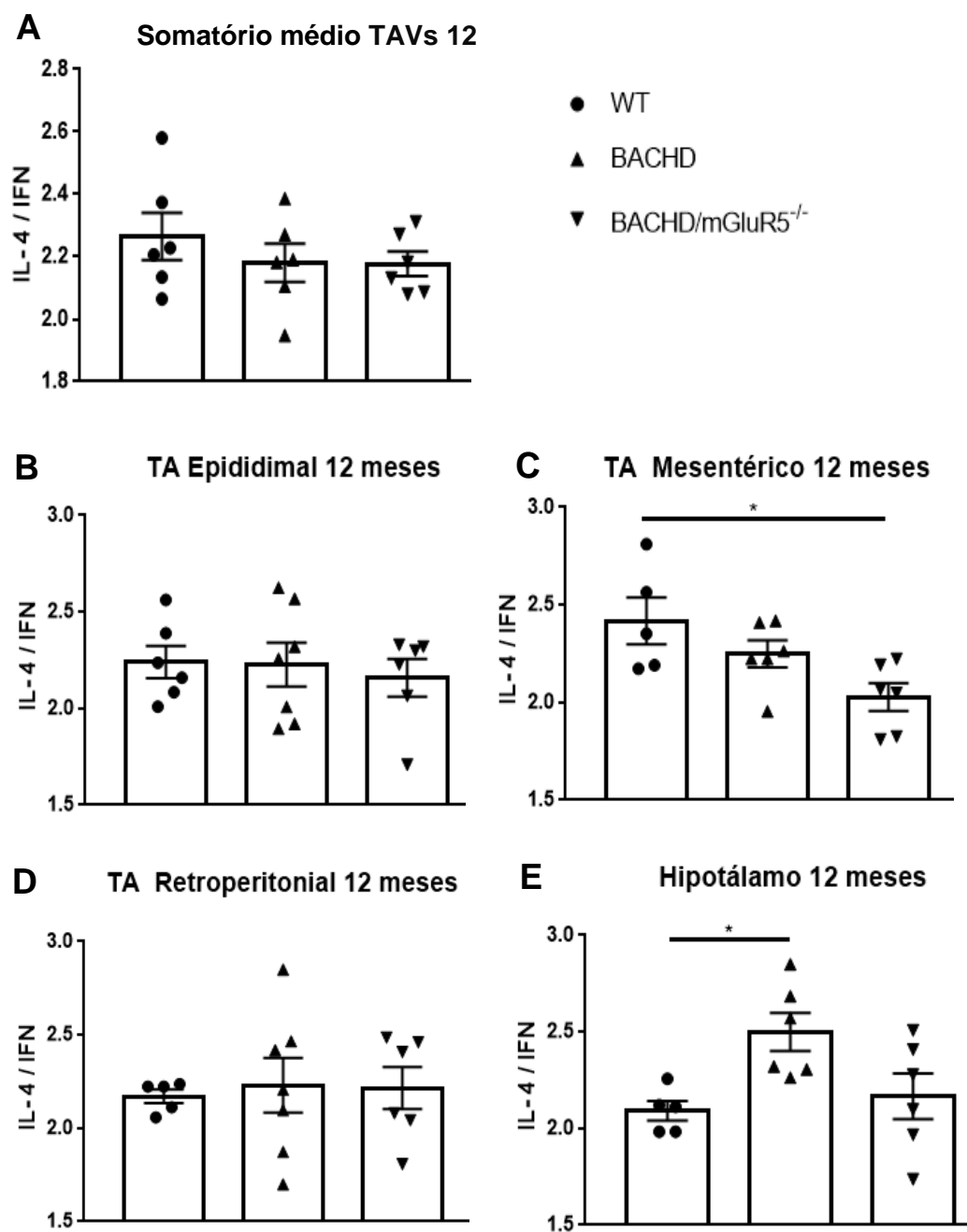
**Figura 26 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam elevação na expressão de IL-17 A nos tecidos analisados aos 12 meses de idade. (A-D) Concentração de IL-17 A no TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos analisados aos 12 meses. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001 (n = 5-7).**

Devido ao fato do grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> ter apresentado um aumento tanto de citocinas pró-inflamatórias quanto de anti-inflamatórias, foi calculado a razão entre IL-4 e IFN e entre IL-10 e TNF. Este cálculo justifica-se pelo fato de IFN inibir a produção de IL-4 em macrófagos, reduzindo assim a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> *naive* em T *helper* tipo 2, que são células com um papel anti-inflamatório em um contexto de obesidade (GAJEWSKI, GOLDWASSER e FITCH, 1988). Do mesmo modo, IL-10 possui ação anti-inflamatória e suprime a produção de TNF (SHMARINA et al., 2001). Foi verificado que não houve diferença na razão IL-4 / IFN entre os genótipos em nenhum dos tecidos analisados ou no somatório médio dos TAVs aos 6 meses (tabela 14). Contudo, aos 12 meses de idade, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou redução na razão IL-4 / IFN quando comparado ao WT no TAM (figura

27 C). Além disso, no hipotálamo os animais BACHD exibiram maior razão IL-4 / IFN que os animais WT (figura 27 E).

**Tabela 14 – Razão IL-4 / IFN no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de idade de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n= 3-4).**

Tecido	Grupos	IL-4 / IFN ± SEM		
Somatório médio TAVs	WT	2,4750 ± 0,15	} p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	2,352 ± 0,11		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,339 ± 0,17		
TAE	WT	2,3800 ± 0,06	} p > 0,99	} p = 0,90
	BACHD	2,4830 ± 0,16		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,1310 ± 0,17		
TAM	WT	2,3940 ± 0,33	} p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	2,1640 ± 0,15		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,2670 ± 0,09		
TAR	WT	2,6000 ± 0,09	} p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	2,498 ± 0,10		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,471 ± 0,28		
Hipotálamo	WT	2,2970 ± 0,09	} p = 0,40	} p > 0,99
	BACHD	2,575 ± 0,17		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,1470 ± 0,07		

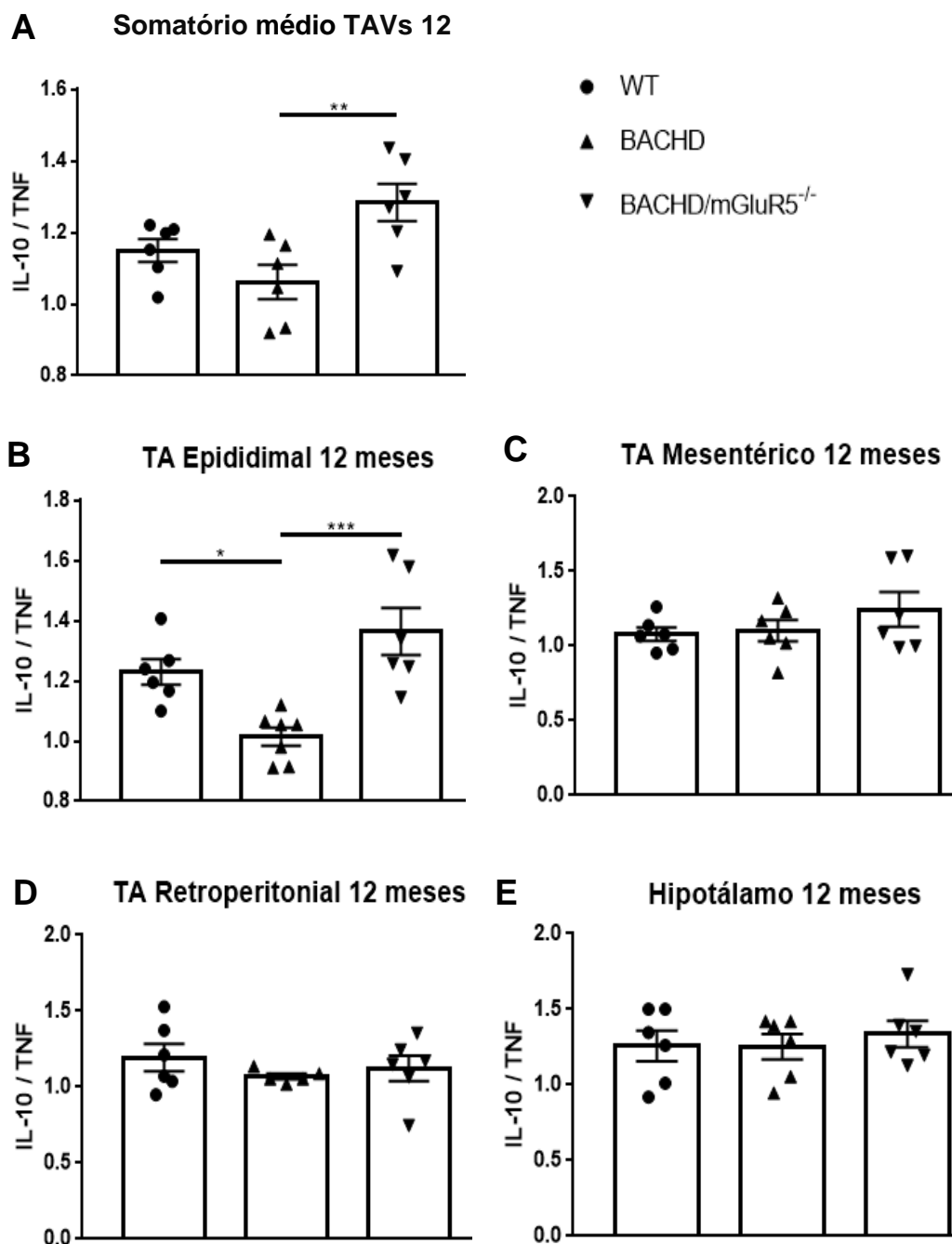


**Figura 27 - Há alteração na razão IL-4 / IFN no grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> e BACHD no TAM e hipotálamo, respectivamente. (A-E) Razão IL-4 / IFN nos TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses de idade. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (n= 5-7).**

Com relação a razão entre IL-10 e TNF, foi observado que aos 6 meses de idade não houve diferença entre os grupos (tabela 14). Entretanto, aos 12 meses foi verificado que no somatório médio dos TAVs, o grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentou maior razão IL-10 / TNF quando comparado ao grupo BACHD (figura 28 A). No TAE, os camundongos BACHD exibiram menor razão entre IL-10 e TNF que os WT, o que foi revertido pela deleção de mGluR5 (figura 28 B).

**Tabela 15 – Razão IL-10 / TNF no TAE, TAM, TAR e hipotálamo aos 6 meses de animais WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Dados representam a média ± SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni (n=3-4).**

Tecido	Grupos	IL-10 / TNF ± SEM		
Somatório médio TAVs	WT	1,7580 ± 0,37	} p = 0,19 } p = 0,13	} p > 0,99
	BACHD	4,7300 ± 0,93		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,0460 ± 0,72		
TAE	WT	0,9601 ± 0,11	} p > 0,99 } p > 0,99	} p = 0,80
	BACHD	1,0310 ± 0,06		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1,1610 ± 0,15		
TAM	WT	3,8210 ± 1,45	} p = 0,40 } p = 0,13	} p > 0,99
	BACHD	9,690 ± 2,84		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	2,7580 ± 0,09		
TAR	WT	1,1400 ± 0,06	} p > 0,99 } p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	1,1990 ± 0,07		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1,146 ± 0,22		
Hipotálamo	WT	1,1990 ± 0,12	} p > 0,99 } p > 0,99	} p > 0,99
	BACHD	1,0830 ± 0,02		
	BACHD/mGluR5 <sup>-/-</sup>	1,208 ± 0,07		



**Figura 28 - Animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibem maior razão IL-10 / TNF no TAE, o que se reflete no somatório médio de TAVs. (A-E) Razão IL-10 / TNF nos TAE, TAM, TAR e hipotálamo dos genótipos WT, BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses. Dados representam a média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni com  $*p < 0,05$  (n= 5-7).**



## 6 DISCUSSÃO

O mGluR5 é amplamente expresso no SNC, inclusive no hipotálamo, uma região importante para a regulação do balanço energético (ROMANO, VAN DEN POL e O'MALLEY, 1996; MINEUR et al., 2011). Além disso, também é expresso em células periféricas como linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B e macrófagos (PACHECO et al., 2004; SHANSHIASHVILI et al., 2017). Diversos estudos têm mostrado a relação desse receptor com a obesidade, uma doença na qual o TA passa a apresentar características de um estado inflamatório crônico de baixo grau (BRADBURY et al., 2005; GIORDANO et al., 2013). Somando-se esses fatores com evidências que demonstraram que o animal BACHD possui um forte fenótipo de obesidade (HULT et al., 2011), decidiu-se realizar um trabalho pioneiro, no qual investigou-se a capacidade de mGluR5 modular parâmetros inflamatórios e de obesidade em animais BACHD.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram, que dentre os genótipos analisados, os animais BACHD foram aqueles que exibiram maior peso corporal no período avaliado de 2 - 12 meses de idade. Esses dados corroboram resultados observados por Van Raamsdonk et al. (2007), Gray et al. (2008) e Hult et al. (2011), nos quais foram evidenciados que animais BACHD apresentavam um aumento do peso corporal quando comparados aos animais WT. Ademais, o presente trabalho demonstrou que a ausência de mGluR5 nos animais BACHD (BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>) tornou o peso corporal dos mesmos estatisticamente igual ao dos animais WT (Figura 11 A-K). Os resultados apresentados neste estudo apoiam evidências já apresentadas por Bradbury et al. (2005) e Gonçalves (2018), nas quais a ausência de mGluR5 ocasionou a redução do ganho de peso corporal. No trabalho supracitado de Bradbury e colaboradores, verificou-se que animais mGluR5<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão *ad libitum* possuíam um menor peso corporal que os animais WT. Em adição, esses autores também demonstraram que a modulação negativa de mGluR5 através de MTEP preveniu o ganho de peso em animais alimentados com dieta rica em gordura. No trabalho supracitado de Gonçalves, realizado no nosso laboratório de pesquisa, verificou-se também que animais mGluR5<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão *ad libitum* possuíam um peso corporal reduzido quando comparado aos WT. Ademais, esse autor observou que um

modulador alostérico negativo de mGluR5 foi capaz de promover redução do ganho de peso corporal em animais alimentados com dieta rica em gordura.

Sobre os resultados de avaliação de adiposidade nos grupos estudados, observou-se que o maior peso corporal de animais BACHD aos 6 meses de idade, foi devido a uma maior adiposidade visceral nestes animais, fato verificado através do somatório médio da quantidade de gordura visceral nos TAE, TAM e TAR (figura 12). Esse resultado refletiu o que ocorreu no TAM e no TAR isoladamente (figuras 15 A e 16 A). Contudo, aos 12 meses de idade não se verificou uma maior adiposidade visceral do grupo BACHD em relação ao WT (figura 13). Assim, uma hipótese para explicar o aumento do peso corporal apresentado pelos animais BACHD em relação aos WT seria um aumento do tecido adiposo subcutâneo, aumento na massa muscular ou óssea destes animais, fatores que não foram avaliados neste trabalho. A diferença de peso entre os grupos WT e BACHD aos 12 meses, pode ainda ter ocorrido devido a um aumento de TAV que não foi detectado devido a erros durante os procedimentos de coleta e pesagem dos tecidos, uma vez que esta metodologia não é a mais exata para avaliação da adiposidade visceral. Entretanto, não se acredita que aos 12 meses de idade, a diferença de peso entre os grupos WT e BACHD seja devido a um aumento de massa muscular ou óssea nos animais BACHD. Isto porque trabalhos na literatura demonstraram que aos 12 meses e em idades posteriores, há uma redução tanto de massa muscular quanto de tecido ósseo nesses animais quando comparados aos WT (JANSSON et al., 2014; CLEMENSSON et al., 2017). Outro fato interessante evidenciado por esses autores é que apesar do peso corporal de animais WT e BACHD não terem diferido ao longo do tempo, a porcentagem de gordura corporal do grupo BACHD foi maior que a do WT. Além disso, os trabalhos supracitados demonstraram que com a idade, a quantidade de TA de animais BACHD aumenta. Assim, possivelmente o aumento do peso corporal no grupo BACHD observado no presente trabalho, se deve a um aumento na adiposidade, seja ela subcutânea ou visceral.

Através deste estudo observou-se que tanto aos 6 quanto aos 12 meses de idade, os camundongos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentaram menor quantidade de gordura visceral que os BACHD e até mesmo que os camundongos WT (figuras 12 e 13). Os dados aqui apresentados corroboram resultados obtidos por Gonçalves (2018), nos quais foi evidenciado que a ausência de mGluR5<sup>-/-</sup> era capaz de promover uma redução da adiposidade visceral em animais alimentados com dieta

hiperlipídica. Esses resultados refletiram o que ocorreu isoladamente nos TAE, TAM e TAR tanto aos 6 (figuras 14 A, 15 A e 16 A) quanto aos 12 meses de idade (figuras 14 B, 15 B e 16 B). Sendo que aos 6 meses a principal contribuição para a diferença entre a adiposidade visceral dos grupos duplo mutante e WT parece ser, principalmente, do TAE, já que nos demais TAVs essa diferença não foi observada.

Bradbury et al. (2005) demonstraram que animais  $mGluR5^{-/-}$  apresentaram menor consumo alimentar que animais WT após um noite de privação alimentar. Em adição esses autores demonstraram que MTEP reduz a eficiência calórica de animais com obesidade induzida por dieta. Ademais, segundo Bradbury et al. (2003) moduladores alostéricos negativos de  $mGluR5$  podem desinibir a liberação de serotonina, um neurotransmissor que induz a redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (HEISLER et al., 2006; LAM et al., 2008; YABUT et al., 2019). Assim, um possível mecanismo para a diminuição do ganho de peso corporal observada em animais BACHD/ $mGluR5^{-/-}$  seria que a ausência de  $mGluR5$  desinibiria a liberação de serotonina, que então atuaria no hipotálamo, reduzindo o consumo alimentar e/ou aumentando o gasto energético.

Sabendo dos efeitos protetores contra a obesidade e DM II promovidos pela ação da adiponectina, decidiu-se investigar a expressão da mesma nos TAVs coletados. O TAE parece ter sido o TAV que mais contribuiu para a concentração de adiponectina nos grupos WT e duplo mutante (figura 17 A). Já no grupo BACHD o TA que mais parece ter contribuído foi o TAR. Esse resultado parece ser contrário ao demonstrado por Mulder et al. (2016). Segundo esses autores a retirada do TAE de animais com obesidade induzida por dieta, não promoveu redução da concentração plasmática de adiponectina, sugerindo que o TAE não é o TAV que mais expressa essa adipocina. Através da figura 17 C, foi observado que aos 12 meses de idade, no TAE, o nível dessa adipocina no grupo BACHD foi menor que no WT, e a deleção de  $mGluR5$  em animais BACHD foi capaz de reverter esse efeito. Este fato poderia contribuir para a redução do ganho de peso corporal exibido pelos animais BACHD/ $mGluR5^{-/-}$  e também para a tendência de redução da gordura visceral no TAE desses animais (figura 14 B). Dados científicos mostram que em seres humanos e em animais com obesidade, os níveis plasmáticos de adiponectina estão reduzidos, em especial naqueles com obesidade visceral (ARITA et al., 1999; YATAGAI et al., 2003). Portanto, a menor expressão dessa adipocina em animais BACHD pode ser mais um indicador de obesidade nos mesmos. Em adição, o

retorno de adiponectina ao mesmo nível do grupo WT nos animais duplo mutantes pode ser mais um indicador da ausência de obesidade nesse grupo. Nas demais regiões analisadas não houve diferença entre os grupos (figura 17 B, D - F). Os resultados deste trabalho evidenciaram que de 6 para 12 meses de idade houve um aumento na concentração de adiponectina no TAE, TAM e TAR em todos os grupos estudados (tabela 4 e figuras 17 B - F). Esta observação é oposta ao trabalho realizado por De Heredia et al. (2009), segundo o qual a expressão de adiponectina estaria reduzida em função da idade. Entretanto, o estudo supracitado utilizou amostras de TAM e TA periovariano, e o mesmo foi realizado com animais de idades entre 14 e 20 meses.

Com relação à leptina, foi observado que o TAE parece ter sido o TAV que mais contribuiu para a concentração dessa adipocina nos grupos investigados (figura 18 A). Essa observação corrobora o que foi demonstrado por Mulder et al. (2016), em que a retirada do TAE de animais alimentados com dieta hiperlipídica promoveu redução da concentração plasmática de leptina. Considerando o fato de que a quantidade circulante de leptina é advinda predominantemente do TA, pode-se inferir, que o TAE é o que mais expressa leptina. Segundo Frederich et al. (1995), a quantidade de massa gorda relaciona-se com a secreção de leptina. Os dados obtidos nesse estudo corroboram com a afirmação supracitada. Os resultados do presente trabalho demonstraram que aos 12 meses de idade, no somatório médio dos TAVs analisados a expressão de leptina nos animais BACHD com ausência de mGluR5 foi menor em relação aos BACHD. Essa diferença na concentração de leptina entre os grupos, provavelmente é reflexo das alterações observadas no TAR e TAM. A concentração de leptina em camundongos BACHD no TAR aumentou quando comparada a dos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> (figura 18 E). No TAM, houve uma tendência a redução dos níveis de leptina no grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> em relação ao BACHD ( $p = 0,083$ ) (figura 18 D). Ademais, tanto no TAR quanto no TAM, a quantidade dessa adipocina no grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> foi ainda menor que no grupo WT (figura 18 C e D). O maior nível de leptina no TAR de animais BACHD em relação ao duplo mutante, assim como a tendência ao aumento desse hormônio no TAM são também evidências de que a adiposidade visceral de animais BACHD no TAM e no TAR é maior que dos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. As figuras (15 B e 16 B) corroboram essa hipótese, pois através delas é possível observar que a adiposidade visceral no TAM e TAR do grupo BACHD é maior que dos BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>. Ainda,

considerando os somatórios médios dos TAVs, a quantidade de leptina no grupo BACHD também foi maior que no BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> aos 12 meses (figura 18 B). Isso seria um indicativo de que o grupo BACHD possui maior quantidade de gordura visceral que o duplo mutante (figura 13). Não bastasse, os resultados obtidos no presente trabalho indicaram também que de 6 para 12 meses de idade, em todos os grupos e tecidos analisados, houve um aumento na concentração de leptina (tabela 5 e figuras 17 B - F). Esta observação corrobora dados obtidos por Oliver, Picó e Palou (2001), segundo os quais a expressão de leptina nos TAVs aumentaria com a idade devido ao aumento da adiposidade do animal. Ao avaliar, os níveis de leptina no hipotálamo verificou-se um aumento da expressão de leptina no grupo BACHD quando comparado ao WT (figura 18 F). Isso também poderia ser um indicativo que animais BACHD podem apresentar resistência hipotalâmica à leptina aos 12 meses, o que causaria desregulação do sistema de melanocortina e, conseqüentemente o aumento de peso corporal observado nesse grupo. Ainda, a ausência de mGluR5 em animais BACHD gerou uma tendência a reversão da concentração de leptina ao nível do grupo WT (figura 18 F).

Sabe-se que a inflamação que ocorre no TA, especialmente no TAV, durante a obesidade contribui para a ocorrência de doenças como RI, DM II, dislipidemia, aterosclerose e DHGNA (KLÖTING et al., 2010; COTILLARD et al., 2014). Considerando ainda que animais BACHD, além de serem obesos, podem apresentar tolerância reduzida à glicose e RI (HULT et al., 2011), torna-se importante investigar se o mGluR5 poderia modular parâmetros inflamatórios em animais BACHD. Caso confirmada, esta hipótese poderia indicar a participação de mGluR5 na promoção de comorbidades associadas a obesidade. Então, a fim de investigar o estado inflamatório dos depósitos de TAV nos grupos de interesse, inicialmente foi calculada a razão entre adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória e leptina, uma pró-inflamatória. É sabido que periféricamente, a adiponectina promove a polarização de macrófagos para um estado predominante anti-inflamatório (MANDAL et al., 2011), e inibe a sinalização de NF- $\kappa$ B (AJUWON e SPURLOCK, 2005), reduzindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, além de induzir a produção de IL-10 (WULSTER-RADCLIFFE et al., 2004). Ademais, observações clínicas e experimentais tem demonstrado a existência de uma forte associação entre baixos níveis de adiponectina, inflamação crônica e obesidade ligada à disfunção metabólica (OLIVEIRA et al., 2013). A leptina, de

forma oposta a adiponectina, estimula a atividade do sistema imunológico, atuando sobre macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T (BANKS et al., 2000; PÉREZ-PÉREZ et al., 2017). Os resultados do presente estudo demonstraram que aos 6 meses de idade, os animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> exibiram uma tendência a apresentar maior razão adiponectina / leptina que os animais BACHD e os WT no TAE (tabela 6). Foi observado também que aos 12 meses de idade, o grupo duplo mutante apresentou uma maior razão adiponectina / leptina no TAE e TAM (figuras 19 B e C). Sendo que isso foi refletido no somatório médio dos TAVs analisados (figura 19 A). Deste modo, essas evidências sugerem que aos 12 meses, os depósitos de TAV do grupo BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentariam um menor estado inflamatório que aqueles observados no grupo BACHD, essa redução na inflamação reduziria o risco de desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade nesses animais. Segundo Frühbeck et al. (2019), a razão sérica de adiponectina / leptina é um bom indicador de inflamação no TA e pode ser um bom estimador do risco cardiometabólico associado à obesidade e à síndrome metabólica. Esses autores corroboram os achados de Veja et al. (2013), os quais observaram que a menor razão sérica de adiponectina / leptina correlacionou-se bem com a presença de RI. Corroboram também evidências demonstradas por Inoue et al. (2005) e Zaletel, Barlovic e Prezelj (2010). Segundo as quais um aumento da razão sérica de adiponectina / leptina se relaciona negativamente com marcadores de inflamação crônica de baixo grau (INOUE et al., 2005) e essa razão diminui com o aumento dos fatores de risco para a síndrome metabólica (ZALETEL, BARLOVIC e PREZELJ, 2010).

Ademais, foi observado na figura 19 E, que animais WT apresentaram maior razão adiponectina / leptina no hipotálamo que animais BACHD. Sugerindo assim, que uma maior razão adiponectina / leptina no hipotálamo seria benéfica ao animal. Essa hipótese corrobora o trabalho de Coope et al. (2008), no qual foi verificado que o tratamento de ratos com adiponectina, via intracerebroventricular, diminuiu em aproximadamente 40% a ingestão alimentar, contribuindo para proteção desses animais contra obesidade. Adicionalmente, dados Qi et al. (2004) demonstraram que a administração intracerebroventricular de adiponectina promoveu redução do ganho de peso corporal, principalmente, através da estimulação do gasto de energia. A redução da razão adiponectina / leptina no hipotálamo de animais BACHD parece ocorrer, principalmente, devido ao aumento de leptina no hipotálamo desse grupo

(figura 18 F), já que não houve diferença na concentração de adiponectina entre os grupos WT e BACHD (figura 17 F). Portanto, pode-se inferir que no hipotálamo, assim como nos TAVs, um ambiente com maior razão de adiponectina / leptina poderia ser um fator protetivo contra as comorbidades associadas à obesidade. Nossos dados também revelaram que a ausência de mGluR5 em animais BACHD não foi capaz de reverter a redução da razão entre adiponectina e leptina no hipotálamo dos animais BACHD.

É sabido que a quantidade tanto de LT CD4<sup>+</sup> quanto de macrófagos presentes no TA está associada de forma positiva ao IMC, e é maior no TAV do que no TAS (WEISBERG et al., 2003; BRUNN et al., 2005; DUFFAUT et al., 2009). Ademais, foi evidenciado que as células T CD4<sup>+</sup> participam do controle da interação entre o sistema imune e depósitos de TA, principalmente o TAB, durante o desenvolvimento da obesidade (ZHAO et al., 2018). Em adição, já foi demonstrada a contribuição de macrófagos pró-inflamatórios para o desencadeamento da inflamação associada à obesidade e suas comorbidades (SHI et al., 2006; PATSOURIS et al., 2008). Aliado ao fato de que mGluR5 é expresso em LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> e em macrófagos (SHANSHIASHVILI et al., 2017; STORTO et al., 2000a), decidiu-se investigar mais profundamente o estado inflamatório dos tecidos analisados utilizando a técnica de CBA para quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias em um contexto de obesidade. Aos 6 meses de idade, houve poucas diferenças estatísticas entre os grupos analisados com relação a expressão das citocinas quantificadas. Ademais, essas diferenças estatísticas não se correlacionaram com as observadas aos 12 meses, idade na qual houve diversas diferenças estatísticas entre os grupos. Aos 12 meses de idade, os animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentaram aumento tanto de citocinas pró-inflamatórias quanto de anti-inflamatórias em relação aos grupos BACHD e WT. Então, foram calculadas as razões: IL-4 / IFN e IL-10 / TNF a fim de verificar qual tipo de citocina predominava nos tecidos em questão. Realizou-se o cálculo da razão entre IL-4 / IFN, pois periféricamente, essas citocinas possuem efeitos antagônicos sobre a inflamação e IL-4 modula a produção de IFN (GAJEWSKI, GOLDWASSER e FITCH, 1988). Em adição, sabe-se que uma menor razão IFN / IL-4, pode indicar uma resposta anti-inflamatória em um contexto de obesidade (de SOUZA et al., 2018; GONG et al., 2018). Através dos resultados foi possível observar que não houve diferença entre os grupos aos 6 meses de idade em nenhum dos tecidos analisados (tabela 14). Aos 12 meses de idade, no TAM o

grupo duplo mutante (BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>) apresentou menor razão IL-4 / IFN que o grupo WT, sugerindo um estado mais pró-inflamatório no TAM de animais duplo mutantes (figura 19 C). Contudo, esse fato não se refletiu no somatório médio dos TAVs ou nos demais tecidos analisados (figuras 27 A, B e D). Já no hipotálamo, animais BACHD exibiram maior razão IL-4 / IFN que os WT (figura 27 E). Contudo é difícil inferir algo sobre este resultado, uma vez que o papel da IL-4 no hipotálamo, em um contexto de obesidade, não está bem elucidado.

Realizou-se ainda o cálculo da razão IL-10 / TNF, uma vez que estas citocinas possuem efeito anti-inflamatório e pró-inflamatório, respectivamente, em indivíduos com obesidade (ROPELLE et al., 2010; THALER et al., 2012; HAM et al., 2013; ALOYSIUS et al., 2018). Ademais, IL-10 suprime a produção de TNF (SHMARINA et al., 2001), e uma maior razão IL-10 / TNF parece indicar um estado anti-inflamatório em um contexto de obesidade (NIKSERESHT et al., 2014; ROCHA-RODRIGUES et al., 2017). Através do presente estudo foi evidenciado que aos 6 meses de idade não ocorreu nenhuma diferença na razão IL-10 / TNF entre os grupos analisados (tabela 15). Entretanto, aos 12 meses de idade no TAE, os camundongos BACHD exibiram menor razão IL-10 / TNF que os animais WT, o que foi revertido na ausência de mGluR5 em animais BACHD (figura 28 B). Sobre a interpretação destes dados, foi postulado que o aumento na razão IL-10 / TNF no TAE do grupo duplo mutante poderia estar sendo promovido pela maior expressão de adiponectina nesse tecido (figura 17 C), já que como supracitado, essa adipocina induz a expressão de IL-10 e reduz a de TNF (WULSTER-RADCLIFFE et al., 2004). Ainda, a maior razão IL-10 / TNF apresentada pelo grupo duplo mutante (BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>) em relação ao BACHD no TAE se refletiu no somatório médio dos TAVs (figura 28 A). Esses dados sugerem que os animais BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> possuem um perfil anti-inflamatório maior que os animais BACHD nos TAVs, em especial no TAE. A maior concentração de IL-10 em comparação a de TNF seria um indicativo de que essa interleucina estaria exercendo um papel regulador homeostático da inflamação no TA, o que geraria então, um efeito protetivo contra disfunções metabólicas e doenças cardiovasculares promovidas pela obesidade (OLIVEIRA et al., 2013). Assim, postulamos a hipótese de que a ausência de mGluR5 em TAV promoveria uma cascata de sinalização anti-inflamatória. Essa hipótese corrobora dados evidenciados por Feng et al. (2018), nos quais DHPG, um modulador positivo de mGluR5 aumentou a ativação do fator de transcrição NF-κB



de células T, promovendo então efeitos pró-inflamatórios, enquanto MPEP gerou um efeito oposto. Essa hipótese, contudo, é oposta aos resultados obtidos por Shanshiashvili et al. (2017), nos quais foi observado que a transfecção de cDNAs de mGluR5 em macrófagos da linhagem RAW-264.7 causou uma maior secreção de IL-10 em comparação ao grupo controle. Os dados do presente estudo concordam com a teoria já estabelecida de que a inflamação no TAV é um evento essencial na patogênese da obesidade (ZHAO et al., 2018). Ademais, os dados deste trabalho confirmam resultados de Storto et al. (2000b, 2004), nos quais foi observado que a regulação negativa de mGluR5 protegeu contra lesão isquêmica no fígado, fato que pode ter ocorrido devido a uma redução da inflamação. Em adição, resultados prévios nosso grupo de pesquisa (GONÇALVES, 2018), evidenciaram que a modulação negativa de mGluR5, foi capaz de promover redução do ganho de peso corporal e dos níveis de citocinas inflamatórias em animais alimentados com dieta rica em gordura. Os resultados apresentados no presente estudo corroboram aqueles encontrados por Gonçalves (2018). Em relação às análises da razão IL-10 / TNF no hipotálamo de animais aos 6 ou 12 meses de idade, não foram encontradas diferenças estatísticas nos grupos estudados. Portanto, é difícil inferir se o ambiente nessa região seria anti ou pró-inflamatório nos períodos avaliado. Assim, mais experimentos são necessários para elucidar se o hipotálamo de animais BACHD e BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam ou não um estado inflamatório. Devido ao fato de aos 6 meses de idade, não ter ocorrido diferença estatística nas razões IL-4 / IFN e IL-10 / TNF entre os grupos analisados, se infere que nessa idade parece não haver diferença entre o estado inflamatório dos TAVs ou do hipotálamo entre os grupos investigados.

## 7 CONCLUSÃO

Concluí-se que a ausência mGluR5 parece reduzir o ganho de peso e a adiposidade visceral em animais BACHD aos 6 e 12 meses, além de promover um ambiente anti-inflamatório nos TAVs aos 12 meses. Fato que pode contribuir para um menor risco cardiometabólico. Ademais, animais BACHD apresentaram maior concentração de leptina no hipotálamo que o grupo WT, o que é um indicativo de RI hipotalâmica, fator importante para o desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades. De forma contrária, animais duplo mutantes (BACHD/mGluR5<sup>-/-</sup>), apresentaram uma tendência a possuírem menor concentração de leptina no hipotálamo, o que é um indicativo de ausência de RI hipotalâmica. É importante salientar que ao investigar parâmetros de obesidade em animais duplo mutantes, este estudo realiza um trabalho pioneiro. Assim, são necessários mais estudos que investiguem a capacidade da modulação negativa ou o nocauteamento de mGluR5 em promover a redução da obesidade e da inflamação.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO, 2016. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fcc403e5da.pdf>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2019.

AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 5, p. R1220-5, May 2005. ISSN 0363-6119. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604306>>.

ALOYSIUS, T. A. et al. Chicken Protein Hydrolysates Have Anti-Inflammatory Effects on High-Fat Diet Induced Obesity in Mice. **Medicines (Basel)**, v. 6, n. 1, Dec 2018. ISSN 2305-6320. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30597839>>.

ALVEHUS, M. et al. The human visceral fat depot has a unique inflammatory profile. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 5, p. 879-83, May 2010. ISSN 1930-739X. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20186138>>.

ANAND, B. K.; BROBECK, J. R. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. **Yale J Biol Med**, v. 24, n. 2, p. 123-40, Nov 1951a. ISSN 0044-0086. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14901884>>.

ANAND, B. K.; BROBECK, J. R. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 77, n. 2, p. 323-4, Jun 1951b. ISSN 0037-9727. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14854036>>.

ANVISA, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/2782895/Nota+t%C3%A9cnica+anorex%C3%ADgeno+s/16367d39-f947-40fe-a89f-65a51b465792>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2019.

ARNOLDUSSEN, I. A.; KILIAAN, A. J.; GUSTAFSON, D. R. Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 12, p. 1982-99, Dec 2014. ISSN 1873-7862. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704273>>.

ARONICA, E. et al. Interleukin-1 beta down-regulates the expression of metabotropic glutamate receptor 5 in cultured human astrocytes. **J Neuroimmunol**, v. 160, n. 1-2, p. 188-94, Mar 2005. ISSN 0165-5728. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710472>>.

BANKS, A. S. et al. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. **J Biol Chem**, v. 275, n. 19, p. 14563-72, May 2000. ISSN 0021-9258. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799542>>.

BAO, W. L. et al. Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 922, n. 2, p. 173-9, Dec 2001. ISSN 0006-8993. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743947>>.

BATES, G. P. et al. Huntington disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15005, 04 2015. ISSN 2056-676X. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27188817>>.

BELUE, R.; FRANCIS, L. A.; COLACO, B. Mental health problems and overweight in a nationally representative sample of adolescents: effects of race and ethnicity. **Pediatrics**, v. 123, n. 2, p. 697-702, Feb 2009. ISSN 1098-4275. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171640>>.

BENOIT, S. C. et al. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. **J Neurosci**, v. 22, n. 20, p. 9048-52, Oct 2002. ISSN 1529-2401. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388611>>.

BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. **Brain Res**, v. 434, n. 3, p. 321-81, Jul 1987. ISSN 0006-8993. Available at: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3300862> >.

BISAGA, A.; DANYSZ, W.; FOLTIN, R. W. Antagonism of glutamatergic NMDA and mGluR5 receptors decreases consumption of food in baboon model of binge-eating disorder. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 11, p. 794-802, Nov 2008. ISSN 0924-977X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573641> >.

BLÜHER, M. et al. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 113, n. 9, p. 534-7, Oct 2005. ISSN 0947-7349. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16235156> >.

BODEN, G. et al. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **J Clin Invest**, v. 93, n. 6, p. 2438-46, Jun 1994. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8200979> >.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **J Neurosci**, v. 24, n. 11, p. 2797-805, Mar 2004. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028773> >.

BRADBURY, M. J. et al. Metabotropic glutamate receptor mGlu5 is a mediator of appetite and energy balance in rats and mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, n. 1, p. 395-402, Apr 2005. ISSN 0022-3565. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590770> >.

BRADBURY, M. J. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist-induced stimulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: interaction with serotonergic systems. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 5, p. 562-72, Apr 2003. ISSN 0028-3908. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668042> >.

BRINKMAN, R. R. et al. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 5, p. 1202-10, May 1997. ISSN 0002-9297. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150168> >.

BRUUN, J. M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 4, p. 2282-9, Apr 2005. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671098> >.

BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res**, v. 11, n. 4, p. 525-31, Apr 2003. ISSN 1071-7323. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690081> >.

BUTOVSKY, O. et al. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Mol Cell Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 381-93, Jul 2005. ISSN 1044-7431. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890528> >.

BYRNES, K. R. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. **Glia**, v. 57, n. 5, p. 550-60, Apr 2009. ISSN 1098-1136. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816644> >.

BYRNES, K. R. et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 improves recovery after spinal cord injury in rodents. **Ann Neurol**, v. 66, n. 1, p. 63-74, Jul 2009. ISSN 1531-8249. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19670441> >.

CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-86, Aug 2005. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046292> >.

CARUSO, C. et al.  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone modulates lipopolysaccharide plus interferon- $\gamma$ -induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression but not tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor expression in cultured hypothalamic neurons. **J Neuroimmunol**, v. 227, n. 1-2, p. 52-9, Oct 2010. ISSN 1872-8421. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619468> >.

CARVALHO, F. M. C. et al. Anti-TNF- $\alpha$  Agent Tamarind Kunitz Trypsin Inhibitor Improves Lipid Profile of Wistar Rats Presenting Dyslipidemia and Diet-induced Obesity Regardless of PPAR- $\gamma$  Induction. **Nutrients**, v. 11, n. 3, Feb 2019. ISSN 2072-6643. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30818882> >.

CHAO, C. C.; MOLITOR, T. W.; HU, S. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. **J Immunol**, v. 151, n. 3, p. 1473-81, Aug 1993. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335941> >.

CHAO, P. T. et al. Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. **Cell Metab**, v. 13, n. 5, p. 573-83, May 2011. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531339> >.

CHEN, H. et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 491-5, Feb 1996. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608603> >.

CHOE, S. S. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 30, 2016. ISSN 1664-2392. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148161> >.

CHOI, S. et al. Effects of chronic fenfluramine administration on hypothalamic neuropeptide mRNA expression. **Brain Res**, v. 1087, n. 1, p. 83-6, May 2006. ISSN 0006-8993. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626640> >.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v. 46, n. 11, p. 2347-55, Nov 2005. ISSN 0022-2275. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150820> >.

CLEMENSSON, E. K. et al. Further investigation of phenotypes and confounding factors of progressive ratio performance and feeding behavior in the BACHD rat model of Huntington disease. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173232, 2017. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28273120> >.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 205-37, 1997. ISSN 0362-1642. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131252> >.

COOPE, A. et al. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. **FEBS Lett**, v. 582, n. 10, p. 1471-6, Apr 2008. ISSN 0014-5793. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18394428> >.

CORPS, K. N.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. **JAMA Neurol**, v. 72, n. 3, p. 355-62, Mar 2015. ISSN 2168-6157. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599342> >.

COSTANZO, A. E. et al. Obesity impairs  $\gamma\delta$  T cell homeostasis and antiviral function in humans. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120918, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25785862> >.

COTILLARD, A. et al. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 8, p. E1466-70, Aug 2014. ISSN 1945-7197. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780048> >.

COWLEY, M. A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the

arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 480-4, May 2001. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373681> >.

CROTTI, A. et al. Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 513-21, Apr 2014. ISSN 1546-1726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24584051> >.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**, v. 360, n. 15, p. 1509-17, Apr 2009. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357406> >.

DAI, L. et al. Macrophage alternative activation confers protection against lipotoxicity-induced cell death. **Mol Metab**, v. 6, n. 10, p. 1186-1197, 10 2017. ISSN 2212-8778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29031719> >.

DE ROSA, V. et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. **Immunity**, v. 26, n. 2, p. 241-55, Feb 2007. ISSN 1074-7613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307705> >.

DE SOUZA, D. C. et al. Effects of High-Intensity Interval and Moderate-Intensity Continuous Exercise on Inflammatory, Leptin, IgA, and Lipid Peroxidation Responses in Obese Males. **Front Physiol**, v. 9, p. 567, 2018. ISSN 1664-042X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29875681> >.

DIFIGLIA, M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science**, v. 277, n. 5334, p. 1990-3, Sep 1997. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302293> >.

DING, S. et al. Enhanced astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. **J Neurosci**, v. 27, n. 40, p. 10674-84, Oct 2007. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913901> >.

DROUIN-OUELLET, J. et al. Neuroinflammation is associated with changes in glial mGluR5 expression and the development of neonatal excitotoxic lesions. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 188-99, Feb 2011. ISSN 1098-1136. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125661> >.

DUFFAUT, C. et al. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 10, p. 1608-14, Oct 2009. ISSN 1524-4636. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644053> >.

DUYAO, M. et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. **Nat Genet**, v. 4, n. 4, p. 387-92, Aug 1993. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401587> >.

EDER, C. Ion channels in microglia (brain macrophages). **Am J Physiol**, v. 275, n. 2 Pt 1, p. C327-42, Aug 1998. ISSN 0002-9513. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688586> >.

ELLACOTT, K. L.; HALATCHEV, I. G.; CONE, R. D. Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3190-5, Jul 2006. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601142> >.

FENG, L. R. et al. mGluR5 mediates post-radiotherapy fatigue development in cancer patients. **Transl Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 110, 05 2018. ISSN 2158-3188. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849049> >.

FERRIGNO, A. et al. Localization and role of metabotropic glutamate receptors subtype 5 in the gastrointestinal tract. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 25, p. 4500-4507, Jul 2017. ISSN 2219-2840. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28740338> >.

FEUERER, M. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells

that affect metabolic parameters. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 930-9, Aug 2009. ISSN 1546-170X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633656> >.

FOLCO, E. J. et al. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. **J Biol Chem**, v. 284, n. 38, p. 25569-75, Sep 2009. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617629> >.

FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med**, v. 1, n. 12, p. 1311-4, Dec 1995. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489415> >.

FRÜHBECK, G. et al. Adiponectin-leptin Ratio is a Functional Biomarker of Adipose Tissue Inflammation. **Nutrients**, v. 11, n. 2, Feb 2019. ISSN 2072-6643. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30813240> >.

FUJIOKA, S. et al. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. **Metabolism**, v. 36, n. 1, p. 54-9, Jan 1987. ISSN 0026-0495. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3796297> >.

FULLER, R. W. Serotonin receptors involved in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats. **Behav Brain Res**, v. 73, n. 1-2, p. 215-9, 1996. ISSN 0166-4328. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788505> >.

GABERY, S. et al. Changes in key hypothalamic neuropeptide populations in Huntington disease revealed by neuropathological analyses. **Acta Neuropathol**, v. 120, n. 6, p. 777-88, Dec 2010. ISSN 1432-0533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20821223> >.

GAJEWSKI T. F., FITCH F. W. Anti-proliferative effect of IFN $\gamma$  in immune regulation. I. IFN $\gamma$  inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4245-4252, 1988.

GILL, S.; BARKER, M.; PULIDO, O. Neuroexcitatory targets in the female reproductive system of the nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). **Toxicol Pathol**, v. 36, n. 3, p. 478-84, Apr 2008. ISSN 1533-1601. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413787> >.

GIORDANO, A. et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. **J Lipid Res**, v. 54, n. 9, p. 2423-36, Sep 2013. ISSN 1539-7262. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836106> >.

GONÇALVES, B. D. C. Modulação negativa do receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 como possível tratamento da obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL/6J. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GONG, P. et al. Association between Th1/Th2 immune imbalance and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol**, v. 34, n. 8, p. 709-714, Aug 2018. ISSN 1473-0766. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29447491> >.

GRAY, M. et al. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. **J Neurosci**, v. 28, n. 24, p. 6182-95, Jun 2008. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550760> >.

GUARD, D. B. et al. NMDA NR2 receptors participate in CCK-induced reduction of food intake and hindbrain neuronal activation. **Brain Res**, v. 1266, p. 37-44, Apr 2009. ISSN 1872-6240. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232331> >.

GUO, Z. et al. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK/STAT3 and mitochondrial stabilization. **J Biol Chem**, v. 283, n. 3, p. 1754-63, Jan 2008. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993459> >.

GWAK, Y. S.; HULSEBOSCH, C. E. Upregulation of Group I metabotropic glutamate receptors in neurons and astrocytes in the dorsal horn following spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 195, n. 1, p. 236-43, Sep 2005. ISSN 0014-4886. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16004983> >.

HAAS, P. et al. Peripheral but not central leptin treatment increases numbers of circulating NK cells, granulocytes and specific monocyte subpopulations in non-endotoxaemic lean and obese LEW-rats. **Regul Pept**, v. 151, n. 1-3, p. 26-34, Nov 2008. ISSN 0167-0115. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556075> >.

HAASS-KOFFLER, C. L. et al. A Phase I randomized clinical trial testing the safety, tolerability and preliminary pharmacokinetics of the mGluR5 negative allosteric modulator GET 73 following single and repeated doses in healthy volunteers. **Eur J Pharm Sci**, v. 109, p. 78-85, Nov 2017. ISSN 1879-0720. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778464> >.

HAM, M. et al. Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 12, p. 2425-35, Jun 2013. ISSN 1098-5549. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572562> >.

HEISLER, L. K. et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 609-11, Jul 2002. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142539> >.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**, v. 51, n. 2, p. 239-49, Jul 2006. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16846858> >.

HOLLMANN, M. et al. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. **Nature**, v. 342, n. 6250, p. 643-8, Dec 1989. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2480522> >.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-8, Feb 1996. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571133> >.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1993. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183> >.

HOTTA, K. et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 6, p. 1595-9, Jun 2000. ISSN 1079-5642. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845877> >.

HULT, S. et al. Hypothalamic and neuroendocrine changes in Huntington's disease. **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 10, p. 1237-49, Oct 2010. ISSN 1873-5592. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594177> >.

HULT, S. et al. Mutant huntingtin causes metabolic imbalance by disruption of hypothalamic neurocircuits. **Cell Metab**, v. 13, n. 4, p. 428-439, Apr 2011. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459327> >.

HUO, L. et al. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. **Cell Metab**, v. 9, n. 6, p. 537-47, Jun 2009. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490908> >.

HÄRTL, R. et al. Early white blood cell dynamics after traumatic brain injury: effects on the cerebral microcirculation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 17, n. 11, p. 1210-20, Nov 1997. ISSN 0271-678X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390653> >.

INOUE, M. et al. Correlation between the adiponectin-leptin ratio and parameters of insulin resistance



in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v. 54, n. 3, p. 281-6, Mar 2005. ISSN 0026-0495. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15736103> >.

JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. **Scand J Immunol**, v. 74, n. 1, p. 1-13, Jul 2011. ISSN 1365-3083. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21338381> >.

JAIS, A.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1, p. 24-32, 01 2017. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045396> >.

JANSSON, E. K. et al. Reduced motivation in the BACHD rat model of Huntington disease is dependent on the choice of food deprivation strategy. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105662, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144554> >.

JONG, Y. J. et al. Location-dependent signaling of the group 1 metabotropic glutamate receptor mGlu5. **Mol Pharmacol**, v. 86, n. 6, p. 774-85, Dec 2014. ISSN 1521-0111. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25326002> >.

KANETY, H. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J Biol Chem**, v. 270, n. 40, p. 23780-4, Oct 1995. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559552> >.

KANG, K. et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. **Cell Metab**, v. 7, n. 6, p. 485-95, Jun 2008. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522830> >.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441-9, Oct 2011. ISSN 1939-327X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948998> >.

KASS, A. E. et al. Secretive eating among youth with overweight or obesity. **Appetite**, v. 114, p. 275-281, 07 2017. ISSN 1095-8304. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28365476> >.

KELLEY, A. E. et al. Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. **Physiol Behav**, v. 76, n. 3, p. 365-77, Jul 2002. ISSN 0031-9384. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117573> >.

KELLEY, A. E.; BERRIDGE, K. C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **J Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 3306-11, May 2002. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978804> >.

KIM, H. J. et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1060-7, Apr 2004. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047622> >.

KINTSCHER, U. et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 7, p. 1304-10, Jul 2008. ISSN 1524-4636. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420999> >.

KITAMURA, T. et al. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. **Nat Med**, v. 12, n. 5, p. 534-40, May 2006. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16604086> >.

KLÖTING, N. et al. Insulin-sensitive obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 3, p. E506-15, Sep 2010. ISSN 1522-1555. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570822> >.

KOLOTKIN, R. L.; ANDERSEN, J. R. A systematic review of reviews: exploring the relationship

between obesity, weight loss and health-related quality of life. **Clin Obes**, v. 7, n. 5, p. 273-289, Oct 2017. ISSN 1758-8111. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28695722> >.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nat Rev Endocrinol**, v. 12, n. 1, p. 15-28, Jan 2016. ISSN 1759-5037. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553134> >.

LALIĆ, N. M. et al. Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion. **Arch Neurol**, v. 65, n. 4, p. 476-80, Apr 2008. ISSN 1538-3687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413469> >.

LAM, D. D. et al. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1323-8, Mar 2008. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039773> >.

LEA, P. M.; MOVSESYAN, V. A.; FADEN, A. I. Neuroprotective activity of the mGluR5 antagonists MPEP and MTEP against acute excitotoxicity differs and does not reflect actions at mGluR5 receptors. **Br J Pharmacol**, v. 145, n. 4, p. 527-34, Jun 2005. ISSN 0007-1188. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821750> >.

LEE, F. Y. et al. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice. **Am J Physiol**, v. 276, n. 2 Pt 1, p. C386-94, Feb 1999. ISSN 0002-9513. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950766> >.

LEIBOWITZ, S. F.; HAMMER, N. J.; CHANG, K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. **Physiol Behav**, v. 27, n. 6, p. 1031-40, Dec 1981. ISSN 0031-9384. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7335803> >.

LI, B. et al. Peripheral metabotropic glutamate receptor subtype 5 contributes to inflammation-induced hypersensitivity of the rat temporomandibular joint. **J Mol Neurosci**, v. 51, n. 3, p. 710-8, Nov 2013. ISSN 1559-1166. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23807708> >.

LIU, M. G. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 contributes to inflammatory tongue pain via extracellular signal-regulated kinase signaling in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 258, Nov 2012. ISSN 1742-2094. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181395> >.

LIU, Q. et al. Interleukin-17 inhibits adult hippocampal neurogenesis. **Sci Rep**, v. 4, p. 7554, Dec 2014. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25523081> >.

LIU, Y. W. et al. Transplantation with mGluR5 deficiency bone marrow displays antidepressant-like effect in C57BL/6J mice. **Brain Behav Immun**, Jan 2019. ISSN 1090-2139. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30682501> >.

LO, C. K. et al. Leptin signaling protects NK cells from apoptosis during development in mouse bone marrow. **Cell Mol Immunol**, v. 6, n. 5, p. 353-60, Oct 2009. ISSN 2042-0226. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19887048> >.

LOANE, D. J.; STOICA, B. A.; FADEN, A. I. Metabotropic glutamate receptor-mediated signaling in neuroglia. **Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal**, v. 1, n. 2, p. 136-150, Mar 2012. ISSN 2190-460X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22662309> >.

LOFFREDA, S. et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB J**, v. 12, n. 1, p. 57-65, Jan 1998. ISSN 0892-6638. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438411> >.

LOIS, C. et al. Neuroinflammation in Huntington's Disease: New Insights with. **ACS Chem Neurosci**, v. 9, n. 11, p. 2563-2571, Nov 2018. ISSN 1948-7193. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29719953> >.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue

macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84, Jan 2007. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200717> >.

LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 683-5, Oct 2005. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254186> >.

MACDONALD, M. E. et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 971-983, 1993

MAFFEI, M. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat Med**, v. 1, n. 11, p. 1155-61, Nov 1995. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584987> >.

MANDAL, P. et al. Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. **J Biol Chem**, v. 286, n. 15, p. 13460-9, Apr 2011. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357416> >.

MANDAL, P. et al. Adiponectin and heme oxygenase-1 suppress TLR4/MyD88-independent signaling in rat Kupffer cells and in mice after chronic ethanol exposure. **J Immunol**, v. 185, n. 8, p. 4928-37, Oct 2010. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861358> >.

MARDER, K. et al. Dietary intake in adults at risk for Huntington disease: analysis of PHAROS research participants. **Neurology**, v. 73, n. 5, p. 385-92, Aug 2009. ISSN 1526-632X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652143> >.

MARTIN, J. F. et al. An IL-2 paradox: blocking CD25 on T cells induces IL-2-driven activation of CD56(bright) NK cells. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 1311-20, Jul 2010. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543101> >.

MCPHEE, J. B.; SCHERTZER, J. D. Immunometabolism of obesity and diabetes: microbiota link compartmentalized immunity in the gut to metabolic tissue inflammation. **Clin Sci (Lond)**, v. 129, n. 12, p. 1083-96, Dec 2015. ISSN 1470-8736. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464517> >.

MINEUR, Y. S. et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1330-2, Jun 2011. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659607> >.

MINOKOSHI, Y. et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 339-43, Jan 2002. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797013> >.

MIYAZAKI, T. Two distinct steps during thymocyte maturation from CD4-CD8- to CD4+CD8+ distinguished in the early growth response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene-deficient background. **J Exp Med**, v. 186, n. 6, p. 877-85, Sep 1997. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9294142> >.

MORAES-VIEIRA, P. M. et al. Leptin deficiency impairs maturation of dendritic cells and enhances induction of regulatory T and Th17 cells. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 3, p. 794-806, Mar 2014. ISSN 1521-4141. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271843> >.

MORAN, M. M. et al. Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. **J Neurosci**, v. 25, n. 27, p. 6389-93, Jul 2005. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000629> >.

MORINAGA, H. et al. Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1120-30, Apr 2015. ISSN 1939-327X. Available at: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315009> >.

MULDER, P. et al. Surgical removal of inflamed epididymal white adipose tissue attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in obesity. **Int J Obes (Lond)**, v. 40, n. 4, p. 675-84, Apr 2016. ISSN 1476-5497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499443> >.

MUNDER, M. et al. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3771-7, Oct 1999. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490974> >.

MÜNZBERG, H.; FLIER, J. S.; BJØRBAEK, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4880-9, Nov 2004. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271881> >.

NAKAMURA, E. et al. New frontiers in gut nutrient sensor research: luminal glutamate-sensing cells in rat gastric mucosa. **J Pharmacol Sci**, v. 112, n. 1, p. 13-8, 2010. ISSN 1347-8648. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093783> >.

Nasser Y. et al. Expression of a functional metabotropic glutamate receptor 5 on enteric glia is altered in states of inflammation. **Glia** 2007; 55: 859-872 [PMID: 17405149 DOI: 10.1002/glia.20507]

NICOLETTI, F. et al. Metabotropic glutamate receptors: beyond the regulation of synaptic transmission. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32 Suppl 1, p. S40-5, Aug 2007. ISSN 0306-4530. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651904> >.

NIKSERESHT, M. et al. Effects of nonlinear resistance and aerobic interval training on cytokines and insulin resistance in sedentary men who are obese. **J Strength Cond Res**, v. 28, n. 9, p. 2560-8, Sep 2014. ISSN 1533-4287. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662224> >.

O'BRIEN, P. D. et al. Neurological consequences of obesity. **Lancet Neurol**, v. 16, n. 6, p. 465-477, 06 2017. ISSN 1474-4465. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28504110> >.

ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 275-97, 2011. ISSN 1553-4014. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034223> >.

OH-I, S. et al. Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 1, p. E47-53, Jul 2010. ISSN 1522-1555. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371733> >.

OLIVE, M. F. Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. **Curr Drug Abuse Rev**, v. 2, n. 1, p. 83-98, Jan 2009. ISSN 1874-4745. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630739> >.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013. ISSN 1930-739X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696431> >.

OLLMANN, M. M. et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 135-8, Oct 1997. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311920> >.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252989> >.

PACHECO, R. et al. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 32, p. 33352-8, Aug 2004. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184389> >.

PACHECO, R. et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. **J**

**Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6695-704, Nov 2006. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082582> >.

PAPATHANASSOGLU, E. et al. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. **J Immunol**, v. 176, n. 12, p. 7745-52, Jun 2006. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751422> >.

PARK, K. W. et al. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 3, p. 397-402, Aug 2005. ISSN 0360-4012. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948189> >.

PATSOURIS, D. et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. **Cell Metab**, v. 8, n. 4, p. 301-9, Oct 2008. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840360> >.

PAULI, J. R. et al. [New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 4, p. 399-408, Jun 2009. ISSN 1677-9487. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649376> >.

PELLEYMOUNTER, M. A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 540-3, Jul 1995. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624776> >.

PERNA, V. et al. Effective treatment of pulmonary tuberculosis restores plasma leptin levels. **Eur Cytokine Netw**, v. 24, n. 4, p. 157-61, 2013 Oct-Dec 2013. ISSN 1952-4005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589429> >.

PLOJ, K. et al. The metabotropic glutamate mGluR5 receptor agonist CHPG stimulates food intake. **Neuroreport**, v. 21, n. 10, p. 704-8, Jul 2010. ISSN 1473-558X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505551> >.

POSEY, K. A. et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1003-12, May 2009. ISSN 0193-1849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19116375> >.

PÉREZ DE HEREDIA, F. et al. Adiponectin is associated with serum and adipose tissue fatty acid composition in rats. **J Endocrinol Invest**, v. 32, n. 8, p. 659-65, Sep 2009. ISSN 1720-8386. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474526> >.

PÉREZ-PÉREZ, A. et al. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 35, p. 71-84, Jun 2017. ISSN 1879-0305. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28285098> >.

QI, Y. et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. **Nat Med**, v. 10, n. 5, p. 524-9, May 2004. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077108> >.

REINER, A.; DRAGATIS, I.; DIETRICH, P. Genetics and neuropathology of Huntington's disease. **Int Rev Neurobiol**, v. 98, p. 325-72, 2011. ISSN 2162-5514. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907094> >.

REZZANI, R. et al. Cyclosporine-A treatment inhibits the expression of metabotropic glutamate receptors in rat thymus. **Acta Histochem**, v. 105, n. 1, p. 81-7, 2003. ISSN 0065-1281. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12666991> >.

RIBEIRO, F. M. et al. Animal models of neurodegenerative diseases. **Braz J Psychiatry**, v. 35 Suppl 2, p. S82-91, 2013. ISSN 1809-452X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271230> >.

RICARDO-GONZALEZ, R. R. et al. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism

and insulin sensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 52, p. 22617-22, Dec 2010. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149710> >.

ROCHA, V. Z. et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. **Circ Res**, v. 103, n. 5, p. 467-76, Aug 2008. ISSN 1524-4571. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18658050> >.

ROCHA-RODRIGUES, S. et al. Impact of physical exercise on visceral adipose tissue fatty acid profile and inflammation in response to a high-fat diet regimen. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 87, p. 114-124, 06 2017. ISSN 1878-5875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438715> >.

ROH, E.; SONG, D. K.; KIM, M. S. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. **Exp Mol Med**, v. 48, p. e216, 03 2016. ISSN 2092-6413. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26964832> >.

ROMANO, C. et al. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 355, n. 3, p. 455-69, May 1995. ISSN 0021-9967. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636025> >.

ROMANO, C.; VAN DEN POL, A. N.; O'MALLEY, K. L. Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. **J Comp Neurol**, v. 367, n. 3, p. 403-12, Apr 1996. ISSN 0021-9967. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698900> >.

ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, Aug 2010. ISSN 1545-7885. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808781> >.

ROSAS, H. D. et al. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. **Neurology**, v. 60, n. 10, p. 1615-20, May 2003. ISSN 1526-632X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771251> >.

ROSS, C. A.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 1, p. 83-98, Jan 2011. ISSN 1474-4465. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163446> >.

RUTKOWSKI, J. M.; STERN, J. H.; SCHERER, P. E. The cell biology of fat expansion. **J Cell Biol**, v. 208, n. 5, p. 501-12, Mar 2015. ISSN 1540-8140. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25733711> >.

SATOH, N. et al. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. **Neurosci Lett**, v. 224, n. 3, p. 149-52, Mar 1997. ISSN 0304-3940. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131658> >.

SATTAR, N. et al. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. **Circulation**, v. 114, n. 7, p. 623-9, Aug 2006. ISSN 1524-4539. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16894037> >.

SCHERER, T. et al. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. **Cell Metab**, v. 13, n. 2, p. 183-94, Feb 2011. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284985> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. **Diabetes**, v. 46, n. 12, p. 2119-23, Dec 1997. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9392508> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 2000. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766253> >.

SEO, T. et al. Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell

surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 39, p. 30355-62, Sep 2000. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896681> >.

SHANSHIASHVILI, L. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 may be involved in macrophage plasticity. **Biol Res**, v. 50, n. 1, p. 4, Feb 2017. ISSN 0717-6287. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28196513> >.

SHE, P. et al. Molecular characterization of skeletal muscle atrophy in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 1, p. E49-61, Jul 2011. ISSN 1522-1555. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505144> >.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 11, p. 3015-25, Nov 2006. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053832> >.

SHIGEMOTO, R. et al. Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. **Nature**, v. 381, n. 6582, p. 523-5, Jun 1996. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8632825> >.

SHIGEMOTO, R. et al. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. **Neurosci Lett**, v. 163, n. 1, p. 53-7, Nov 1993. ISSN 0304-3940. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295733> >.

SHIMIZU, N. et al. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. **Brain Res**, v. 416, n. 1, p. 153-6, Jul 1987. ISSN 0006-8993. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3476178> >.

SHMARINA, G. V. et al. Tumor necrosis factor-alpha/interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 4, p. 191-7, Aug 2001. ISSN 0962-9351. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577995> >.

SIMCOCKS, A. et al. Atypical cannabinoid ligands O-1602 and O-1918 administered chronically in diet-induced obesity. **Endocr Connect**, Feb 2019. ISSN 2049-3614. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30707678> >.

SLASSI, A. et al. Recent advances in non-competitive mGlu5 receptor antagonists and their potential therapeutic applications. **Curr Top Med Chem**, v. 5, n. 9, p. 897-911, 2005. ISSN 1568-0266. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16178734> >.

STEPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307-12, Jan 2001. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201732> >.

STORTO, M. et al. Mouse hepatocytes lacking mGlu5 metabotropic glutamate receptors are less sensitive to hypoxic damage. **Eur J Pharmacol**, v. 497, n. 1, p. 25-7, Aug 2004. ISSN 0014-2999. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321731> >.

STORTO, M. et al. Insulin secretion is controlled by mGlu5 metabotropic glutamate receptors. **Mol Pharmacol**, v. 69, n. 4, p. 1234-41, Apr 2006. ISSN 0026-895X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424079> >.

STORTO, M. et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells. **J Neuroimmunol**, v. 109, n. 2, p. 112-20, Sep 2000a. ISSN 0165-5728. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996213> >.

STORTO, M. et al. Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors protects rat hepatocytes against hypoxic damage. **Hepatology**, v. 31, n. 3, p. 649-55, Mar 2000b. ISSN 0270-9139. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706555> >.

STORTO, M. et al. Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective

against acetaminophen hepatotoxicity in mice. **J Hepatol**, v. 38, n. 2, p. 179-87, Feb 2003. ISSN 0168-8278. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12547406> >.

STORTO, M. et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis. **J Endocrinol**, v. 170, n. 1, p. 71-8, Jul 2001. ISSN 0022-0795. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431139> >.

SUGANAMI, T. et al. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 354, n. 1, p. 45-9, Mar 2007. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210129> >.

SUYAMA, S. et al. Glucose level determines excitatory or inhibitory effects of adiponectin on arcuate POMC neuron activity and feeding. **Sci Rep**, v. 6, p. 30796, 08 2016. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27503800> >.

SZCZEPANIK, A. M. et al. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. **J Neuroimmunol**, v. 113, n. 1, p. 49-62, Feb 2001. ISSN 0165-5728. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137576> >.

THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 153-62, Jan 2012. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201683> >.

TIAN, Z. et al. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, n. 3, p. 297-302, Nov 2002. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413939> >.

TILLEUX, S.; BERGER, J.; HERMANS, E. Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. **J Neuroimmunol**, v. 189, n. 1-2, p. 23-30, Sep 2007. ISSN 0165-5728. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628702> >.

TREJO, A. et al. Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 192-6, Feb 2004a. ISSN 0899-9007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962685> >.

UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610-4, Oct 1997. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9335502> >.

VALDEARCOS, M. et al. Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. **Cell Metab**, v. 26, n. 1, p. 185-197.e3, Jul 2017. ISSN 1932-7420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28683286> >.

VALDEARCOS, M. et al. Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. **Cell Rep**, v. 9, n. 6, p. 2124-38, Dec 2014. ISSN 2211-1247. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497089> >.

VAN RAAMSDONK, J. M. et al. Body weight is modulated by levels of full-length huntingtin. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 9, p. 1513-23, May 2006. ISSN 0964-6906. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16571604> >.

VAN STIJN, C. M. et al. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. **FASEB J**, v. 29, n. 2, p. 636-49, Feb 2015. ISSN 1530-6860. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25392268> >.

VAN WAMELEN, D. J. et al. Hypothalamic alterations in Huntington's disease patients: comparison with genetic rodent models. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 11, p. 761-75, Nov 2014. ISSN 1365-2826.



Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25074766> >.

VEGA, G. L.; GRUNDY, S. M. Metabolic risk susceptibility in men is partially related to adiponectin/leptin ratio. **J Obes**, v. 2013, p. 409679, 2013. ISSN 2090-0716. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533722> >.

VISSER, M. et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA**, v. 282, n. 22, p. 2131-5, Dec 1999. ISSN 0098-7484. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591334> >.

VITALI, A. et al. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. **J Lipid Res**, v. 53, n. 4, p. 619-29, Apr 2012. ISSN 1539-7262. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271685> >.

VON HÖRSTEN, S. et al. Transgenic rat model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 6, p. 617-24, Mar 2003. ISSN 0964-6906. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620967> >.

VONSATTEL, J. P. et al. Neuropathological classification of Huntington's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 44, n. 6, p. 559-77, Nov 1985. ISSN 0022-3069. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2932539> >.

WEATHERILL, A. R. et al. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. **J Immunol**, v. 174, n. 9, p. 5390-7, May 2005. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843537> >.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679176> >.

WENSVEEN, F. M. et al. The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 9, p. 2446-56, Sep 2015. ISSN 1521-4141. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220361> >.

WEYDT, P. et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. **Cell Metab**, v. 4, n. 5, p. 349-62, Nov 2006. ISSN 1550-4131. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055784> >.

WHO. Body mass index – BMI. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

WHO. Obesity and overweight , 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

WILLIAMS, E. P. et al. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **Curr Obes Rep**, v. 4, n. 3, p. 363-70, Sep 2015. ISSN 2162-4968. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627494> >.

WINER, S. et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 921-9, Aug 2009. ISSN 1546-170X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633657> >.

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, n. 6026, p. 243-7, Apr 2011. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436399> >.

WULSTER-RADCLIFFE, M. C. et al. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 3, p. 924-9, Apr 2004. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033490> >.

XIONG, J.; ARMATO, M. A.; YANKEE, T. M. Immature single-positive CD8<sup>+</sup> thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. **Int Immunol**, v. 23, n. 1, p. 55-64, Jan 2011. ISSN 1460-2377. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148236> >.

YABUT, J. M. et al. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. **Endocr Rev**, Mar 2019. ISSN 1945-7189. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30901029> >.

YAMAUCHI, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762-9, Jun 2003. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802337> >.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1288-95, Nov 2002. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368907> >.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 941-6, Aug 2001. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479627> >.

YANG, T. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 deficiency inhibits neutrophil infiltration after traumatic brain injury in mice. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9998, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28855570> >.

YANG, XW; GRAY, M. Mouse Models for Validating Preclinical Candidates for Huntington's Disease. In *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. New York: CRC Press, 2011. p. 165-193

YASUDA T. et al. Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. **Exp Biol Med (Maywood)** (2004) 229:235–9.

YATAGAI, T. et al. Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 52, n. 10, p. 1274-8, Oct 2003. ISSN 0026-0495. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14564678> >.

YOON, M. J. et al. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2562-70, Sep 2006. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936205> >.

YU, R. et al. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 8, p. 1353-62, Aug 2006. ISSN 1930-7381. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988077> >.

YU-TAEGER, L. et al. A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. **J Neurosci**, v. 32, n. 44, p. 15426-38, Oct 2012. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115180> >.

ZALETEL, J.; BARLOVIC, D. P.; PREZELJ, J. Adiponectin-leptin ratio: a useful estimate of insulin resistance in patients with Type 2 diabetes. **J Endocrinol Invest**, v. 33, n. 8, p. 514-8, Sep 2010. ISSN 1720-8386. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20142631> >.

ZHAO, Y. et al. CD4. **Cell Immunol**, v. 332, p. 1-6, Oct 2018. ISSN 1090-2163. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30146083> >.