

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

Renata Lacerda de Lima

PAPEL DE CCL2 NA ADIPOSIDADE E INTOLERÂNCIA À GLICOSE
INDUZIDOS EM CAMUNDONGOS POR DIETA NORMOCALÓRICA/RICA EM
CARBOIDRATOS REFINADOS

BELO HORIZONTE

2011

Renata Lacerda de Lima

PAPEL DE CCL2 NA ADIPOSIDADE E INTOLERÂNCIA À GLICOSE
INDUZIDOS EM CAMUNDONGOS POR DIETA NORMOCALÓRICA/RICA EM
CARBOIDRATOS REFINADOS

Dissertação de mestrado defendida no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Danielle da Glória de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Adaliene Versiani M. Ferreira

BELO HORIZONTE

2011

Dedico esse estudo à minha família que tanto amo!

À minha mãe, Ana Maria, ao meu pai Gilmar, aos meus irmãos Cláudio e Jonathan, e ao Marcelo. O incentivo e a compreensão de vocês proporcionaram a realização de mais esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à professora Adaliene Versiani M Ferreira. Dada, obrigada por me ajudar a entrar no mundo científico e me incentivar a cada dia aprender mais e mais... Obrigada pela orientação constante ao longo desse trabalho e por ser exemplo de profissional competente e dedicada.

Agradeço imensamente à professora Danielle da Glória de Souza por me receber no laboratório com tanto carinho e alegria, pela amizade, por confiar em mim, pela orientação nesse estudo estando presente sempre, mesmo que fisicamente distante! Pelo exemplo de liderança, determinação e dedicação à pesquisa.

À Zélia por compartilhar seus conhecimentos, por todos os inúmeros dias de bancada e pela amizade, muito obrigada!

Agradeço à Milene e à Marina pela ajuda nos experimentos e a todo o grupo Metabolismo pelos momentos de discussão e aprendizado científico.

Agradeço à Raquel por todas as discussões enriquecedoras e pela disponibilidade em ajudar sempre. E a todos os colegas do LIMHO que tornam o ambiente de trabalho agradável e sempre produtivo.

Agradeço a todo o grupo Imunofar, e principalmente ao professor Mauro Teixeira pelas orientações durante o andamento do estudo.

Agradeço aos amigos do programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, colegas, funcionários e professores.

Aos amigos externos ao ICB, que me fortalecem a cada palavra de amizade. E principalmente à panelinha pela amizade apesar da “carochada” constante.

Agradeço, infinitamente, à minha família. À minha mãe, Ana Maria, pelo amor e dedicação, e ao meu pai, Gilmar, por me ensinar a ser cada vez mais forte, a correr atrás dos meus objetivos encarando os problemas de frente sem fraquejar. Ao meu irmão Cláudio e à cunhada Juliete pelo companheirismo e por sempre acreditarem no meu potencial. Ao meu irmão Jonathan, pela pureza e por cada gargalhada compartilhada! Agradeço especialmente ao Marcelo, pelo carinho, compreensão e respeito as minhas escolhas. E por cada momento único de felicidade que passamos juntos!

À toda a minha família, avós, tios e primos, que apesar de não entenderem bem o que faço se orgulham e torcem sempre por mim.

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui, abençoando e iluminando os meus caminhos!

Agradeço às professoras Leida Maria Botion e Denise Carmona Cara Machado por aceitarem participar da banca examinadora e possibilitarem o aprimoramento desse estudo.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo suporte financeiro. E ao professor Angelo Guglielmotti por fornecer o Bindarit.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento científico. Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Secreção de moléculas inflamatórias e influxo de macrófagos induzido pela hipertrofia dos adipócitos e expansão do tecido adiposo.....	44
Figura 2: Avaliação do consumo alimentar e variação no peso corporal nos diferentes grupos alimentados durante três dias com dieta controle ou dieta HC e tratados ou não com o Bindarit.....	46
Figura 3: Biometria de três tecidos adiposos intraperitoniais de animais alimentados por três dias com dieta controle ou dieta HC e tratados ou não com o Bindarit.....	46
Figura 4: Concentração de mediadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal de animais alimentados por três dias com dieta controle ou dieta HC associada ou não a diferentes doses de Bindarit (20, 60 ou 200mg/kg de peso corporal).....	47
Figura 5: Avaliação do consumo alimentar e do ganho de peso corporal nos diferentes grupos alimentados cronicamente com dieta controle ou HC e tratados ou não com o Bindarit a partir da quarta ou da oitava à décima semana de experimento.....	49
Figura 6: Índice de adiposidade em animais alimentados cronicamente com dieta HC e tratados ou não com Bindarit.	50
Figura 7: Análise histológica de secções do tecido adiposo epididimal de animais alimentados com dieta controle e dieta HC associada ou não ao tratamento com Bindarit	51

Figura 8: Concentração de CCL2 no tecido adiposo epididimal de animais alimentados por dez semanas com dieta HC tratados ou não com o Bindarit da quarta ou da oitava à décima semana.....	52
Figura 9: Teste oral de tolerância à glicose em animais alimentados com dieta controle ou dieta HC associada ou não ao tratamento com o Bindarit a partir da quarta ou da oitava à décima semana de experimento.....	54
Figura 10. Concentração de adiponectina e resistina séricas em animais alimentados por dez semanas com dieta HC tratados ou não com o Bindarit da oitava à décima semana de dieta HC.....	56
Tabela 1: Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle (Labina®) e dieta normocalórica/rica em carboidratos refinados (HC).....	43

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Páginas
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1. O TECIDO ADIPOSEO.....	20
1.2. ADIPOSIDADE, INFLAMAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS	22
1.3. INFLUXO DE MACRÓFAGOS PARA O TECIDO ADIPOSEO.....	26
1.4. BINDARIT.....	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	39
3.1. OBJETIVO GERAL.....	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1. ANIMAIS E SEU TRATAMENTO	42
4.1.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 - Adiposidade induzida agudamente por dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit.	42
4.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 - Adiposidade induzida cronicamente por dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit.	43

4.2.	ENSAIOS EXPERIMENTAIS	47
4.2.1.	Teste oral de Tolerância à Glicose.....	47
4.2.2.	Extração de citocinas de tecidos	47
4.2.3.	Determinação de citocinas por ELISA.....	48
4.2.4.	Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal	49
4.2.4.1.	Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz.....	49
4.2.4.2.	Aquisição de imagens no microscópio e mensuração da área e perímetro.....	49
4.2.5.	Dosagens bioquímicas	50
4.2.6.	Índice de adiposidade	50
4.2.7.	Índice Adiponectina/Adiposidade Visceral.....	50
4.2.8.	Índice Resistina/Adiposidade Visceral.....	50
4.2.9.	Índice Adiponectina/Resistina	51
4.2.10.	Análise Estatística	51
5.	RESULTADOS	52
5.1.	Identificação da dose efetiva de Bindarit para a redução da produção de CCL2 no tecido adiposo induzido por três dias de dieta HC	53
5.1.1.	Consumo alimentar e variação no peso corporal	53
5.1.2.	Adiposidade em animais alimentados por três dias com dieta HC associada ao tratamento com diferentes doses de Bindarit	54
5.1.3.	Inibição da produção de CCL2 por diferentes doses de Bindarit em animais alimentados por três dias com dieta HC	56
5.2.	Inibição de CCL2 não interfere no consumo alimentar, no ganho de massa corporal e na adiposidade induzida cronicamente por dieta HC	57
5.3.	Inibição de CCL2 em animais com adiposidade induzida cronicamente por dieta HC	61
5.4.	Avaliação de parâmetros metabólicos em animais alimentados com dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit	62

5.5.	Intolerância à glicose induzida cronicamente pela dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit	62
5.6.	Concentração sérica de adiponectina e resistina e a relação dessas adipocinas com a adiposidade	64
6.	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMO

A obesidade é associada a um estado inflamatório crônico e representa um fator de risco para a ocorrência de diabetes e síndrome metabólica. Os estudos sobre o papel da quimiocina CC ligante 2 (CCL2) no processo inflamatório induzido pela maior adiposidade são controversos, e não esclarecem a real importância dessa quimiocina na ocorrência de alterações metabólicas ligadas a expansão exacerbada do tecido adiposo. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se a inibição da produção de CCL2 no tecido adiposo interfere na adiposidade induzida por dieta HC, bem como na ocorrência de intolerância à glicose e processo inflamatório no tecido adiposo. Para isso, foi utilizado um modelo experimental de aumento de adiposidade induzido por dieta, associado à maior produção de moléculas pró-inflamatórias, como CCL2. Camundongos C57BL/6 machos foram alimentados por dez semanas com dieta controle ou dieta HC associada ou não ao tratamento com o Bindarit (droga sintética inibidora da produção de CCL2). O Bindarit foi introduzido oralmente na dose de 100mg/Kg de peso corporal uma vez ao dia, iniciando-se na quarta ou na oitava semana experimental e mantendo-se até a décima semana de ingestão da dieta HC. Na nona semana de ingestão da dieta HC os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose. O grupo alimentado com a dieta HC e tratados com a droga, apesar da inibição da produção de CCL2 no tecido adiposo, não apresentou melhora na intolerância à glicose e/ou alteração no perfil de secreção de adipocinas ligadas a indução da resistência à insulina. Assim, sugerimos que a inibição da quimiocina CCL2 não possui efeitos críticos no desenvolvimento da adiposidade e consequente intolerância à glicose induzidas por dieta HC.

Palavras-chave:

CCL2, Bindarit, adiposidade, intolerância à glicose.

ABSTRACT

Obesity is associated with chronic inflammation and represents the risk factor for diabetes and metabolic syndrome. The results of works about the role of CC chemokine ligand 2 (CCL2) in adiposity and metabolic diseases are controversial and not clear the real role of this chemokine in occurrence of metabolic changes associated with exacerbated expansion of adipose tissue. Our aim was to evaluate if the inhibition of CCL2 production in adipose tissue interferes in adiposity induced by HC diet, as well as in the occurrence of glucose intolerance and inflammatory response in adipose tissue. For this, we used the experimental model of adiposity and increase of pro-inflammatory molecules, as CCL2 in adipose tissue induced by diet. We used C57BL/6 male mice. Mice were fed with control or HC diet associated or not with Bindarit (synthetic drug that inhibits the production of CCL2). The oral treatment of Bindarit was once a day (100mg/Kg of body weight) from fourth to tenth week or from eighth to tenth week. Test of glucose tolerance was made on the ninth week of diet intake. The group fed with HC diet and treated with the drug, although the inhibition of CCL2 production in adipose tissue, not presented improvement of glucose intolerance and/or profile changes in the secretion of adipokines linked to induction of insulin resistance. Then, we suggest that absence of CCL2 doesn't have role in adiposity and glucose intolerance induced by HC diet.

Keywords:

CCL2, Bindarit, adiposity, glucose intolerance.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A prevalência mundial da obesidade tem aumentado drasticamente durante as últimas décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) mais de um bilhão de adultos apresentam sobrepeso e destes, 300 milhões são clinicamente obesos (índice de massa corporal igual ou maior que 30kg/m^2) (WHO, 2004). No Brasil, segundo o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), a prevalência de sobrepeso é de 48,1%, sendo que desses, 15% são obesos. A pesquisa foi realizada nas 26 capitais e no Distrito Federal (BRASÍLIA. Ministério da Saúde, 2011).

A obesidade e as doenças metabólicas associadas como a resistência à insulina, diabetes tipo II, esteatose hepática, aterosclerose, doenças degenerativas, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e câncer estão entre as mais comuns e deletérias doenças, representando uma ameaça à saúde da população mundial (AHIMA e FLIER, 2000; SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; WELLEN e HOTAMISHLIGIL, 2003; CHARO e TAUBMAN, 2004, XU et al., 2003, KANDA et al., 2006). A síndrome metabólica é caracterizada pela ocorrência simultânea de alguns fatores de risco que aumentam a chance do desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade tais como o maior acúmulo de gordura abdominal, a resistência à insulina, a intolerância à glicose, a dislipidemia, a hipertensão e os distúrbios de coagulação (NESTEL, 2004). Sabe-se que o aumento crescente de indivíduos obesos e com síndrome metabólica nos últimos anos é decorrente de alterações na composição da dieta, associadas a mudanças econômicas, sociais e demográficas (POPKIN, 2001). Alguns estudos têm evidenciado maior

ingestão de ácidos graxos saturados, açúcares e refrigerantes, em detrimento da redução do consumo de carboidratos complexos, frutas, verduras e legumes, nas regiões metropolitanas do Brasil (MONTEIRO et al., 2000; GALEAZZI et al., 1997). Observou-se também, maior densidade energética das refeições, favorecida pelo aumento do consumo de carnes, leite e derivados ricos em gorduras. A substituição dos alimentos *in natura* ricos em fibras, vitaminas e minerais, por produtos industrializados (BARRETO e CYRILLO, 2001) e o estilo de vida sedentário (POPKIN, 1999) compõem os principais fatores etiológicos da obesidade.

Estima-se que a obesidade e as alterações metabólicas afetam mais de 50% da população adulta mundial (WELLEN e HOTAMISHLIGIL, 2003). Além de acarretar pior qualidade de vida ao indivíduo, o aumento da adiposidade e as alterações fisiopatológicas associadas estão diretamente relacionados às consequências econômicas e sociais (OUCHI et al., 2011).

1.1. O TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é composto por vários tipos celulares, incluindo adipócitos, células imunológicas (macrófagos e linfócitos), pré-adipócitos e células endoteliais. Esse tecido possui funções como isolamento térmico, proteção mecânica contra choques e depósito de energia na forma de gordura, sendo a última o papel clássico desse tecido (ALBRIGHT e STEN, 1998). Sabe-se que a eficiência de armazenamento energético é dada pela capacidade de estocagem de gordura no adipócito e de replicação e

diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, ou seja, o aumento do tamanho da célula (hipertrofia) e/ou da quantidade de células adiposas no tecido (hiperplasia). A hipertrofia dos adipócitos relaciona-se ao aumento da síntese e armazenamento de ácidos graxos na forma de triacilglicerol que resulta em maior adiposidade (HAUSMAN et al., 2001; KADOWAKI et al., 2003).

Com a evolução dos estudos relacionados ao papel do tecido adiposo, além do clássico estoque de energia, descobriram-se funções chaves desse tecido na integração do metabolismo sistêmico. Em 1987, o tecido adiposo foi identificado como sítio de metabolismo de hormônios esteroides sexuais e produção de adiposina (FLIER et al., 1987), fator endócrino que é expresso em proporção menor em roedores obesos (SIITERI et al., 1987). Em 1993, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi identificado como produto pró-inflamatório do tecido adiposo induzido em modelos experimentais de diabetes e obesidade, evidenciando a ligação direta entre obesidade e inflamação (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN, 1993). E em 1994, com a identificação e caracterização da leptina, hormônio produzido no tecido adiposo, esse tecido passou a ser reconhecido como órgão endócrino (ZHANG et al., 1994). A partir desses estudos, descobriu-se que o tecido adiposo é capaz de expressar e secretar, além das proteínas já citadas, uma variedade de moléculas bioativas, como por exemplo, adiponectina, resistina, interleucina-6 (IL-6) e CC quimiocina ligante 2 (CCL2), chamadas conjuntamente de adipocinas. Tais adipocinas apresentam ação local (autócrina e parácrina) e sistêmica (endócrina) (OUCHI et al., 2003). É importante ressaltar que o tecido adiposo expressa também vários receptores que podem acarretar resposta a

sinais aferentes do sistema endócrino e do sistema nervoso central (SNC) (KERSHAW e FLIER, 2004; IBRAHIM, 2009).

O tecido adiposo apresenta uma maquinaria metabólica, que possibilita a comunicação com órgãos distantes e dessa forma, esse tecido pode coordenar vários processos biológicos como o metabolismo energético, função neuroendócrina e sistema imune (KERSHAW e FLIER, 2004; IBRAHIM, 2009). Assim, atualmente o tecido adiposo é considerado um órgão metabólico e endócrino complexo e altamente ativo (AHIMA e FLIER, 2000; FRUHBECK et al., 2001; OUCHI et al., 2003, KERSHAW e FLIER, 2004).

1.2. ADIPOSIDADE, INFLAMAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Os ácidos graxos depositados no tecido adiposo na forma de triacilgliceróis constituem a principal reserva de energia do corpo. A síntese e metabolismo de ácidos graxos e de triacilgliceróis são processos mediados por enzimas reguladas por estímulos nutricionais e hormonais em resposta à demanda energética e atividade física (SHI e BURN, 2004). A insulina é um hormônio essencial na síntese e armazenamento de ácidos graxos devido a sua capacidade em estimular a captação de glicose, substrato necessário para a esterificação dos ácidos graxos, pelo músculo e tecido adiposo e também por ativar a enzima lipase lipoprotéica (LPL) (PICARD et al., 1999). A LPL localiza-se no endotélio vascular e é fundamental para a hidrólise dos triacilgliceróis, presentes nas *quilomicra*, em ácidos graxos livres e glicerol (SHI e BURN, 2004). A insulina age também, na ativação da via de síntese *de novo* de ácidos

graxos, por meio da maior transcrição gênica de enzimas envolvidas na lipogênese, como a acil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS). Outro efeito importante da insulina é a inibição da lipólise via ativação da fosfodiesterase, enzima que inativa o AMPc (AMP cíclico), e inibição da enzima lipase hormônio sensível (HSL) (KITAMURA et al., 1999). Em estados nos quais a concentração de insulina é baixa, como no jejum, os triacilgliceróis são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol pela ação da enzima HSL. No jejum, as catecolaminas são os ativadores primários da lipólise (FAIN e GARCIA-SAINZ, 1983; LARGE et al., 2004). As catecolaminas ativam a adenilil-ciclase na membrana plasmática dos adipócitos, com consequente formação de AMPc. Uma proteína cinase dependente de AMPc, por sua vez, fosforila e ativa a HSL. Assim, os triacilgliceróis são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol (SHI e BURN, 2004). Com o aumento da adiposidade, é comum a ocorrência de resistência à insulina nos três tecidos alvos desse hormônio (fígado, músculo e tecido adiposo), resultando em diminuição da captação de glicose induzida por insulina, no músculo e no tecido adiposo, aumento da gliconeogênese hepática e liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (SHENK, SABERI e OLEFSKY, 2008).

O equilíbrio entre a deposição e a liberação de energia pelo tecido adiposo representa uma vantagem adaptativa, na qual o estoque de gordura representaria a garantia de sobrevivência da espécie em época de escassez de alimentos, porém a deposição excessiva de triacilgliceróis nos adipócitos acarreta disfunção endócrina e metabólica dessas células. Tal disfunção pode ser explicada, pelo menos em parte, devido a um estado de inflamação crônica

desencadeado pela expansão exacerbada do tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 2006). Essa condição é caracterizada por alterações na produção e secreção de adipocinas pró e anti-inflamatórias incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), resistina e adiponectina. Concomitantemente, ocorre a ativação de vias de sinalização inflamatórias como c-Jun N-terminal quinase (JNK) e translocação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2003).

Uma das alterações metabólicas mais características do estado inflamatório desencadeado pela adiposidade aumentada é a resistência à insulina, e esta está diretamente relacionada ao desenvolvimento do diabetes tipo II. Isso porque a diminuição da sensibilidade à insulina envolve múltiplas variáveis, dentre as quais se inclui a hipertrofia do tecido adiposo associada ao aumento sérico e tecidual de adipocinas, ácidos graxos livres e outras moléculas pró-inflamatórias (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2003; HOTAMISLIGIL, 2006).

Adipocinas como adiponectina e resistina possuem concentração sérica proporcional à quantidade de tecido adiposo e são diretamente relacionadas à tolerância à glicose. A concentração sérica de adiponectina encontra-se diminuída na obesidade, resistência à insulina e no diabetes tipo II. Essa adipocina é uma molécula protetora contra disfunções metabólicas induzidas pela expansão do tecido adiposo, sendo conhecida como um fator sensibilizador à insulina e por ter ação anti-inflamatória, anti-diabética e anti-aterogênica (KERSHAW e FLIER, 2004; KADOWAKI et al., 2006; HOTTA et al., 2000; IWABU et al., 2010). Os efeitos benéficos da adiponectina na

sensibilidade à insulina são devidos, pelo menos em parte, à ativação de AMPK (AMP-activated protein kinase) no músculo esquelético e fígado (YAMAUCHI et al., 2002; TOMAS et al., 2002). A ativação de AMPK promove aumento da oxidação lipídica e maior captação de glicose no músculo, e inibição da gliconeogênese no fígado (YAMAUCHI et al., 2002; TOMAS et al., 2002). Já a resistina é descrita como um polipeptídeo relacionado à resistência à insulina induzida pela obesidade e a concentração sérica dessa adipocina encontra-se aumentada em animais obesos e diabéticos (STEPPAN et al., 2001). Os efeitos da resistina na modulação do metabolismo de glicose ocorrem no receptor de insulina, como evidenciado pela diminuição da fosforilação desse receptor e diminuição da transmissão do sinal na cascata de sinalização da insulina, incluindo alterações na fosforilação de IRS-1, atividade de PI3K (fosfatidilinositol-3-kinase) associada ao IRS-1, produção de PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato) e ativação de Akt (STEPPAN et al., 2005). A ação da resistina é também associada à ativação de SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling 3), um inibidor da sinalização da insulina, em adipócitos (STEPPAN et al., 2005).

Citocinas inflamatórias como o TNF α , que podem ser produzidas por adipócitos e particularmente por macrófagos residentes no tecido adiposo, e também os ácidos graxos livres são ativadores potentes de várias cascatas de transdução de sinais, incluindo muitas vias de inibição da ação da insulina como a JNK (HOTAMISLIGIL, 2006; HIROSUMI et al., 2002). A indução da resistência à insulina por essas vias envolve a inibição da fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). Hirosumi e colaboradores (2002) mostraram que a JNK é um importante componente da

via bioquímica responsável pelo desenvolvimento da resistência à insulina induzida pelo aumento da adiposidade *in vivo* (HIROSUMI et al., 2002).

A associação entre a maior adiposidade e as comorbidades relacionadas é documentada há vários anos, e com a descoberta da ocorrência de processo inflamatório durante a expansão do tecido adiposo (HOTAMISLIGIL et al., 1993), esclareceu-se melhor o elo de ligação entre a obesidade e as alterações metabólicas. Entretanto, essa correlação, apesar de ser amplamente estudada, permanece com inúmeros pontos a serem elucidados.

1.3. INFLUXO DE MACRÓFAGOS PARA O TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo contém macrófagos derivados da medula óssea que em roedores e humanos obesos podem atingir até 40% do total de células do tecido, enquanto em indivíduos saudáveis (magros) essa proporção atinge aproximadamente 10% (WEISBERG et al., 2006). Os macrófagos residentes no tecido adiposo são a principal fonte de mediadores inflamatórios, como CCL2 e TNF α , exercendo efeitos diretos e indiretos na função dos adipócitos e sensibilidade à insulina (HOSTAMISLIGIL, 2006). O papel dos macrófagos residentes no tecido adiposo na patogênese das doenças metabólicas tem sido bastante discutido e estudos indicam que a hipertrofia dos adipócitos produz sinais quimiotáticos que levam ao recrutamento de macrófagos (XU et al., 2003; WEISBERG et al., 2003), fato importante para a promoção e manutenção da resposta inflamatória induzida pela obesidade (Figura 1).

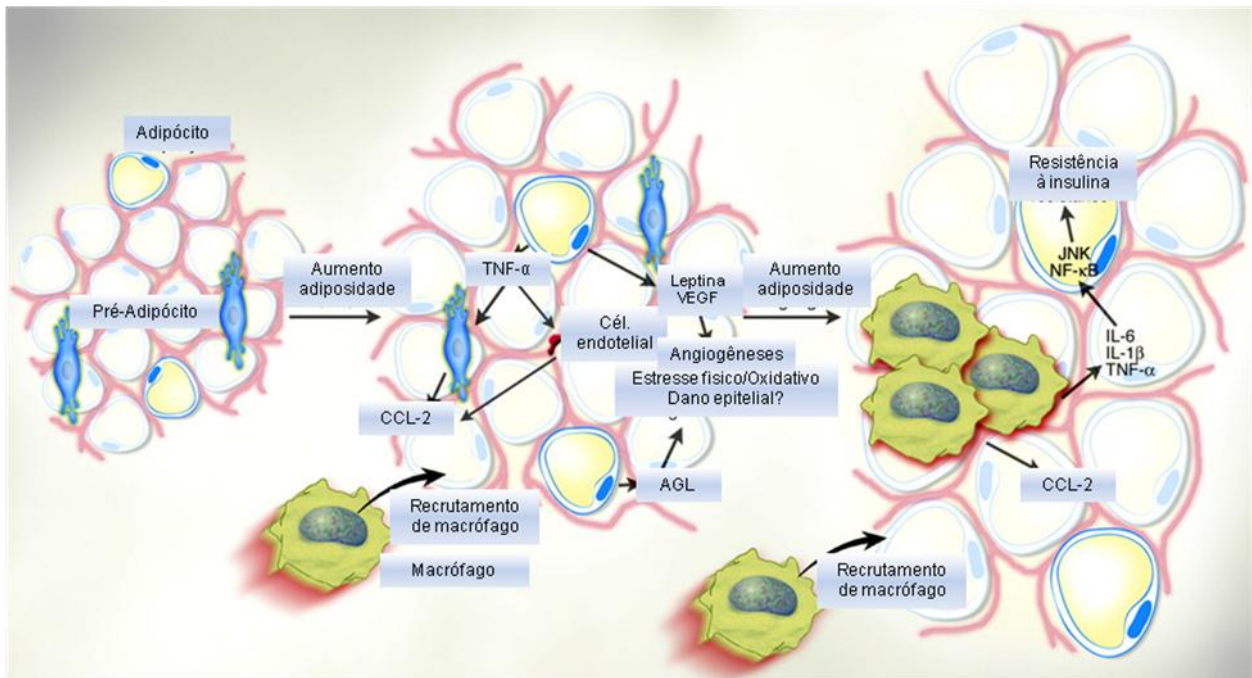


Figura 1. A hipertrofia dos adipócitos e consequente expansão do tecido adiposo é caracterizada pela secreção de moléculas inflamatórias e progressivo influxo de macrófago (Figura modificada de Wellen et al.. *J. Clin. Invest.* 112:1785-1788, 2003).

Trabalhos recentes sugerem que os macrófagos residentes no tecido adiposo de animais magros apresentam-se alternativamente ativados, fenótipo M2 (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007), comumente induzido por citocinas Th2, como interleucina-4 (IL-4) e IL-13. Esses macrófagos M2 produzem principalmente IL-10 e modulam negativamente a inflamação (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2004; WU et al., 2011). Por outro lado, citocinas Th1, incluindo interferon- γ (IFN- γ), IL-1 β e TNF α , além de LPS (KRAUSGRUBER et al., 2011) e obesidade induzida por dieta (ODEGGAR, 2007) induzem a ativação “clássica” de macrófagos chamados M1. Macrófagos M1 aumentam a

produção de moléculas pró-inflamatórias, como TNF α , CCL2 e IL-12 (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007). De forma interessante, esses fenótipos demonstram considerável plasticidade, o que permite aos macrófagos responder eficientemente a sinais ambientais mudando o fenótipo em resposta a citocinas e a sinais de microrganismos (KRAUSGRUBER et al., 2011). Como um exemplo de sinais indutores da mudança de fenótipo dos macrófagos, temos o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos- γ (PPAR- γ) que é induzido em macrófagos por IL-4 ou IL-13 e promove expressão de arginase-1, um dos genes que assinam o fenótipo M2 (MARTINEZ, HELMING e GORDON, 2009). Estudos em animais com deleção de PPAR- γ (específica nos macrófagos) demonstraram que esses tornaram-se mais susceptíveis a obesidade e a intolerância à glicose induzida por dieta (BOUHLEL, 2007; ODEGGAR, 2007). Outro modulador da polarização de macrófago, recentemente descoberto, é o fator de transcrição pertencente à família dos fatores reguladores de interferon (IRF) chamado IRF5. O IRF5 foi identificado como o principal fator na definição da polarização de macrófagos (M1 ou M2) por ser altamente expresso em macrófagos M1 e induzir a expressão de gene e secreção de citocinas com perfil de resposta Th1-Th17 (KRAUSGRUBER et al., 2011). Além disso, o IRF5 é um inibidor dos marcadores da expressão de macrófagos M2 (KRAUSGRUBER et al., 2011). Ou seja, o IRF5 contribui para a plasticidade dos macrófagos, e a modulação da expressão desse fator leva à conversão de um fenótipo de macrófago a outro (KRAUSGRUBER et al., 2011).

O recrutamento e a ativação pró-inflamatória de macrófagos residentes no tecido adiposo são requeridos para a manutenção do estado inflamatório e o desenvolvimento da resistência à insulina na obesidade (LUMENG, 2007). A quimiocina proteína quimiotática de monócito (CC quimiocina ligante 2 – CCL2, também conhecida como MCP-1) pode ser fundamental nesse processo. CCL2 está relacionada ao estado de inflamação crônica e influxo de macrófagos em pacientes obesos e demonstrou-se estar intimamente associada à resistência à insulina em animais obesos (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; KANDA et al., 2006; SELL e ECKEL, 2007).

A molécula CCL2 é um polipeptídeo monomérico produzido em resposta a estímulos inflamatórios. Trata-se de uma molécula membro da família das quimiocinas CC fundamental para o recrutamento de macrófagos e monócitos em vários modelos de inflamação (ROLLINS, 1997). Estudos demonstram que a expressão dessa quimiocina no tecido adiposo tem sido correlacionada positivamente com o grau de adiposidade (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; XU et al., 2003; WEISBERG et al., 2003). Além disso, o aumento da expressão de CCL2 no tecido adiposo precede a expressão de marcadores da presença de macrófagos durante o desenvolvimento da obesidade (XU et al., 2003). Mais uma vez, indicando o papel do CCL2 no recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo.

A quimiocina CCL2 é produzida e secretada por vários tipos celulares como adipócitos, pré-adipócitos, células epiteliais e monócitos, sendo que, no tecido adiposo a porção do estroma vascular apresenta maior secreção de CCL2 comparado aos adipócitos (CHEN et al., 2005; FAIN, 2006; KAMEI et al.

2006). CCL2 interage com o receptor de quimiocina 2 (CCR2) na superfície dos precursores de macrófagos, os monócitos, para iniciar a sinalização que levará a adesão celular e influxo tecidual desses (BAGGIOLINI, 1998; CHARO e RANSOHOFF, 2006). O aumento de CCL2 em resposta à adiposidade exacerbada provoca influxo e acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, e esses, posteriormente, secretam mais citocinas e quimiocinas inflamatórias mantendo um ciclo vicioso no qual cada vez mais moléculas inflamatórias são secretadas (YU et al., 2006).

Estudos indicam que a quimiocina CCL2 apresenta-se superexpressa e em concentração elevada no plasma de roedores geneticamente obesos ou com obesidade induzida por dieta (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; YU et al., 2006; XU et al., 2003; ZHOU et al., 2007; KANDA et al., 2006) estando também presente em concentrações plasmáticas altas em pacientes obesos (CRISTIANSEN et al., 2005; KIM et al., 2006) e/ou diabéticos (NOMURA et al., 2000). CCL2 é atribuída como fundamental na patofisiologia da obesidade (CRISTIANSEN et al., 2005; Kim et al., 2006) e intimamente associada às complicações relacionadas à obesidade visceral. Enfatizando essa ideia, Sartipy e Loskutoff (2003) demonstraram que essa quimiocina pode alterar a função e o metabolismo dos adipócitos, podendo contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina e causar mudanças no perfil secretório dos adipócitos. Segundo esses autores, CCL2 possui efeito direto na ocorrência de doenças associadas à hiperinsulinemia e obesidade, incluindo diabetes tipo II (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003). Outros estudos afirmam, ainda, que concentrações elevadas de CCL2 estão diretamente relacionadas

às vias de indução da RI (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; KANDA et al., 2006).

A possível explicação da ligação de CCL2 com a resistência à insulina associada ao aumento da adiposidade é que, juntamente com outras moléculas inflamatórias expressas no tecido adiposo, como TNF α e IL-6, CCL2 pode influenciar o metabolismo de glicose e lipídios por ativar vias pró-inflamatórias que interferem na cascata de sinalização da insulina, inibindo a ação desse hormônio (KAMEI et al., 2006). Adicionalmente, o estudo de Sartipy e Loskutoff (2003) demonstrou que CCL2 inibe a captação de glicose estimulada pela insulina bem como a expressão de genes metabolicamente importantes no adipócito como o transportador de glicose tipo 4 (Glut4), o PPAR γ e a proteína ligadora de ácidos graxos 4 (FABP4).

CCL2 e o receptor CCR2 possuem implicações na regulação funcional do adipócito. Weisberg e colaboradores (2006) mostraram que essa interação quimiocina/receptor é importante na quimiotaxia de macrófagos e nas alterações metabólicas e inflamatórias (WEISBERG et al., 2006). O CCR2 é também o receptor para outras quimiocinas CCs incluindo CCL7 e CCL8, e é expresso em vários tipos celulares incluindo adipócitos, células do músculo esquelético e macrófagos. Esse receptor é importante para o recrutamento de monócitos/macrófagos em modelos murinos de doenças inflamatórias como a aterosclerose, artrite reumatoide e infecções micobacterianas (CHARO e PETERS, 2003).

Segundo Kanda e colaboradores (2006), a inibição da interação CCL2/CCR2 demonstrou melhora na sensibilidade à insulina e esteatose

hepática bem como no influxo de macrófagos para o tecido adiposo de animais com deleção genética para CCL2 e obesos. Os autores observaram também, a ocorrência de resistência à insulina, esteatose hepática e acúmulo de macrófagos no tecido adiposo de animais que superexpressam CCL2 (KANDA et al., 2006). Da mesma forma, Kamei e colaboradores (2006) estudaram o papel da superexpressão de CCL2 em animais transgênicos. Esses animais apresentaram concentração plasmática elevada de CCL2 e consequente aumento do influxo de macrófagos e da expressão de TNF α e IL-6 no tecido adiposo. Além dessas alterações relacionadas aos mediadores inflamatórios, que podem, em parte, explicar o desenvolvimento de resistência à insulina nos adipócitos desses animais, nesse estudo, observou-se também aumento na concentração plasmática de ácidos graxos livres não esterificados (KAMEI et al., 2006).

Controversamente, Inouye e colaboradores (2007), apesar de não encontrarem diferença entre a quantidade de macrófagos no tecido adiposo de animais com deleção genética de CCL2 e controles alimentados com dieta rica em lipídios, observaram que ambos os grupos de animais apresentaram hiperinsulinemia. Já Kirk e colaboradores (2008) demonstraram acúmulo de macrófagos no tecido adiposo de animais com obesidade induzida por dieta apesar da deleção genética de CCL2.

Os resultados encontrados em estudos com animais que apresentam deleção genética do receptor CCR2 também são controversos. Chen e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição da sinalização de CCL2 não é capaz de prevenir a obesidade induzida por dieta rica em lipídios e o

recrutamento de macrófagos no tecido adiposo de animais com ausência do CCR2. Isso, devido, provavelmente a quimiotaxia redundante, ou seja, outras quimiocinas CCs podem ligar-se a diferentes receptores como CCR1 ou CCR3 (CHEN et al., 2005) e CCL2 pode interagir com outros receptores na ausência do CCR2 (KIRK et al., 2008) ou mesmo devido ao grande número de adipocinas envolvidas no processo inflamatório no tecido adiposo (CHEN et al., 2005).

Weisberg e colaboradores (2006) estudaram um modelo experimental que apresenta deleção genética do CCR2 e outro com animais tratados com um antagonista desse mesmo receptor, ambos em animais alimentados com dieta rica em lipídios. No primeiro modelo, eles encontraram redução do número de macrófagos infiltrados e menor inflamação do tecido adiposo, além de atenuação da resistência à insulina sistêmica. No segundo modelo houve redução na quantidade de macrófagos no tecido adiposo e melhora da sensibilidade à insulina. Os animais com deleção do gene CCR2 apresentaram ainda modulação do comportamento alimentar indicado pela ingestão menor de ração, menor ocorrência da esteatose hepática e concentração plasmática maior de adiponectina (WEISBERG et al., 2006). Porém, essa adipocina apresentou-se aumentada somente no modelo de animais com ausência do gene CCR2, não sofrendo alteração no modelo que utilizou o antagonista do CCR2, sugerindo que concentrações maiores de adiponectina não é a principal causa da melhora na sensibilidade à insulina nesse estudo (WEISBERG et al., 2006).

Sumarizando, os resultados encontrados nos estudos relacionados ao papel de CCL2 na manutenção do processo inflamatório induzido pela maior adiposidade são controversos e não esclarecem a real importância dessa quimiocina na ocorrência de alterações metabólicas ligadas à expansão exacerbada do tecido adiposo.

1.4. BINDARIT

O estudo do papel e da via de sinalização de CCL2 nas doenças inflamatórias pode representar alvo para o desenvolvimento de drogas inibidoras da ação dessa quimiocina. O Bindarit, (2-metil-2-[[1 - (fenilmetil)-1H-indazole-3YL] methoxy] propanoico) é uma molécula desprovida de atividade imunossupressora (por exemplo, a produção de anticorpos, a proliferação de células T), que não interfere no metabolismo do ácido araquidônico (produção de prostaglandinas), e tem se mostrado efetivo em modelos animais de inflamação como artrite (GUGLIELMOTTI et al., 1993; CIOLI et al., 1992; RULLI et al., 2009), nefrite relacionada ao lúpus (ZOJA et al., 1998), pancreatite aguda (BHATIA et al., 2005), colite (BHATIA et al., 2008), sepse e endotoxemia (RAMNATH, 2008), angioplastia (GRASSIA et al., 2009), hipertensão renovascular (ZHU et al., 2009) e cardiomiopatia hipertensiva (LIN et al., 2009).

Essa droga é um inibidor seletivo da produção de CCL2 *in vitro* (BHATIA et al., 2005; BHATIA et al., 2008; MIROLO, 2008; RULLI et al., 2009; ZHU et al., 2009) e *in vivo* (ZOJA et al., 1998; BHATIA et al., 2008; RULLI et al., 2009). O Bindarit não altera a produção de interleucina 1 (IL-1), IL-6, ou outras

quimiocinas como interleucina 8 (IL-8), proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α) e quimiocina proteína quimiotática de monócitos 5 (CCL5 ou RANTES) (GUGLIELMOTTI et al., 2002). Os efeitos benéficos do Bindarit em modelos de inflamação nas articulações e nos rins, e também na redução da gravidade da pancreatite aguda (BHATIA et al., 2005), estão relacionados à ação anti-CCL2 dessa droga (SINORI et al., 1999). Esses estudos sugerem que é possível regular a produção de CCL2 de maneira seletiva por meio do tratamento com a molécula sintética, Bindarit.

2. JUSTIFICATIVA

A adiposidade excessiva e as doenças metabólicas associadas vêm, nas últimas décadas, incontrolavelmente, aumentando a prevalência em adultos e crianças e representam uma ameaça à saúde da população mundial. Conforme relatado anteriormente, os problemas metabólicos associados ao aumento da adiposidade estão relacionados ao estado de inflamação crônica, caracterizado pelo influxo de macrófagos em resposta à expansão do tecido adiposo e consequente aumento da secreção de moléculas pró-inflamatórias. A quimiocina CCL2 é apontada por vários estudos como fundamental para o desenvolvimento e manutenção desse estado inflamatório e possivelmente, relaciona-se à ocorrência de resistência à insulina. Porém, os estudos sobre o papel de CCL2 em modelos de aumento de adiposidade são controversos. Os diferentes resultados encontrados nesses estudos justificam o interesse em investigar se a inibição da produção de CCL2, por meio do tratamento com o Bindarit, interfere na ocorrência do processo inflamatório, da adiposidade e da intolerância à glicose induzidos por dieta HC (dieta normocalórica/rica em carboidratos refinados - *high carbohydrate*) em camundongos.

Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que animais alimentados por um curto período (3 dias) ou cronicamente (10 ou 12 semanas) com dieta HC apresentaram adiposidade visceral exarcebada associada à maior concentração de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias, tais como IL-6, TNF α , CCL2 e IL-10 no tecido adiposo visceral (Oliveira MC et al. *Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by normocaloric/high-carbohydrate diet in mice*. Manuscrito submetido em 2011).

Observamos, nesses estudos, correlação positiva entre a alta concentração de mediadores inflamatórios no tecido adiposo dos animais alimentados com dieta HC e a intolerância à glicose.

Dessa forma, a partir do possível envolvimento de CCL2 no desenvolvimento de alterações metabólicas em modelo animal de aumento de adiposidade induzido por dieta, sugere-se que inibidores da produção de CCL2, como o Bindarit, apresentem potencial terapêutico no tratamento da resistência à insulina induzida pelo aumento da adiposidade, bem como de outras doenças inflamatórias nas quais a imunopatologia esteja relacionada ao influxo de macrófagos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a inibição da síntese de CCL2 interfere na adiposidade induzida por dieta HC, bem como na ocorrência de intolerância à glicose e processo inflamatório no tecido adiposo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar a dose efetiva de Bindarit para a inibição da produção de CCL2 no tecido adiposo em animais alimentados por três dias com dieta HC;
- II. Avaliar o papel de CCL2 na adiposidade induzida agudamente por dieta HC;
- III. Analisar a inibição crônica da produção de CCL2 em diferentes tempos de tratamento com a droga em animais alimentados cronicamente com a dieta HC;
- IV. Avaliar o papel de CCL2 na adiposidade induzida cronicamente por dieta HC;
- V. Verificar se a inibição crônica da produção de CCL2 é capaz de atenuar ou reverter a intolerância à glicose induzida pelo aumento da adiposidade;
- VI. Verificar se a inibição da produção de CCL2 interfere na produção de outros mediadores inflamatórios característicos do aumento da adiposidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS E SEU TRATAMENTO

A utilização dos animais nesse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA – protocolo 264/08). Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos entre seis e oito semanas de idade. O trabalho foi dividido em dois protocolos experimentais:

4.1.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 - Adiposidade induzida agudamente por dieta normocalórica/rica em carboidratos refinados (HC) associada ao tratamento com o Bindarit.

Com o objetivo de verificar a dose efetiva da droga para inibir a produção de CCL2 no tecido adiposo, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, como se seguem:

- ✓ Grupo Controle – Animais alimentados com dieta controle (Labina®) e introdução oral de solução veículo (solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5%) duas vezes ao dia;
- ✓ Grupo Veículo – Animais alimentados com dieta HC e introdução oral de solução veículo (solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5%) duas vezes ao dia;
- ✓ Grupo Bindarit 20mg – Animais alimentados com dieta HC e tratados com 10mg/kg de massa corporal de Bindarit duas vezes ao dia;

- ✓ Grupo Bindarit 60mg - Animais alimentados com dieta HC e tratados com 30mg/kg de massa corporal de Bindarit duas vezes ao dia;
- ✓ Grupo Bindarit 200mg - Animais alimentados com dieta HC e tratados com 100mg/kg de massa corporal de Bindarit duas vezes ao dia.

O Bindarit (*Angeline Research Center – ACRAF, Itália*) foi ressuspendido em solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5% (CMC) e introduzido oralmente por gavagem. Os animais foram alimentados com dieta HC durante três dias, havendo o pré-tratamento com Bindarit dois dias antes do início da dieta HC e o tratamento com Bindarit durante o consumo de dieta HC. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de luz, temperatura e livre acesso à água e à dieta controle ou dieta HC. A quantidade de ração ingerida pelos animais e o peso corporal desses foi mensurado diariamente.

4.1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 - Adiposidade induzida cronicamente por dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit. Foram investigados os efeitos da inibição da produção de CCL2 como a ocorrência de maior adiposidade, intolerância à glicose, dislipidemia e processo inflamatório no tecido adiposo em camundongos alimentados com dieta HC por dez semanas. O tratamento crônico com o bindarit ocorreu a partir da quarta ou da oitava semana de ingestão da dieta HC e permaneceu até

a décima semana, na qual ocorreu a eutanásia. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- ✓ Grupo Controle – Animais alimentados por dez semanas com dieta controle (Labina®) e introdução oral de solução veículo (solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5%) uma vez ao dia da quarta à décima semana de experimento;
- ✓ Grupo Veículo – Animais alimentados por dez semanas com dieta HC e introdução oral de solução veículo (solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5%) uma vez ao dia da quarta à décima semana de experimento;
- ✓ Grupo Bindarit (4-10) – Animais alimentados por dez semanas com dieta HC e introdução oral de 100mg/Kg de peso corporal de Bindarit uma vez ao dia da quarta à décima semana de experimento.
- ✓ Grupo Bindarit (8-10) – Animais alimentados por dez semanas com dieta HC e introdução oral de 100mg/Kg de peso corporal de Bindarit uma vez ao dia da oitava à décima semana de experimento.

Na nona semana de tratamento com a dieta HC, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose.

Os animais foram mantidos em ambiente com controle de luz, temperatura e livre acesso à água e à dieta controle ou dieta HC. A quantidade

de ração ingerida pelos animais e o peso corporal desses foi mensurado duas vezes por semana e uma vez por semana, respectivamente.

No final da décima semana de tratamento, após jejum de aproximadamente 12 horas (*overnight*), os animais foram anestesiados com 100µL i.p. de anestésico ketamina (80mg/Kg) e xilasina (15mg/Kg) em salina 0,9% e sofreram eutanásia por exanguinação. Os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram removidos, congelados e conservados em freezer -20°C até o momento do uso. O tecido adiposo epididimal foi utilizado para a avaliação das concentrações de CCL2, IL-6 e TNF- α . Para a avaliação dos parâmetros metabólicos o sangue foi coletado em tubos e então centrifugado à 3000 rpm por 20 minutos à 4°C para a obtenção do soro e armazenado à - 20°C para a dosagem posterior de glicose, triacilglicerol e colesterol total. O soro também foi utilizado para a dosagem de adiponectina e resistina por ELISA.

A tabela 1 apresenta a distribuição de macro e micronutrientes, e a densidade calórica provenientes da dieta HC, obtidos por meio de análise bromatológica realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG.

Tabela 1. Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle (Labina®) e dieta normocalórica/rica em carboidratos refinados (HC).

(%)	Dieta Controle	Dieta HC
Proteína	26,3	17,5
Lipídio	2,6	5,0
Carboidrato	55,6	64,8
Fibra bruta	6,2	4,1
Minerais	9,3	8,5
Energia (Kcal/g)	4,0	4,4

O consumo alimentar médio foi determinado a partir da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante na gaiola dos animais duas vezes por semana. O valor obtido foi dividido pelo número de dias dentro do intervalo de avaliação e novamente dividido pelo número de animais que estavam na caixa. O peso corporal foi avaliado uma vez por semana em balança semi-analítica com capacidade para 500 gramas e variação de 0,01 grama.

4.2. ENSAIOS EXPERIMENTAIS

4.2.1. Teste Oral de Tolerância à Glicose

O teste oral de tolerância à glicose ocorreu após jejum de aproximadamente 12 horas. Os animais receberam, por gavagem, D-glicose na dose de 2g/Kg de peso corporal, e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a introdução oral da solução de glicose, utilizando um glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA).

4.2.2. Extração de citocinas de tecidos

Fragmentos do tecido adiposo epididimal foram macerados em homogeneizador na presença de 1mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,89g diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10 min a 10000 r.p.m. a 4^oC e o infranadante recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA.

4.2.3. Determinação de citocinas por ELISA

Os kits de ELISA para a determinação de CCL2, TNF α , IL-6, adiponectina e resistina foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas e estão resumidamente descritas abaixo.

As amostras de tecido adiposo epididimal foram diluídas na proporção de 1:4 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. Já as amostras de soro foram diluídas 1:100 (resistina) e 1:10000 (adiponectina) também em PBS contendo 0,1% de albumina bovina.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Nunc, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em solução salina tamponada (PBS), sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4°C. A placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina por uma hora em temperatura ambiente, em seguida a curva padrão e as amostras diluídas foram colocadas na placa. A reação ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4°C. Os anticorpos de detecção foram diluídos em PBS, pH 7,4, com 0,1% de albumina bovina, e a sensibilização ocorreu durante 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação por 20 minutos com streptavidina conjugada com peroxidase e revelada com OPD (“o-phenyldiamine dihydrochloride”- Sigma). A reação foi interrompida com H₂SO₄ a 1M. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 490nm.

4.2.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

4.2.4.1. Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz

Os fragmentos do tecido adiposo epididimal com cerca de 50-100mg foram removidos e imersos em solução fixadora de formaldeído 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se várias etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95°, 100°), a diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia de luz.

4.2.4.2. Aquisição de imagens no microscópio e mensuração da área e perímetro

As lâminas para a determinação do tamanho dos adipócitos foram analisadas por meio de microscópio de luz, equipado com uma câmera digital (Motican 2500). O perímetro e a área seccional foram obtidos por meio da medida aleatória de 100 adipócitos por animal e posterior análise com o programa ImageJ para o processamento de imagens digitais.

4.2.5. Dosagens bioquímicas

O colesterol total e o triacilglicerol plasmático, assim como a glicemia foram quantificados utilizando Kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG).

4.2.6. Índice de adiposidade

O índice de adiposidade foi calculado de acordo com a proporção centesimal da adiposidade em relação ao peso corporal. A adiposidade foi representada pela soma dos três depósitos de gordura visceral mensurados nos experimentos (tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e mesentérico) (RIBOT et al, 2008).

4.2.7. Índice Adiponectina/Adiposidade Visceral

O índice adiponectina/adiposidade visceral foi calculado pela razão entre a concentração de adiponectina no soro e a soma dos três depósitos de gordura visceral mensurados nos experimentos (tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e mesentérico).

4.2.8. Índice Resistina/Adiposidade Visceral

O índice resistina/adiposidade visceral foi calculado pela razão entre a concentração de resistina no soro e a soma dos três depósitos de gordura visceral mensurados nos experimentos (tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e mesentérico).

4.2.9. Índice Adiponectina/Resistina

O índice adiponectina/resistina foi calculado pela razão entre a concentração de adiponectina no soro e a concentração de resistina no soro dos animais.

4.2.10. Análise Estatística

As comparações estatísticas entre os vários grupos foram realizadas por ANOVA “one way” seguida de Newman-Keuls. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste “t de student”. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Identificação da dose efetiva de Bindarit para a redução da produção de CCL2 no tecido adiposo induzido por três dias de dieta HC

5.1.1. Consumo alimentar e variação no peso corporal

Animais alimentados com a dieta HC durante três dias ingeriram quantidade maior de ração quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle (Figura 2A) e apresentaram menor perda de peso durante o período de manipulação dos animais (gavagem) (Figura 2B). O tratamento com o bindarit não interferiu na ingestão ou ganho de peso corporal dos animais (Figura 2A e B).

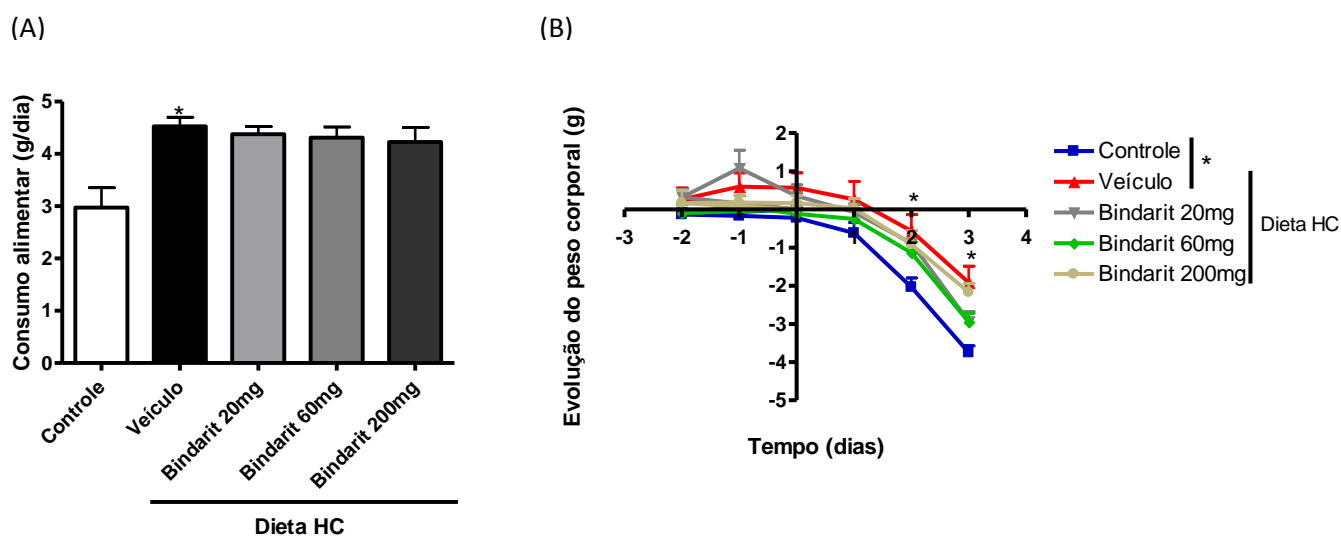


Figura 2: Avaliação do consumo alimentar e variação no peso corporal nos diferentes grupos alimentados durante 3 dias com dieta controle ou dieta HC e tratados ou não com o Bindarit. (A) Consumo alimentar médio referente ao pré-tratamento com a droga e aos três dias de ingestão de dieta controle ou dieta

HC concomitante ou não ao tratamento com o Bindarit; (B) Representação do ganho ponderal avaliado diariamente. As barras representam a média \pm erro padrão, n= 6; *p<0,05.

5.1.2. Adiposidade em animais alimentados por três dias com dieta HC associada ao tratamento com diferentes doses de Bindarit

O consumo de dieta HC por três dias aumentou a massa adiposa epididimal, retroperitoneal e mesentérica, sendo que as doses de Bindarit utilizadas não interferiram no aumento de tecido adiposo visceral induzido pela dieta HC (Figura 3).

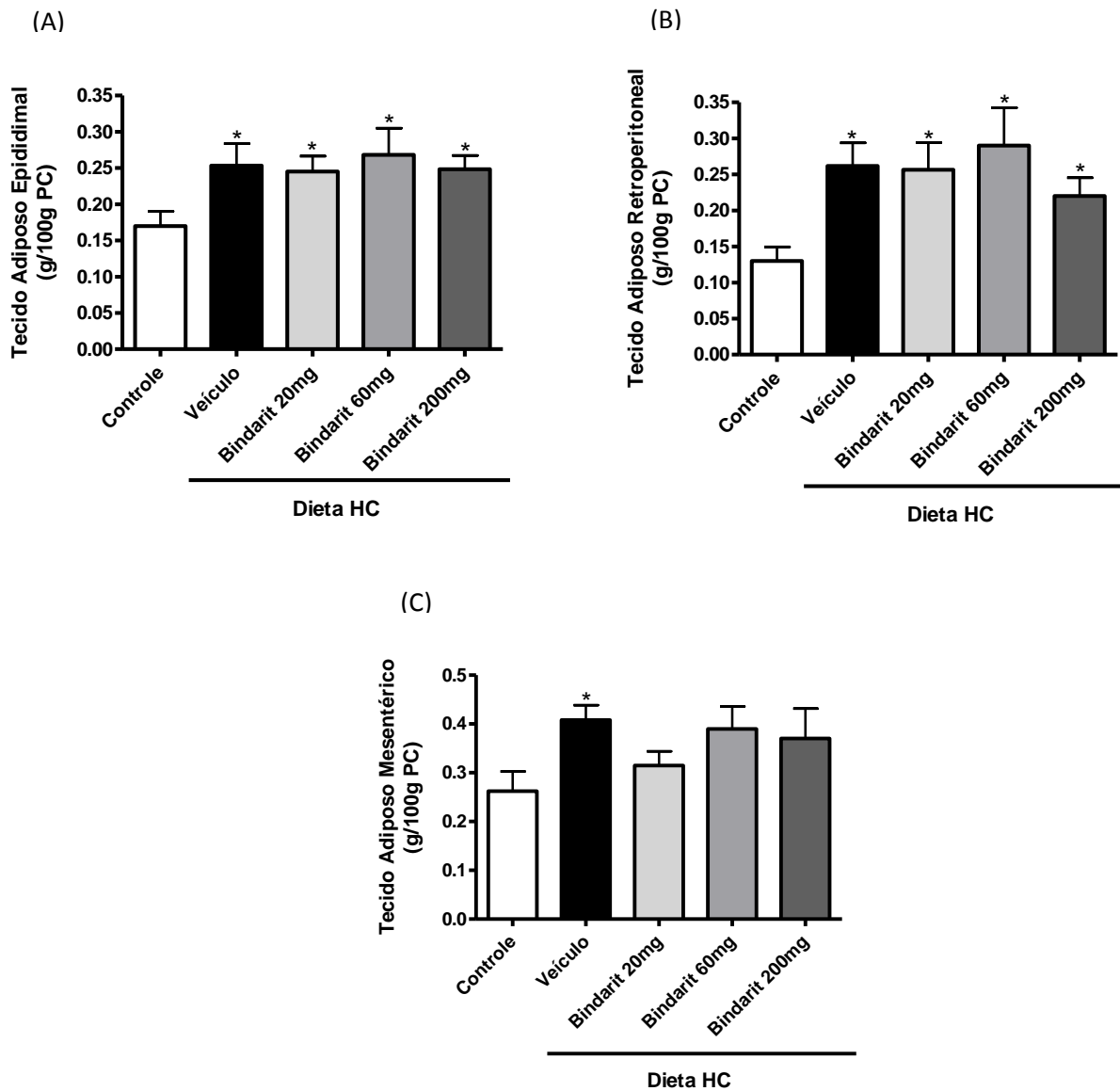


Figura 3: Biometria de três tecidos adiposos intraperitoneais de camundongos alimentados por três dias com dieta controle ou dieta HC e tratados ou não com o Bindarit. Peso dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e mesentérico (C). As barras representam a média \pm erro padrão, $n=6$; $*p<0,05$.

5.1.3. Inibição da produção de CCL2 por diferentes doses de Bindarit em animais alimentados por três dias com dieta HC

Animais alimentados por três dias com a dieta HC apresentaram maior concentração de CCL2 e TNF- α no tecido adiposo epididimal (Figura 4A e B). Não houve diferença na concentração de IL-6 nos diferentes grupos (dados não mostrados). As três doses de Bindarit testadas foram capazes de prevenir o aumento da concentração de CCL2 induzido pela dieta HC (Figura 4A). As doses da droga utilizadas não interferiram na concentração de TNF- α no tecido adiposo epididimal (Figura 4B).

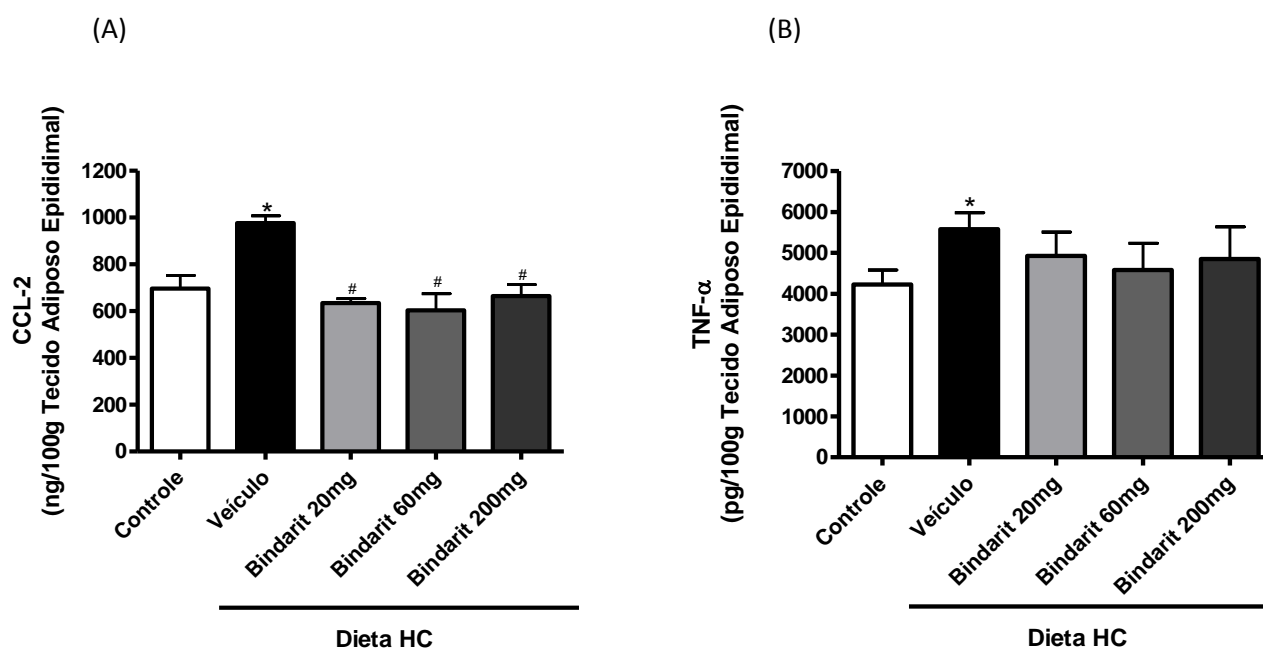


Figura 4: Concentração de mediadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal de animais alimentados por três dias com dieta controle ou dieta HC associada ou não a diferentes doses de Bindarit (20, 60 ou 200mg/kg de peso corporal). (A) CCL2 e (B) TNF- α mensurados por ELISA - As barras

representam a média \pm erro padrão, n=6. *p<0,05 em relação ao controle; #p<0,05 em relação ao grupo veículo.

A partir dos resultados desses experimentos e sabendo-se que não houve diferença entre as doses testadas, os próximos experimentos foram realizados com a dose de 100mg/kg de peso corporal uma vez ao dia.

5.2. Inibição do CCL2 não interfere no consumo alimentar, no ganho de massa corporal e na adiposidade induzida cronicamente por dieta HC

Conforme pode ser observado na figura 5, não houve diferença no consumo alimentar e no ganho de peso corporal nos animais alimentados por dez semanas com a dieta HC quando comparados ao grupo controle. Os animais tratados com o Bindarit, independente do momento de início do tratamento (grupos B(4-10) e B(8-10) não apresentaram diferença no consumo alimentar e ganho de massa corporal quando comparados ao grupo veículo.

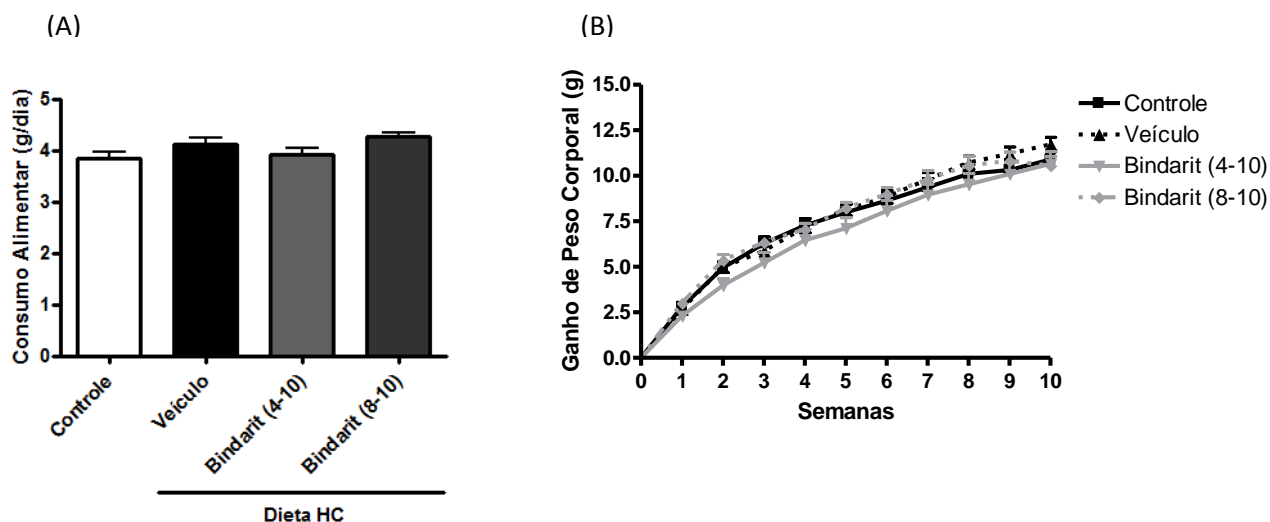


Figura 5: Avaliação do consumo alimentar e do ganho de peso corporal nos diferentes grupos alimentados cronicamente com dieta controle ou HC e tratados ou não com o Bindarit a partir da quarta ou da oitava à décima semana de experimento. (A) Consumo alimentar médio referente às dez semanas de ingestão de dieta controle ou dieta HC concomitante ou não ao tratamento com o Bindarit; (B) Representação do ganho ponderal avaliado semanalmente. As barras representam a média \pm erro padrão, $n= 8-10$.

Apesar de não haver diferença no consumo alimentar e no peso corporal dos animais que ingeriram a dieta HC em relação aos animais controle, observamos que os animais alimentados com a dieta HC apresentaram maior adiposidade quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle. O tratamento com o Bindarit não interferiu no índice de adiposidade dos animais alimentados com a dieta HC (Figura 6).

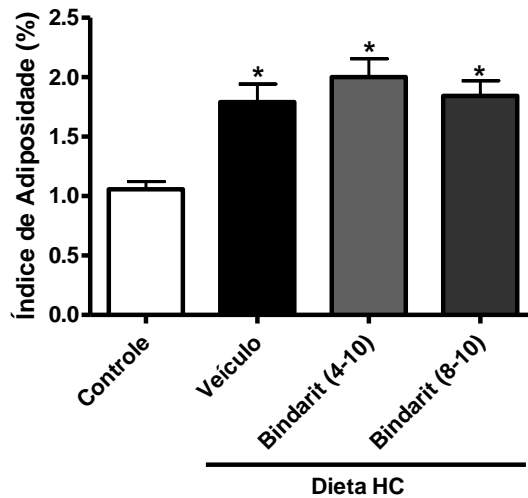


Figura 6: Índice de adiposidade em animais alimentados cronicamente com dieta HC e tratados ou não com Bindarit. Representação da proporção de tecido adiposo visceral (soma dos tecidos adiposo epididimal, retroperitoneal e mesentérico) no peso corporal dos camundongos. As barras representam a média \pm erro padrão, n=12; *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Como resultado da análise histológica do tecido adiposo epididimal dos animais alimentados por dez semanas com dieta HC encontramos que esses animais apresentaram maior área e maior perímetro dos adipócitos quando comparados aos animais alimentados com dieta controle. Observamos também que a inibição de CCL2 parece não interferir na hipertrofia dos adipócitos, visto que os animais tratados com o Bindarit não apresentaram diferença na área e no perímetro dos adipócitos quando comparados ao grupo veículo (Figura 7).

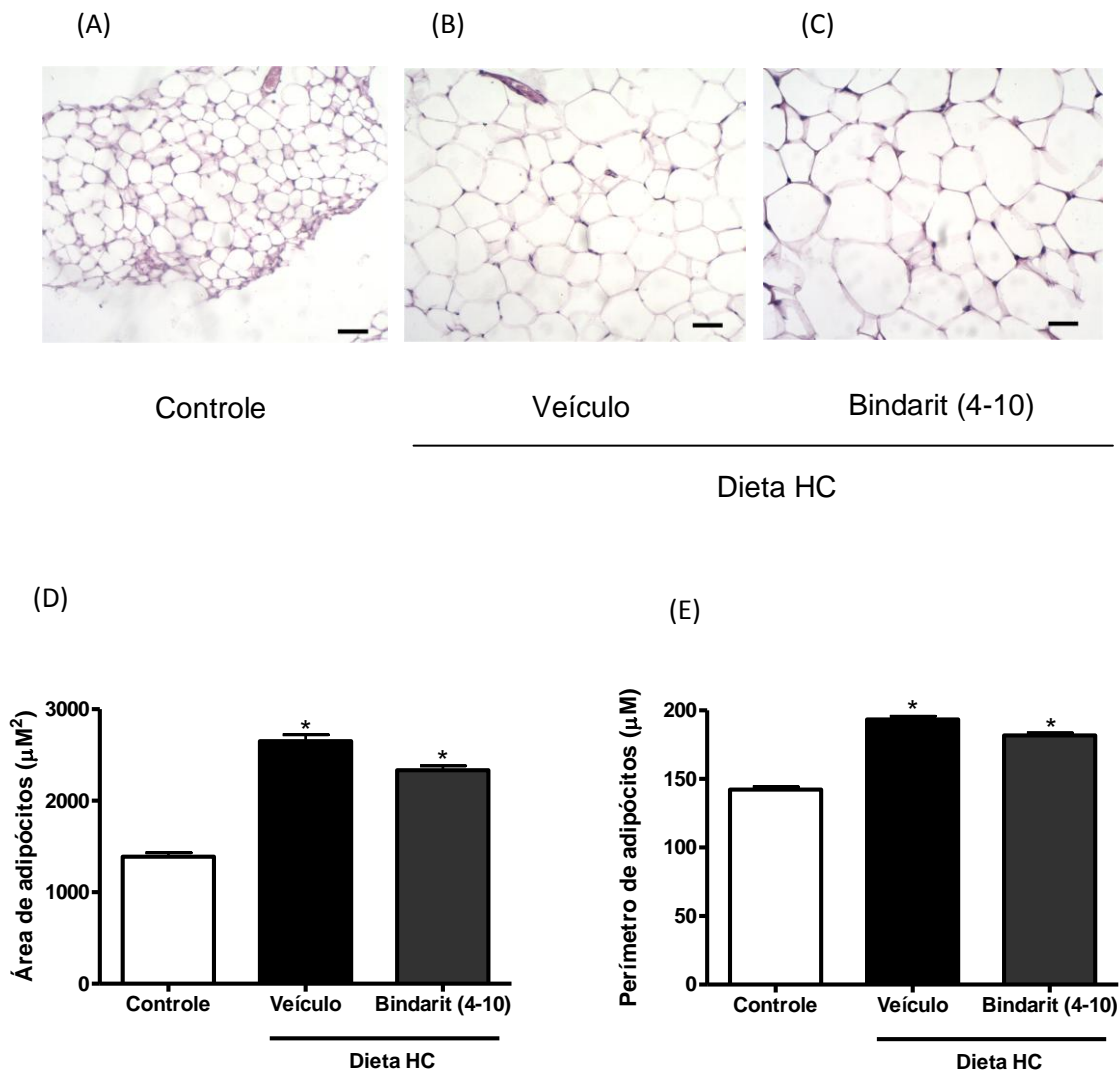


Figura 7: Análise histológica de seções do tecido adiposo epididimal de animais alimentados com dieta controle e dieta HC associada ou não ao tratamento com Bindarit. Imagem representativa da histologia do tecido adiposo epididimal do grupo controle (A), veículo (B) e Bindarit (4-10) (C) (10X) as barras de escala representam 50µm. Determinação da área (D) e do perímetro (E) de adipócitos do tecido adiposo epididimal de animais alimentados com dieta controle ou dieta HC associada ou não ao tratamento com bindarit da quarta à décima semana de experimento. As barras representam a média \pm erro padrão, n=3-5; *p<0,05 em relação ao grupo controle.

5.3. Inibição de CCL2 em animais com adiposidade induzida cronicamente por dieta HC

Os animais alimentados com dieta HC e tratados com bindarit a partir da quarta ou da oitava à décima semana de dieta apresentaram menor concentração de CCL2 quando comparados aos animais alimentados com a dieta HC não tratados com a droga (Figura 8).

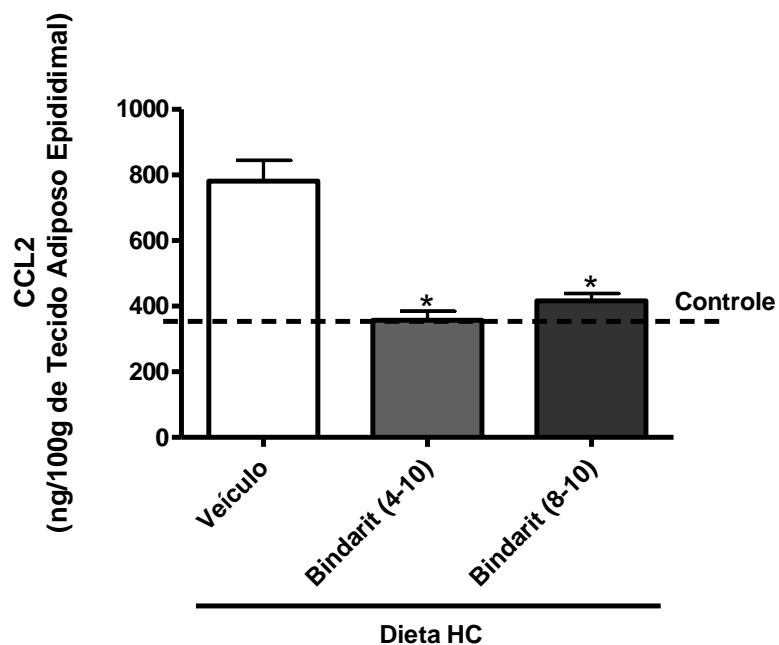


Figura 8: Concentração de CCL2 no tecido adiposo epididimal de animais alimentados por dez semanas com dieta HC e tratados ou não com o Bindarit da quarta ou da oitava à décima semana. Método: ELISA. As barras representam a média \pm erro padrão, $n=8$. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo.

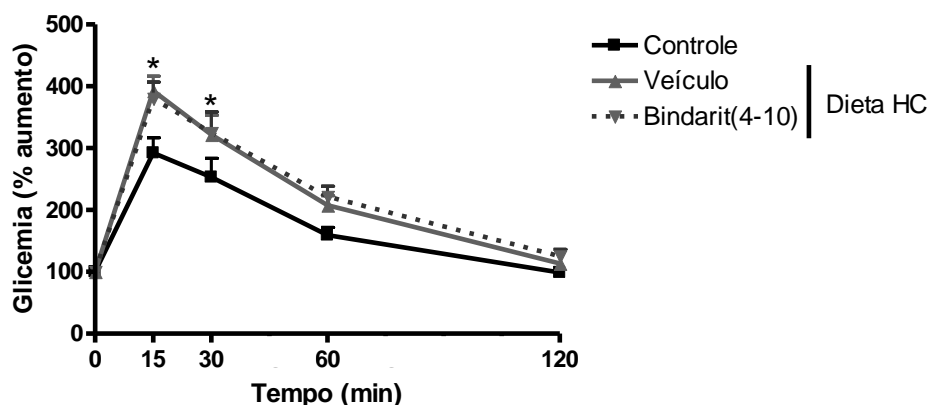
5.4. Avaliação de parâmetros metabólicos em animais alimentados com dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit

Animais alimentados com dieta HC não apresentaram diferença na concentração sérica de colesterol, triglicérides e glicose em relação ao grupo controle. O tratamento com o Bindarit não alterou esses parâmetros metabólicos (dados não mostrados).

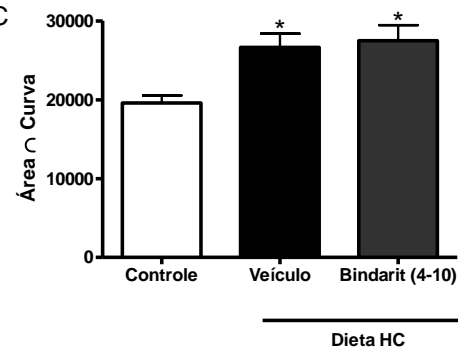
5.5. Intolerância à glicose induzida cronicamente pela dieta HC associada ao tratamento com o Bindarit

Animais alimentados com dieta HC apresentaram menor tolerância à glicose na nona semana de dieta em relação aos animais controles (Figura 9). A inibição da produção de CCL2, tanto a partir da quarta (Figura 9 A.1 e 9 A.2) quanto a partir da oitava semana experimental (Figura 9 B.1 e 9 B.2), não interferiu na ocorrência de intolerância à glicose induzida pela dieta HC.

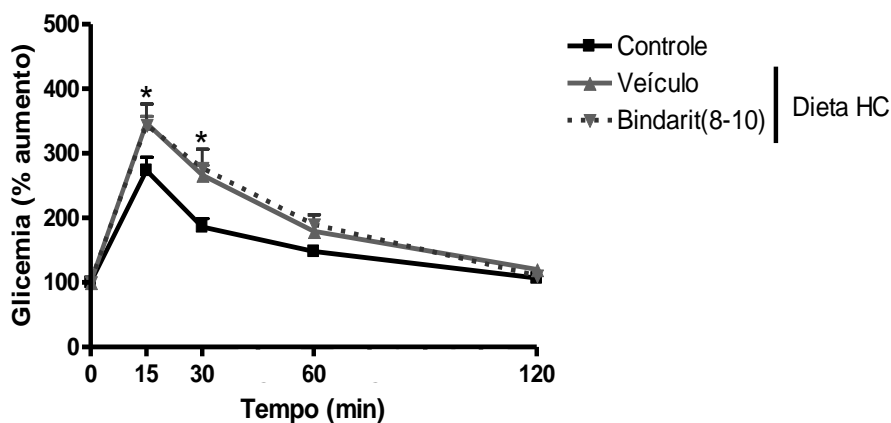
(A.1)



(A.2)



(B.1)



(B.2)

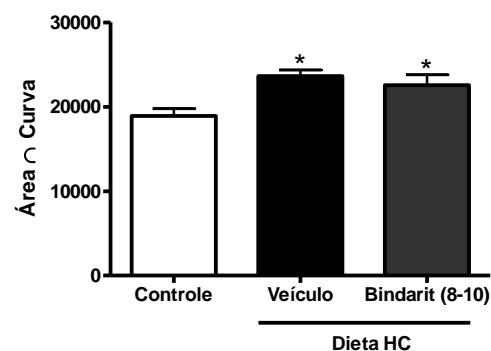


Figura 9: Teste oral de tolerância à glicose em animais alimentados com dieta controle ou dieta HC associada ou não ao tratamento com o Bindarit a partir da quarta ou da oitava à décima semana de experimento. Representação gráfica do aumento da glicemia induzido por dieta HC em relação aos animais alimentados com a dieta controle (A.1) e (B.1) da AUC (A.2) e (B.2). As barras representam a média \pm erro padrão, n=12. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

5.6. Concentração sérica de adiponectina e resistina e a relação dessas adipocinas com a adiposidade

Animais alimentados com dieta HC apresentaram menor concentração de adiponectina e maior concentração de resistina séricas quando comparados aos animais alimentados com dieta controle. O tratamento com o Bindarit não interferiu na concentração sérica dessas adipocinas (Figura 10). Avaliamos também a relação adiponectina/resistina e a relação dessas adipocinas com a adiposidade dos animais. Todas essas relações enfatizaram o efeito da dieta HC na redução da concentração de adiponectina e aumento da concentração de resistina em relação aos animais controles, e a inibição de CCL2 não interferiu na produção dessas adipocinas.

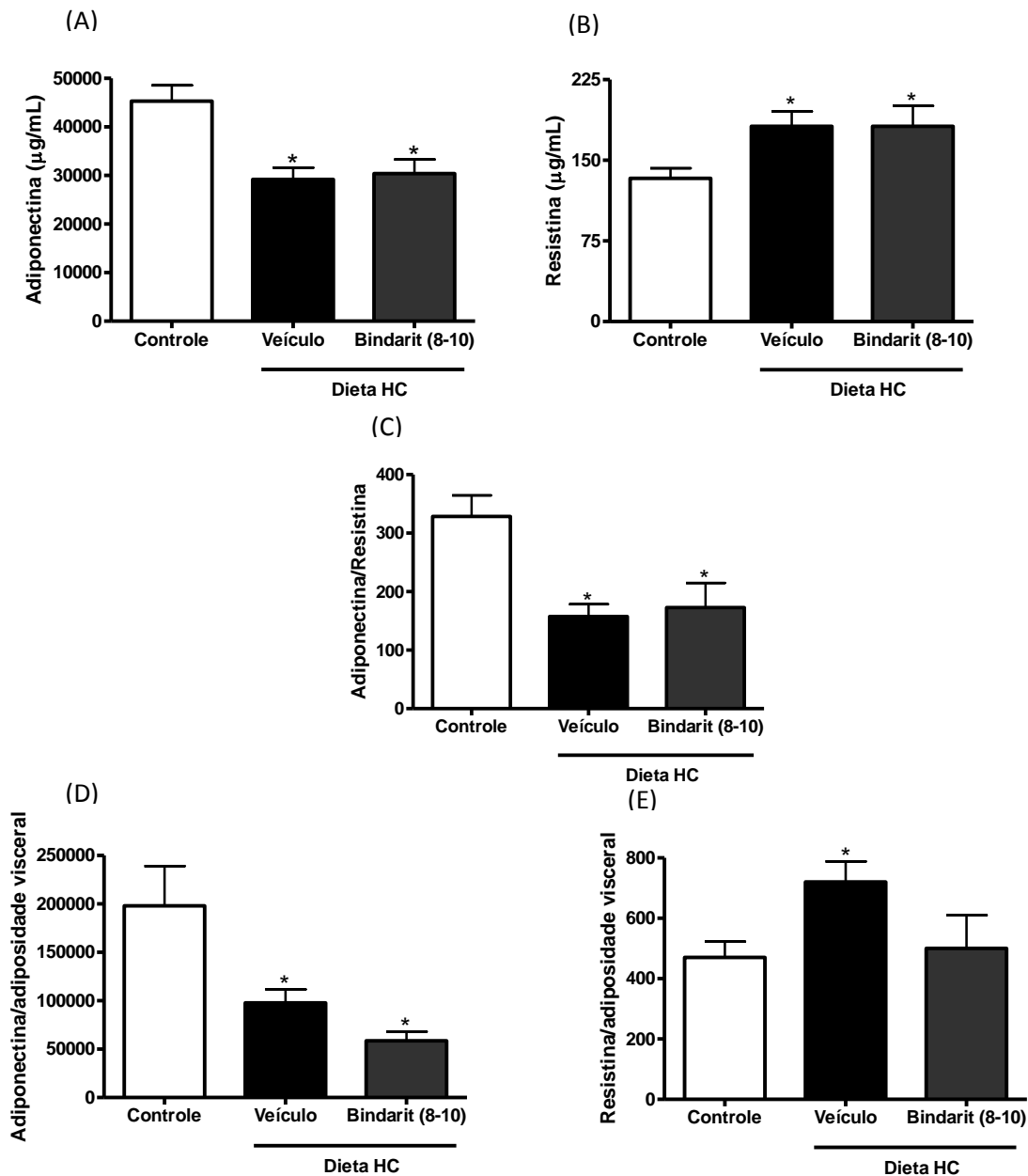


Figura 10. Concentração de adiponectina e resistina séricas em animais alimentados por dez semanas com dieta HC tratados ou não com o Bindarit da oitava à décima semana de dieta HC. Concentração sérica de adiponectina (A), e resistina (B), relação adiponectina/resistina (C), relação adiponectina/adiposidade visceral (D) e relação resistina/adiposidade visceral (E). Método: ELISA. As barras representam a média \pm erro padrão, $n=6-8$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a dieta rica em carboidratos refinados promove aumento de adiposidade em modelos animais alimentados tanto por um curto período de tempo (3 dias) quanto cronicamente (10 e 12 semanas) (Oliveira MC et al. *Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by normocaloric/high-carbohydrate diet in mice*. Manuscrito submetido em 2011; Menezes Z et al, manuscrito sendo em fase de edição - comunicação pessoal). Além disso, o aumento de adiposidade induzido pela dieta HC está associado a alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas e localizadas em sítios metabólicos chaves como o tecido adiposo e fígado. Esse modelo é caracterizado pelo aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias como CCL2 no tecido adiposo e foi utilizado com objetivo de estudar se o inibidor da produção de CCL2, o Bindarit, era capaz de alterar a resposta metabólica e inflamatória induzida pela dieta HC. Entretanto, os animais alimentados com a dieta HC e tratados com a droga, apesar da inibição da produção de CCL2, não apresentaram melhora na tolerância à glicose e/ou alteração no perfil de secreção de adipocinas ligadas à indução da resistência à insulina.

Os animais alimentados cronicamente com a dieta HC apresentaram adiposidade maior, determinada pelo aumento da proporção de tecido adiposo visceral em relação ao peso corporal total dos animais. Além de concentração maior de moléculas pró-inflamatórias e menor tolerância à glicose quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle. No entanto, a concentração de colesterol, triglicérides e glicose séricos não apresentaram diferença entre os grupos. Assim, os animais desafiados com a dieta HC constituem um modelo válido para avaliação da expansão exacerbada do

tecido adiposo associada à concentração maior de moléculas pró-inflamatórias e consequente alteração na tolerância à glicose.

Nesse estudo, a expansão do tecido adiposo foi caracterizada pela hipertrofia dos adipócitos, ou seja, pelo acúmulo maior de triacilgliceróis no interior das células. A quantidade de triacilgliceróis nos adipócitos é controlada por três vias metabólicas: 1) – lipogênese, processo no qual ocorre a síntese *de novo* de ácidos graxos e posteriormente reesterificação desses, a triacilglicerol. A lipogênese é mediada pela enzima acil-CoA carboxilase que catalisa a carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA (SHI e BURN, 2004). 2) – Captação de ácidos graxos presentes nas lipoproteínas circulantes – Esse processo ocorre por intermédio da enzima lipase lipoprotéica (LPL). Essa enzima encontra-se na superfície do endotélio vascular e catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis presentes em lipoproteínas circulantes (SHI e BURN, 2004). 3) – lipólise, processo no qual há quebra das moléculas de triacilglicerol, presentes nos adipócitos, em ácidos graxos e glicerol. A enzima lipase hormônio sensível (LHS) é essencial nesse processo (SHI e BURN, 2004). As enzimas chaves na ativação dessas vias metabólicas são reguladas de acordo o estado alimentar dos animais, principalmente segundo a concentração de insulina. E nesse estudo os animais alimentados com dieta HC apresentaram intolerância à glicose o que, possivelmente poderia acarretar uma hiperinsulinemia compensatória, resultando em menor resposta à ação da insulina e desequilíbrio no controle do estoque de triacilgliceróis nos adipócitos. Essas observações são consistentes com estudos prévios que demonstraram que animais obesos apresentam lipólise basal maior no tecido adiposo quando comparados a animais controles (DUCAN et al., 2007, KOSTELI et al., 2010).

Estudo de Kosteli e colaboradores (2010) demonstrou ainda, que a lipólise no tecido adiposo modula o recrutamento de macrófago e a captação de lipídios. Isso porque segundo esses autores quando a lipólise é ativada e a concentração de ácidos graxos livres é aumentada, ocorre um rápido acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, esse processo ocorreria no intuito de controlar a concentração de ácidos graxos livres, no entanto, a estimulação crônica de macrófagos no tecido adiposo promove inflamação local e alterações na função metabólica (KOSTELI et al., 2010).

Nossos resultados demonstram a ocorrência de intolerância à glicose induzida pela dieta HC, acompanhada de concentração menor de adiponectina e concentração maior de resistina comparadas às concentrações dessas adipocinas nos animais alimentados com dieta controle. Esses dados estão de acordo com estudos prévios nos quais foi investigada a relação entre essas adipocinas e as alterações metabólicas induzidas pela adiposidade. Ribot e colaboradores (2008) observaram concentração menor de adiponectina e concentração maior de resistina em animais com obesidade induzida por dieta de cafeteria (dieta palatável e rica em lipídios). Segundo esses autores, a alteração na concentração dessas adipocinas correlacionou-se positivamente com a progressão da obesidade e com o desenvolvimento de resistência à insulina (RIBOT et al., 2008). A partir dos dados expostos, podemos sugerir que a intolerância à glicose encontrada nos animais alimentados com a dieta HC ocorreu devido, pelo menos em parte, ao desequilíbrio entre a produção de adiponectina e resistina. Outros estudos também observaram concentração menor de adiponectina na obesidade e indicaram essa adipocina como uma molécula protetora contra disfunções metabólicas induzidas pela expansão do

tecido adiposo (KERSHAW e FLIER, 2004; KADOWAKI et al., 2006; HOTTA et al., 2000, IWABU et al., 2010). O estudo de Stepan e colaboradores (2001) avaliou a concentração de resistina, adipocina conhecida por ter ação oposta à adiponectina na modulação do metabolismo de glicose, esses autores observaram concentração de resistina aumentada em modelos de obesidade induzida por dieta rica em lipídios, bem como em modelos genéticos de obesidade e resistência à insulina. Esses autores encontraram relação positiva entre a resistina e a indução de resistência à insulina *in vivo* (STEPAN et al., 2001). A importância da concentração de adiponectina e resistina na indução de alterações metabólicas induzidas pela adiposidade também tem sido estudada em humanos. Vendrell e colaboradores (2004) encontraram concentração menor de adiponectina e concentração maior de resistina em humanos obesos. Hivert e colaboradores (2008) encontraram correlação positiva entre a concentração menor de adiponectina e a ocorrência de resistência à insulina em humanos obesos. Ressalta-se que, diferentemente da adiponectina, o papel da resistina na indução da resistência à insulina em humanos (LENRKE et al., 2004; STEPPAN et al., 2005) ainda não está bem esclarecido.

Sabe-se que há maior acúmulo de macrófagos e maior concentração da quimiocina CCL2 no tecido adiposo de animais e humanos obesos (XU et al., 2003; WEISBERG et al., 2003; SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; YU et al., 2006; ZHOU et al., 2007; KANDA et al., 2006; CRISTIANSEN et al., 2005; KIM et al. 2006; NOMURA et al., 2000). A partir dessa observação sugeriu-se que a quimiocina CCL2 fosse fundamental para o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo de animais com obesidade induzida por dieta e para a manutenção do

estado de inflamação crônica característico do aumento de adiposidade. Assim, nesse estudo avaliamos os efeitos da inibição da produção de CCL2 no modelo de adiposidade induzida por dieta.

Vários estudos indicam correlação positiva entre a inibição da interação CCL2/CCR2 no influxo de macrófagos para o tecido adiposo e melhora dos parâmetros metabólicos e inflamatórios (KANDA et al., 2006; WEISBERG et al., 2006; TAMURA et al., 2010). Tamura e colaboradores (2010), por exemplo, demonstraram que a supressão da funcionalidade do CCR2 promove menor influxo de macrófagos para o tecido adiposo, melhora da resistência à insulina e da esteatose hepática durante o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta. No entanto, o fato de outros estudos não terem encontrado a mesma correlação (INOUE et al., 2007; KIRK et al., 2008), torna controverso o papel de CCL2 na ocorrência de alterações inflamatórias e metabólicas promovidas pelo aumento da adiposidade.

Como observado, em nosso estudo os animais alimentados com a dieta HC apresentaram concentração de CCL2 maior quando comparados ao grupo alimentado com a dieta controle. Porém, a inibição de sua produção por meio do Bindarit, não interferiu na adiposidade ou na intolerância à glicose induzidos pela dieta HC. Da mesma forma, Inouye e colaboradores (2007) estudaram o papel de CCL2 no recrutamento de macrófagos e na função metabólica, utilizando um modelo de obesidade induzida por dieta rica em lipídios em animais com deleção genética para essa quimiocina. Esses autores demonstraram que apesar dos animais não produzirem CCL2 não houve diferença no influxo de macrófagos para o tecido adiposo desses animais

quando comparados aos controles (INOUYE et al., 2007). Além disso, tanto os animais com deleção de CCL2 quanto os animais selvagens alimentados com a dieta rica em lipídios apresentaram hiperinsulinemia e redução da concentração de adiponectina (INOUYE et al., 2007). Kirk e colaboradores (2008) também não encontraram diferença no acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, entre animais com deleção genética de CCL2 e animais selvagens alimentados com dieta rica em lipídios .

Outros estudos sobre a importância de CCL2 no recrutamento de macrófagos em modelos de expansão do tecido adiposo estão de acordo com nossos resultados e com os estudos anteriormente citados. Esses não encontraram relação positiva entre a inibição da sinalização de CCL2 via deleção genética do receptor CCR2 e prevenção do influxo de macrófagos para o tecido adiposo, bem como a ocorrência de alterações metabólicas. Como exemplo, o estudo de Chen e colaboradores (2005) demonstrou que os animais com ausência do CCR2 não apresentaram resistência à obesidade induzida por dieta rica em lipídios e não possuíram menor influxo de macrófagos para o tecido adiposo (CHEN et al., 2005). Os nossos resultados juntamente com os estudos citados acima indicam que outros fatores podem influenciar o recrutamento de macrófagos e as consequentes alterações metabólicas induzidas pelo processo inflamatório associado à expansão do tecido adiposo.

Apesar da inibição da sinalização de CCL2, via bloqueio da produção da quimiocina, geneticamente ou por meio de droga, e também pela não interação com o CCR2, é importante lembrar que pode ocorrer uma quimiotaxia redundante, na qual as quimiocinas CCs, como CCL-7 e CCL-8, ligam-se a

diferentes receptores como CCR1 ou CCR3 (CHEN et al., 2005). Além disso, CCL2 pode interagir com outros receptores na ausência do CCR2 (KIRK et al., 2008). Outro fato relevante é a complexidade do processo inflamatório no tecido adiposo, que envolve inúmeras adipocinas (CHEN et al., 2005).

A partir dos resultados encontrados em nosso estudo, CCL2 parece não possuir papel na tolerância à glicose, já que a inibição da produção dessa quimiocina pelo Bindarit, não interferiu na ocorrência de intolerância à glicose, menor concentração de adiponectina e maior concentração de resistina nos animais alimentados com a dieta HC. Assim, sugerimos que a inibição da quimiocina CCL-2 não possui efeitos críticos no desenvolvimento da adiposidade e consequente intolerância à glicose induzidos por dieta HC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA R S e FLIER J S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 11: 327-32, 2000;

ALBRIGHT A L e STERN, J S. Adipose tissue. *Encyclopedia of sports medicine and science*, T.D.Fahey (editor). Internet Society for Sport Science: <http://sportsci.org>, 1998;

BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568, 1998;

BARRETO S A J e CYRILLO D C. Análise da composição dos gastos com alimentação no Município de São Paulo (Brasil) na década de 1990. *Revista de Saúde Pública*, 35:52-59, 2001;

BHATIA M et al. Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:1259-1265, 2005;

BHATIA M et al. Treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 synthesis, protects mice against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Inflammation Research.* 57:464–471, 2008;

BOUHLEL M A et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 6:137-143, 2007;

CIOLI V et al. A new protein antidenaturant agent, bindarit, reduces secondary phase of adjuvant arthritis in rats. *J Rheumatol* 19:1735-1742, 1992;

CHARO I F e PETERS W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation.* 10:259-264, 2003;

CHARO I F e TAUBMAN M B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* 95:858–866, 2004;

CHARO I e RANSOHOFF R M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621, 2006;

CHEN A et al. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obesity Research*. 13(8), 2005;

CHRISTIANSEN T, RICHELSEN B e BRUUN JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)*; 29:146–150, 2005;

DUCAN R E, et al. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*. 27:79-101, 2007;

FAIN JN e GARCIA-SAINZ JA. 1983. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid Res*. 24:945–66

FAIN J N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74:443-477, 2006;

FLIER J S et al. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237:405-408, 1987;

FRUHBECK R S et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280:E827-E847, 2001;

GALEAZZI M A M, DOMENE S M A e SICHIERI R. Estudo multicêntrico sobre consumo alimentar. *Cad Debate*. (Volume especial):11-60,1997;

GRASSIA G et al. The anti-inflammatory agent bindarit inhibits neointima formation in both rats and hyperlipidaemic mice. *Cardiovascular Research Advance Access*. July 31, 2009;

GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 3:23-35, 2003;

GUGLIELMOTTI A et al. Chronic inflammatory response in the rat can be blocked by bindarit. *Biochem Mol Biol Int* 29: 747-756, 1993;

GUGLIELMOTTI A et al. Amelioration of rat adjuvant arthritis by therapeutic treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 and TNF- α production. *Inflamm Res*. 51:252-258, 2002;

HAUSMAN D B et al. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239-254, 2001;

HIROSUMI J et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336, 2002;

HIVERT M-F et al. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 93(8):3165-3172, 2008;

HOTAMISLIGIL G S, SHARGILL, N S e SPIEGELMAN, B M. Adipose expression of tumor necrosis factor α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993;

HOTAMISLIGIL G S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867, 2006;

HOTTA K et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscle. Thromb. Vasc. Biol*. 20:1595-1599, 2000;

IBRAHIM M M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev*. 11, 11-18, 2009;

INOUE E K et al. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes*. 56:2242-2250, 2007;

IWABU M et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature*. 464:1313-1319, 2010;

KADOWAKI T et al. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 228:1111–1117, 2003;

KADOWAKI T et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 116:1784–1792, 2006;

KAMEI N et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein – 1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 281: 26602-26614, 2006;

KANDA H et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494-1505, 2006;

KERSHAW E E e FLIER J S. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(6): 2548-2556, 2004;

KIM C S et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)*; 30:1347–1355, 2006;

KIRK E A et al. Monocyte Chemoattractant protein-1 deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. *Diabetes*. 57:1254-1261, 2008;

KITAMURA T et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serinethreonine kinase Akt. *Mol Cell Biol*. 19:6286-96, 1999;

KRALISCH S et al. Isoproterenol stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression and secretion in 3t3-L1 adipocytes. *Regulatory Peptides* 135:12-16, 2006;

KRAUSGRUBER T et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and Th1-Th17 responses. *Nature Immunology*. 12(3):231-238, 2011;

KOSTELI A et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 120 (10):3466-3479, 2010;

LARGE V et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30:294–309, 2004;

LEHRKE M et al. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *Plos Medicine.* 1(2):161-168, 2004;

LI S et al. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 302. 179-188, 2009;

LIN J et al. Monocyte chemoattractant proteins mediate myocardial microvascular dysfunction in swine renovascular hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 2009;

LUMENG C N, BODZIN J L e SALTIEL A R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 117:175-184, 2007;

MARTINEZ F O, HELMING L e GORDON S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 451-483, 2009;

BRASÍLIA. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel 2010). Brasília, 2011. Disponível em; http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel_180411.pdf. Acessado em agosto, 2011;

MIROLO M, FABBRI M, SIRONI M, VECCHI A, GUGLIELMOTTI A, MANGANO G, BIONDI G, LOCATI M e MANTOVANI A. Impact of the anti-inflammatory agent bindarit on the chemokine: selective inhibition of monocyte chemotactic chemotactic proteins. *Eur. Cytokine Netw.* 19(3) 119-122, 2008;

MONTAVANI A et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686, 2004;

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

NESTEL PAUL M D. Nutritional aspects in the causation and management of the metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 33, 483-492, 2004;

NOMURA S et al. Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol*; 121:437–443, 2000;

ODEGAARD J I et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447:1116-1120, 2007;

OUCHI N et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 14:561-566, 2003;

OUCHI N et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Rev.* 11. 85-97, 2011;

PICARD F et al. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes.* 48(3):452-9, 1999;

POPKIN B M. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World Development*, 27:1905-1916, 1999;

POPKIN B M. The nutrition transition and obesity in the developing world. *Journal of Nutrition*, 131:871-873, 2001;

RAMNATH R D et al. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *International Immunopharmacology.* 8:810-818, 2008;

RIBOT J et al. Adiponectin and Resistin Response in the Onset of Obesity in Male and Female Rats. *Obesity.* 16:723–730, 2008;

ROLLINS B J. Chemokines. *Blood* 90: 909-928, 1997;

RULLI N E et al. Amelioration of Alphavirus-induced arthritides and myositis in a mouse model by treatment with Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. *Arthritis & Rheumatism.* 60(8) 2513-2523, 2009;

RYA M et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J.* 68, 975-981, 2007;

SARTIPY P e LOSKUTOFF D J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7265–7270, 2003;

SELL HENRIKE e ECKEL JURGEN. Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr Opin lipidol* 18:258-262, 2007;

SCHENK S, SABERI M e OLEFSKY M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation.* 118(9):2992-3002, 2008;

SHI Y e BURN P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nature Reviews.* 3:695-710, 2004;

SIITERI P K. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr,* 45:277-282, 1987;

SIRONI M et al. A small synthetic molecule capable of preferentially inhibiting the production of the CC chemokine monocyte chemotactic protein-1. *European Cytokine Network.* 10(3):437-42,1999;

STEPPAN C M et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409:307–312, 2001;

STEPPAN C M et al. Activation of SOCS-3 by resistin. *Molecular and Cellular Biology.* 25:1569-1575, 2005;

TAMURA Y et al. C-C Chemokine Receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 17 (3). 000-000, 2010;

TOMAS E et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. acad. Sci. USA.* 99:16309-16313, 2002;

VENDRELL J et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity Research*.12(6): 962-971, 2004;

WELLEN KE e HOTAMISHIGIL G S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785-1788, 2003;

WEISBERG S et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003;

WEISBERG S et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116:115-124, 2006;

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva:147-165, 2004;

WU D et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332:243-247, 2011;

YAMAUCHI T et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature med.* 8: 1288-1295, 2002;

YU RINA 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* 14 No. 8, 2006;

XU H et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830, 2003;

ZHANG Y et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432,1994;

ZHU X Y. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 contributes to renal dysfunction in swine renovascular hypertension. *Journal of Hypertension* vol 00, n° 00, 2009;

ZHOU R H et al. Obesity-associated mouse adipose stem cell secretion of monocyte chemotactic protein-1. *American Journal Physiol Endocrinol Metab.* 293:E1153-E1158, 2007;

ZOJA C et al. Bindarit retards renal disease and prolongs survival in murine lupus autoimmune disease. *Kidney International.* 53:726-734,1998.