

**CAROLINE CANDIDA DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO METOTREXATO SOBRE  
AS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS ASSOCIADAS À  
OBESIDADE.**

**Bragança Paulista**

**2010**

**CAROLINE CANDIDA DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO METOTREXATO SOBRE  
AS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS ASSOCIADAS À  
OBESIDADE.**

**Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Gambero**

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação  
*stricto sensu* em Ciências da  
Saúde da Universidade São  
Francisco (USF) para  
obtenção do título de Mestre  
em Ciências da Saúde.

**Bragança Paulista**

**2010**

WD 210  
O46a

Oliveira, Caroline Cândida de.  
Avaliação da ação do Metotrexato sobre as alterações  
inflamatórias associadas à obesidade / Caroline Cândida de  
Oliveira. -- Bragança Paulista, 2010.  
49 p.

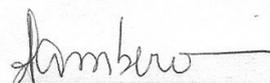
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São  
Francisco.

Orientação de: Alessandra Gambero.

1. Imunossupressão. 2. Inflamação. 3. Obesidade.  
4. Adipocinas. 5. Metotrexato. I. Gambero, Alessandra.  
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

OLIVEIRA, Caroline Cândida de. “Avaliação da ação do metotrexato sobre as alterações inflamatórias associadas à obesidade”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e quatro de Agosto de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Alessandra Gambero - Orientadora e Presidente  
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Denny Esper Corrêa Cintra  
Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro  
Universidade São Francisco

## **À minha família**

“Por terem acreditado em meu potencial, mesmo quando nem eu mesma não acreditava mais”. Obrigada por tudo.

## **Agradecimentos**

À Professora Dra. Alessandra Gambero por tudo. Pela amizade, por acreditar em mim, me encorajando a fazer coisas que eu achava que não conseguiria. Obrigada!

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Biotério da Universidade São Francisco, Sr. Lázaro e Paulo, por sempre nos ajudarem nos cuidados com nossos animais.

Érica, Eloá, Tanila, Karin, Beatriz, Nathália, Marisa, Waldemar e Demétrius, que de colegas de trabalho, passaram a ser verdadeiros amigos.

Aos meus amigos: Elizangela e Evandro. Em especial, Simone, obrigada por tudo! Por sempre me ajudar, seja no laboratório ou fora dele, compartilhando as mesmas idéias “loucas” que surgiam durante os nossos dias no laboratório. Ao Tiago por sempre estar ao meu lado.

*“A persistência é o caminho do êxito”*

**Charles Chaplin**

## LISTA DE ABREVIATURAS

A1AdoR – receptores de adenosina A1

Akt/PKB – Akt/Proteína cinase B

AMP cíclico – Monofosfato Cíclico de Adenosina

AMPK – Proteína cinase ativada por AMP

ANOVA – Análise de variância

BSA – Soro albumina bovina

C/EBP- $\alpha$  – (CCAAT-enhancer-binding protein alpha) protein ligadora e aumentadora CCAAT-alfa

DMEM – (Dulbecco's modified Eagle's medium) Meio modificado Dulbecco Eagle

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPCPX – 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Imunoensaio enzimático

EPM – Erro padrão da média

HDL-c – (high-density lipoprotein) Lipoproteína de alta densidade

IBMX– 3-isobutil-1-metilxantina

IL-1 – Interleucina 1

IL-10 – Interleucina 10

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

iNOS – (Inductible Nitric Oxide Synthase) óxido nítrico sintase induzida

IRS-1 – (Insulin receptor substrate 1) Substrado 1 do receptor de insulina

ITT – Teste de Tolerância a Insulina

Jnk – c-Jun N-terminal cinase

Kitt – Constante de Inclinação da Curva obtida com o teste de tolerância à insulina

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1 – (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> – Ortovanadato de Sódio

Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> – Pirofosfato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaF – Fluoreto de Sódio

NAFLD – (Non-alcoholic fatty liver disease) doença não-alcoólica do fígado gorduroso

NFκB – nuclear factor kappa B

NPY – Neuropeptídeo Y

p-Jnk – fosfo c-Jun N-terminal cinase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPAR-γ – (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama

RANTES – (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted*) Secretado e expresso por Células T normais e regulados sobre ativação

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

Socs-3 – (Suppressor of cytokine signaling-3) sinalizador de supressão de citocina-3

Th1 – T *helper* 1

Th2 – T *helper* 2

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa

Tris – Tris(hidroximetil)-aminometano

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Divisão dos animais nos grupos experimentais

**Figura 2.** Peso corpóreo dos animais Controle, DH, MTX 1mg, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 3.** Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal e perirenal dos animais Controle, DH, MTX 1mg, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 4.** Controle de ingestão de dieta dos animais Controle, DH, MTX 1mg, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 5.** Níveis glicêmicos dos animais Controle, DH, MTX 1mg, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 6.** Teste de tolerância à insulina dos animais Controle, DH, MTX 1mg, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 7.** Adiponectina liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 8.** IL-10 liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais do grupo Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 9.** Leptina liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 10.** TNF- $\alpha$  liberado *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 11.** IL-6 liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 12.** Expressão da proteína F4/80 no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 13.** Expressão da proteína MCP-1 no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 14.** Expressão da proteína iNOS no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 15.** Expressão da proteína iNOS no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 16.** Lipólise basal no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg.

**Figura 17.** Lipólise basal em cultura de 3T3-L1 na ausência (controle) e presença de metotrexato.

**Figura 18.** Lipólise basal em cultura de 3T3-L1 na presença de metotrexato 3 ug/ml e DPCPX 0,1 e 1,0 ug/ml.

**Figura 19.** Lipólise basal em cultura isolada de 3T3-L1, co-cultura de 3T3-L1 e RAW 267.4 na ausência e presença de metotrexato 3 ug/ml e DPCPX 0,1 e 1,0 ug/ml.

**Figura 20.** IL-6 no sobrenadante de cultura isolada de 3T3-L1 (Painel A), de RAW 267.4.

**Figura 21.** IL-10 no sobrenadante de cultura isolada de 3T3-L1 (Painel A), de RAW 267.4.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição de macronutrientes da dieta.

## RESUMO

A obesidade está associada a um quadro de inflamação sistêmica, envolvendo a produção de adipocitocinas como o TNF- $\alpha$  e migração de macrófagos para o tecido adiposo. O Metotrexato (MTX) é uma droga com ações anti-TNF- $\alpha$  dentre outras que pode contribuir para a redução destas alterações. Este trabalho tem por objetivo avaliar o papel do MTX nas alterações inflamatórias associadas à obesidade.

Foram utilizados camundongos mantidos em ração comercial ou dieta hiperlipídica e tratados com MTX 1 mg/kg durante 8 semanas (MTX 1mg) ou MTX 2 ou 4 mg/kg nas duas últimas semanas de vigência da dieta (MTX 2mg e MTX 4mg). Peso corporal, ingestão de ração, níveis glicêmicos e teste de tolerância a insulina (ITT) foram avaliados. Estoques de tecido adiposo foram dissecados e biópsias utilizadas para análise da expressão protéica por Western blot e da produção de adipocitocinas por ELISA (sobrenadante de culturas de curto-prazo). *In vitro*, em culturas isoladas ou em sistema de co-cultura a ação do metotrexato também foi avaliada.

Não houve redução do peso corpóreo, da ingestão de ração ou de adiposidade nos animais após tratamento com MTX. Não houve alterações de glicemia e sensibilidade à insulina no grupo MTX 1mg. Mas os níveis glicêmicos estavam reduzidos e a sensibilidade à insulina estava aumentada nos grupos MTX 2mg e 4mg. *Ex vivo*, observamos em cultura de tecido adiposo a redução da lipólise, da liberação de leptina e aumento da liberação de adiponectina e IL-10. O MTX reduziu a expressão protéica de F4/80, MCP-1 e iNOS no tecido adiposo, além de reduzir o nível de fosforilação da JNK. *In vitro* observamos que a ação antilipolítica do MTX é dependente da ação da adenosina, pois foi revertida com a utilização de um antagonista de receptor A1. Ainda *in vitro*, também confirmamos a capacidade do MTX modificar a produção de citocinas pró-inflamatórias em co-culturas estimuladas com LPS.

Nossos resultados sugerem que o MTX melhora o controle glicêmico e a sinalização da insulina por reduzir no tecido adiposo a produção de adipocitocinas pró-inflamatórias e o infiltrado de macrófagos e, aumentar a produção de citocinas antiinflamatórias. Apresenta também efeito antilipolítico através da liberação de adenosina, o que contribui para o controle glicêmico observado, sugerindo que fármacos com ação imunossupressora e/ou antilipolítica podem ser ferramentas úteis no controle das alterações associadas à obesidade.

Palavras-chave: imunossupressão; inflamação; obesidade; adipocinas, metotrexato.

## ABSTRACT

Obesity is associated to a systemic inflammatory process which presents proinflammatory cytokine productin, i.e. TNF- $\alpha$  and adipose tissue macrophage infiltration. Methotrexate (MTX) has anti-TNF- $\alpha$  action and it could be a role to reduce the inflammation associated to obesity. Thus, the aim of this project was to evaluate MTX effects in inflammatory alterations induced by obesity.

Swiss mice were feed with commercial chow (CN) or high fat diet (HFD) and treated with MTX 1 mg/kg/week during 8 weeks (MTX1) or MTX 2 or 4 mg/ kg/weed in the last two weeks of HFD (MTX2 and MTX4, respectively). Body weight, food intake, glucose blood levels and insulin tolerance test (ITT) were evaluated. Adipose tissue depots were quantified and biopsies were obtained for protein expression analysis by Western blot, adipocytokines production and basal lipolysis. *In vitro* assays, the MTX action was evaluated in isolated adipocyte cultures or macrophage/adipocytes co-cultures.

There was no reduction in body weight, food intake or adiposity in animals after treatment with MTX. No changes in glucose blood levels and insulin sensibility were observed in MTX1 mice. However, glucose blood levels were reduced and insulin sensitivity was increased in MTX2 and MTX4. Ex vivo, the basal lipolysis and leptin production were reduced while adiponectin and IL-10 were improved in adipose tissue from MTX4 mice. The MTX treatment also reduced the protein expression of iNOS, MCP-1 and F4/80 (a macrophage marker). The level of phosphorylation of JNK was also reduced in the MTX4. In vitro, MTX promotes lypolysis inhibition by adenosine signaling through adenosine receptor A1. We were also able to confirm MTX ability to modify proinflammatory cytokine production in LPS-stimulated co-cultures, *in vitro*.

Our results demonstrate that methotrexate improves glycemic control and insulin resistance in obese mice. This improvement seems to be associated with a reduced production of proinflammatory and macrophage infiltration and increased production of anti-inflammatory adipocytokines by adipose tissue. The effect anti-lypolysis through adenosine release could also contribute to glucose homeostasis, suggesting that drugs with immunossupressant and/or inhibitory lypolysis action could be a tool for controlling obesity associated alterations.

Key words: immunosuppression; inflammation; obesity; adipokines, methotrexate.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1. Obesidade e Inflamação .....	01
1.2. Adipocintocinas antiinflamatórias .....	02
1.3. Adipocitocinas pró-inflamatórias.....	04
1.4. Inflamação associada à obesidade e imunomodulação .....	06
1.5. Metotrexato .....	07
2. OBJETIVOS .....	09
2.1. Objetivo Geral .....	09
2.2. Objetivos específicos .....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS. ....	10
3.1. Animais .....	10
3.2. Obesidade induzida por dieta e tratamento dos animais .....	10
3.3. Determinação do peso corpóreo e avaliação dos estoques de tecido adiposo .....	12
3.4. Glicemia basal e Teste de tolerância à insulina (ITT) .....	12
3.5. Cultura de curto-prazo de tecido adiposo e determinação de adipocitocinas da lipólise .....	12
3.6. Extração de proteína e análise por Western blot .....	13
3.7. Cultura e co-cultura de células .....	13
3.8. Análise dos resultados .....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Determinação do peso corporal .....	15
4.2. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal e perirenal..	15
4.3. Controle de ingesta de alimento .....	15
4.4. Avaliação dos níveis glicêmicos .....	19
4.5. Teste de tolerância à insulina .....	19
4.6. Avaliação <i>ex-vivo</i> da produção de adipocitocinas antiinflamatória.	22
4.7. Avaliação <i>ex-vivo</i> da produção de adipocitocinas pró-inflamatória	22
4.8. Avaliação do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo .....	26
4.9. Avaliação de outros marcadores inflamatórios no tecido adiposo..	26

4.10. Avaliação da atividade lipolítica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	29
4.11. Avaliação da atividade imunossupressora em sistema de co-cultura .....	32
5. DISCUSSÃO .....	33
6. CONCLUSÃO .....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
8. ANEXOS .....	49

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo aumento de tecido adiposo, decorrente de hipertrofia e hiperplasia e, pode ser resultante da ingestão persistente de energia em quantidade superior à gasta (Otto e Lane, 2005). É um distúrbio do equilíbrio energético no organismo, pois quando a energia vinda do consumo de alimentos excede o gasto de energia, as calorias excedentes são estocadas no tecido adiposo na forma de triglicérides. As células adiposas (adipócitos) podem aumentar ou diminuir de tamanho de acordo com o equilíbrio energético do organismo, quando ocorre aumento observamos a hipertrofia. Novos adipócitos podem se formar a partir de células precursoras também em resposta ao equilíbrio energético positivo persistente caracterizando a hiperplasia. A obesidade é um importante fator de risco para o desenvolvimento da diabetes tipo 2, doença cardiovascular e hipertensão (White e Stephens, 2010). Alterações no tamanho e no número de adipócitos podem estar relacionadas à inabilidade do tecido adiposo em funcionar corretamente, o que pode contribuir para o aparecimento de problemas relacionados à obesidade, como dislipidemia, resistência à insulina e risco cardio-metabólico (Godoy-Matos, 2006). Acredita-se que estas patologias sejam decorrentes de um estado de inflamação sistêmica associado ao aumento da adiposidade e deste modo tem crescido o interesse no estudo da biologia do tecido adiposo (Godoy-Matos, 2006).

A inflamação sistêmica que se estabelece com a adiposidade parece ser decorrente do fato do tecido adiposo secretar uma grande variedade de fatores que participam diretamente do processo inflamatório ou regulam outras funções imunológicas, como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-6 e leptina, coletivamente denominadas adipocitocinas ou adipocinas (Hotamisligil *et al.*, 1993; Bastard *et al.*, 2000).

O tecido adiposo também contribui produzindo substâncias com atividade antiinflamatória como a adiponectina, IL-10 e cortisol (Tomlinson *et al.*, 2004), mas em situações relacionadas ao aumento da adiposidade, o que se observa é um desequilíbrio entre a produção de fatores pró- e antiinflamatórios, que contribuiriam para a manutenção de um nível moderado de inflamação sistêmica.

O tecido adiposo não é composto somente por adipócitos em diferentes estágios de maturação, mas também pela chamada fração estromal, composta por células endoteliais, leucócitos infiltrados e células progenitoras (Bastos *et al.*, 2009).

O estabelecimento da obesidade coincide com um aumento significativo da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e estes por sua vez, podem modificar a função dos adipócitos e atuar como um fator importante para a redução da sensibilidade tecidual à insulina (Zeyda e Stulnig, 2007).

O número de macrófagos no tecido adiposo branco está diretamente correlacionado com a adiposidade e com o tamanho dos adipócitos em humanos e em ratos, sem apresentar diferenças significativas entre o tecido adiposo subcutâneo e visceral (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Curat *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que fagócitos são recrutados ao tecido adiposo em decorrência de morte celular dos adipócitos semelhante à necrose, decorrente da hipertrofia celular (Cinti *et al.*, 2005). Acredita-se também que este recrutamento possa ser dependente de uma produção de quimiocinas, como a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), a proteína quimioatrativa de monócitos-2 (MCP-2) e a substância Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES), pois estudos com camundongos deficientes para estas quimiocinas ou para receptores MCP-1 apresentam redução do recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo e melhora das alterações metabólicas quando submetidos à dieta hiperlipídica (Christiansen *et al.*, 2004; Kanda *et al.*, 2006; Weisberg *et al.*, 2006). A compreensão dos mecanismos que induzem a migração de macrófagos para o tecido adiposo bem como a capacidade de modificar este evento podem ser alvos promissores na prevenção e tratamento da resistência à insulina (Zeyda e Stulnig, 2007).

## **1.2. Adipocitocinas antiinflamatórias**

As adipocitocinas influenciam uma variedade de processos fisiológicos, entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular, a regulação da pressão arterial e a coagulação sanguínea. Como já citado, alterações na secreção de adipocitocinas, decorrentes da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, poderiam constituir situação

relacionada à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (Havel, 2004).

A adiponectina foi descrita primeiramente em 1995, é considerada como a proteína mais abundante produzida pelo tecido adiposo (Fonseca-Alanis *et al.*, 2007). A descoberta da adiponectina ocorreu quase que simultaneamente à da leptina, mas esta não recebeu maior atenção até que a comunidade científica iniciasse os relatos sobre seus efeitos protetores nas alterações induzidas pela obesidade (Koerner *et al.*, 2005). A ela são atribuídos vários efeitos, como a inibição da produção TNF- $\alpha$ , aumento da sensibilidade a insulina e efeitos moduladores de NF $\kappa$ B (Fonseca-Alanis *et al.*, 2007). Os mecanismos pelos quais há melhora da sensibilidade à insulina pela adiponectina não são bem conhecidos, mas são citados alguns como a redução dos ácidos graxos circulantes e capacidade de estimulação direta para a captação de glicose no músculo e adipócitos pela ativação da AMPK (Fruebis *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2002). Os níveis de adiponectina estão reduzidos na obesidade e em diabetes melito tipo 2 (Weyer *et al.*, 2001).

Acredita-se que a adiponectina seja capaz de suprimir a proliferação e ativação de células do sistema imunológico e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Fantuzzi, 2005). Por outro lado, a adiponectina reduz a produção e a atividade de TNF- $\alpha$  (Masaki *et al.*, 2004). As atividades antiinflamatórias da adiponectina podem inibir a produção de IL-6, acompanhados por indução de citocinas antiinflamatórias IL-10 e do antagonista de receptor de IL-1 (Kumada *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2004 e Wulster-Radcliff *et al.*, 2004). A inibição do fator nuclear kB (NF-kB) pela adiponectina poderia explicar, pelo menos em parte, esses efeitos (Wulster-Radcliff *et al.*, 2004).

Outra citocina considerada antiinflamatória produzida pelo tecido adiposo é interleucina-10 (IL-10). Em 1989, Fiorentino descreveu uma substância que estava presente no sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos Th2, e que era capaz de inibir a produção de citocinas produzidas por células Th1, denominando esta substância de Fator Inibidor da Síntese de Citocinas, que mais tarde passou a ser chamada de Interleucina-10 (Moore *et al.*, 1990). A IL-10 também pode ser produzida por linfócitos Th2, linfócitos Th0, células B, queratinócitos e células dendríticas (Eskdale *et al.*, 1998; Mocellin *et al.*, 2003; Blackburn e Wherry, 2007). É capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e outras

citocinas secretadas por macrófagos, como IL-6 e IL-8 e, confere proteção vascular (Herfarth e Scholmerich, 2002). Esta interleucina também pode inibir a produção de citocinas por neutrófilos e inibir algumas atividades das células apresentadoras de antígenos (Corso, 2003). Trabalho recente mostrou que adolescentes com sobrepeso apresentam níveis séricos de IL-10 aumentados quando comparados com adolescentes de peso normal (Tam *et al.*, 2010). Níveis circulantes de IL-10 também estão aumentados em adultos obesos e correlacionados com o aumento no índice de massa corporal (Bassols *et al.*, 2010), o que sugere que a expansão do tecido adiposo também possa produzir fatores antiinflamatórios, com objetivo de feed back negativo.

### **1.3. Adipocitocinas pró-inflamatórias**

O TNF- $\alpha$  foi descoberto por Carswell em 1975 e foi descrito como um fator que induzia a necrose de células tumorais após infecção aguda por bactérias (Carswell *et al.*, 1975). A associação positiva entre a produção de TNF- $\alpha$  e o tamanho do adipócito tem sido descrito em vários modelos de obesidade. Em humanos, o tecido adiposo de obesos secreta duas vezes mais TNF- $\alpha$  quando comparado a indivíduos não obesos (Bahceci *et al.*, 2007, Skurk *et al.*, 2007). Em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta, níveis de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo aumentam proporcionalmente a adiposidade (Boucher *et al.*, 2005). Níveis elevados de TNF- $\alpha$  parecem estar associados ao desenvolvimento de complicações metabólicas secundárias em indivíduos obesos, como na promoção da resistência à insulina (Hotamisligil *et al.*, 1994). A função do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento da resistência à insulina foi descrita por sua capacidade de regular para baixo a expressão do transportador de glicose glut-4 no tecido adiposo, por mecanismos que envolvem a redução da fosforilação do substrato 1 dos receptores de insulina (IRS-1) e fosforilação específica do receptor da insulina (Moller, 2000). A utilização terapêutica de anticorpos anti-receptor de TNF- $\alpha$  melhora a sensibilidade à insulina *in vivo* e restaura a auto-fosforilação estimulada pela insulina do receptor e do substrato do receptor da insulina (Moller, 2000). Entretanto, a deleção do gene de TNF- $\alpha$  promove somente uma modesta redução do peso corpóreo e dos estoques de tecido

adiposo, sugerindo que esta citocina não tenha um papel principal no controle de peso corpóreo (Uysal *et al.*, 1997; Ventre *et al.*, 1997). Adicionalmente, há relatos de que *in vitro*, o TNF- $\alpha$  atue como um inibidor da diferenciação de adipócitos por mecanismos que envolvem a inibição de fatores de proliferação como o *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR- $\gamma$ ) e *CCAAT/enhancer binding protein-alpha* (C/EBP- $\alpha$ ; Cawthorn *et al.*, 2007), além de atuar como um indutor de apoptose em adipócitos (Nishimura *et al.*, 2006). Há ainda referências de que triacilgliceróis e ácidos graxos livres exerçam forte influência na indução da expressão de TNF- $\alpha$ . Roedores tratados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  e alteração da via de sinalização insulínica *in vivo* (Morin *et al.*, 1997). Anticorpos anti TNF- $\alpha$  melhoram a sensibilidade à insulina em animais obesos, enquanto que animais deficientes de TNF- $\alpha$ , mesmo quando submetidos à dieta hiperlipídica, apresentam-se protegidos em relação ao desenvolvimento de resistência à insulina associada à obesidade (Guimarães *et al.*, e 2007). E, finalmente, o próprio TNF- $\alpha$  atua como um indutor de lipólise *in vitro* e *in vivo* (Costa e Duarte, 2006).

A leptina é uma proteína com estrutura similar a família de citocinas e é principalmente produzida pelos adipócitos, embora outros tecidos, como o músculo esquelético, placenta, ovários, estômago e fígado também expressem mRNA para leptina (Muoio e Lynis, 2002). A leptina foi descoberta por Friedman em 1994 e interage com diferentes sistemas neuroendócrinos centrais, envolvidos no controle da ingestão de alimentos, incluindo, por exemplo, o neuropeptídeo Y (NPY), sintetizado no núcleo arqueado do hipotálamo, que constitui um potente estimulador da ingestão de alimentos. Tanto deficiência como resistência à leptina causam superexpressão de NPY hipotalâmico, implicado na hiperfagia da obesidade (Schwartz *et al.*, 1996). Deste modo, a leptina age como um sinal aferente de saciedade, atuando sobre o hipotálamo e, regulando o apetite e o peso em humanos e animais (Koerner *et al.*, 2005). Camundongos com mutação no gene da leptina (camundongo *ob/ob*) ou no receptor da leptina (camundongo *db/db*), assim como em humanos com as mesmas mutações nos mesmo genes, são obesos (Elmqvist, 2001). Adicionalmente, os receptores de leptina estão presentes no pulmão, intestino, rins, fígado, pele, estômago, coração, baço, dentre outros órgãos, sugerindo um efeito pleiotrópico deste hormônio (Dal Farra *et al.*, 2000). Esta

citocina desempenha um papel importante na linfopoiese e hematopoiese, estimulando a proliferação e aumentando a produção de citocinas por linfócitos T, monócitos/macrófagos e células dendríticas (Lam *et al.*, 2006). A leptina protege os linfócitos T de apoptose e regula a proliferação e ativação das células T (Fantuzzi, 2005).

A IL-6 é uma citocina imuno-moduladora com ação pró-inflamatória e endócrina. O tecido adiposo (preferencialmente a gordura visceral) é a principal fonte de IL-6 circulante nos estados não inflamatórios (Prins, 2002; Fantuzzi, 2005). Também ocorre secreção de IL-6 hipotalâmica onde se pensa que desempenha um papel na regulação do apetite e no gasto energético. Como o TNF- $\alpha$ , também é atribuído um papel no metabolismo dos lípidos e da glicose, pois é capaz de inibir a lipoproteína lipase, aumenta a liberação de ácidos graxos livres e glicerol (Mattison e Jesen, 2003). Há indícios recentes de que a IL-6 exerça ação direta sobre a sensibilidade à insulina, alterando a sinalização em hepatócitos, mediante a inibição da fosforilação do substrato do receptor de insulina e PKB/AKT, associado ao aumento da expressão do supressor da sinalização de citocinas (SOCS)-3 promovendo, desse modo, resistência à ação do hormônio no fígado (Senn *et al.*, 2003). Os seus níveis estão aumentados na obesidade (tanto os séricos como os do tecido adiposo) e diminuem com a perda de peso (Costa e Duarte, 2006). A IL-6 é secretada por macrófagos e adipócitos e sua expressão pode ser estimulada pelas catecolaminas via receptores adrenérgicos  $\beta 2$  e  $\beta 3$  do tecido adiposo branco, quando em concentrações elevadas (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). O aumento da expressão de IL-6 nos depósitos de tecido adiposo pode ser de extrema importância no estabelecimento de patologias associadas à obesidade (Nonogaki *et al.*, 1995). Por exemplo, foi sugerido que a IL-6 participe do processo de aterosclerose pela associação negativa entre IL-6 e HDL-c e a associação positiva intensa entre essa adipocitocina e outros mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  (Haddy *et al.*, 2003).

#### **1.4. Inflamação associada à obesidade e imunomodulação**

A hipótese de que a obesidade está associada a um quadro inflamatório sistêmico envolvendo a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de leucócitos para o tecido adiposo, tem guiado alguns estudos

experimentais e avaliações clínicas utilizando drogas antiinflamatórias e imunossupressoras. Estudos utilizando-se anticorpos anti-TNF- $\alpha$  têm apresentado resultados conflitantes. O tratamento de pacientes com risco cardio-metabólico com Etanercept, um anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , resultou em redução dos marcadores inflamatórios (proteína C-reativa), aumento da produção de adiponectina, mas não houve melhora na capacidade de sinalização da insulina, sugerindo que este evento seja mais complexo (Bernstein *et al.*, 2006).

Por outro lado, pacientes em tratamento para artrite ou psoríase com Infliximab, um anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$ , apresentam melhora na sinalização da insulina e no controle glicêmico (Yazdani-Biuki *et al.*, 2004; Gonzalez-Gay *et al.*, 2006). O tratamento de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica com Infliximab também resulta em melhora da capacidade de sinalização da insulina no músculo esquelético e no fígado (Araújo *et al.*, 2007). Um trabalho recente sugere que outra droga imunossupressora e com ações anti-TNF- $\alpha$ , a Talidomida, possa contribuir na redução dos marcadores inflamatórios que estão associados à obesidade revertendo as alterações inflamatórias hepáticas observadas na obesidade e que possa ser uma opção terapêutica para o tratamento da doença do fígado gorduroso (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) e diabetes tipo 2 (Pinto *et al.*, 2010).

### **1.5. Metotrexato**

O Metotrexato é um antagonista de folato, inicialmente desenvolvido para o tratamento de câncer e posteriormente utilizado no tratamento de patologias não-neoplásicas, como uma droga antiinflamatória e imunossupressora (Genestier *et al.*, 2000). Além de sua atividade antineoplásica, o Metotrexato também tem sido utilizado com resultados benéficos na terapia da psoríase, uma doença cutânea comum (McDonald, 1981). Além disso, o Metotrexato inibe as reações imunes celulares e é empregado como agente imunossupressor, por exemplo, no transplante de órgãos e de medula óssea alogênica, bem como no tratamento da dermatomiosite, artrite reumatóide, granulomatose de Wegener e da doença de Crohn (Feagan *et al.*, 1995). Quando usado em altas doses (maiores que 50 mg por semana) o Metotrexato tem atividade predominantemente antineoplásica e, a

exemplo da maioria dos antimetabólicos, o Metotrexato é apenas parcialmente seletivo para células tumorais e tóxico para todas as células normais em rápida divisão, como as do epitélio intestinal e da medula óssea. Os antagonistas do folato induzem apoptose das células durante a fase S do ciclo celular e são mais eficazes quando as células encontram-se na fase logarítmica de crescimento (Goodman e Gilman, 2005).

Em doses baixas (de 5 a 25 mg por semana) apresenta ação antiinflamatória, o que pode explicar o seu efeito no tratamento da artrite reumatóide, psoríase e asma (Fabbri *et al.*, 1991). O mecanismo de ação antiinflamatório do Metotrexato ainda não é bem compreendido. Na asma seu efeito pode estar relacionado à sua ação inibitória na infiltração de linfócitos e eosinófilos nas vias aéreas (Gonokami *et al.*, 1995). Acredita-se que o Metotrexato atue como antiinflamatório por mecanismos relacionados à liberação de adenosina e a efeitos diretos sobre a proliferação de células T (Tian *et al.*, 2007). As concentrações de adenosina que inibem a função das células inflamatórias são similares àqueles observadas *in vivo* e sugerem que a adenosina tenha um papel na modulação da inflamação. De fato, estudos recentes indicam que os agonistas de receptores de adenosina são potentes agentes antiinflamatórios. Alguns estudos indicam que o Metotrexato diminui a inflamação, aumentando a liberação de adenosina em locais inflamados (Cronstein, 1994).

Adicionalmente, o tecido adiposo apresenta alta expressão de receptores de adenosina A1 (A1AdoR) que medeiam redução da formação de AMP cíclico e inibição da lipólise (Fatholahi *et al.*, 2006). A redução da lipólise nos adipócitos pode atuar como um benefício no tratamento de dislipidemias, diabetes tipo 2 e risco cardio-metabólico (Fatholahi *et al.*, 2006).

O Metotrexato também atua como uma droga anti-TNF- $\alpha$  que também poderia contribuir para a melhora no quadro de resistência a insulina relacionada à obesidade (Gerards *et al.*, 2003). A ação imunossupressora deste fármaco pode modular a migração de macrófagos ao tecido adiposo, atuando sobre mais um parâmetro do componente inflamatório relacionado à obesidade. Adicionalmente, como a adenosina apresenta um efeito anti-lipolítico descrito e o Metotrexato também modifica a liberação de adenosina em sistemas biológicos, estas ações poderiam se traduzir em benefícios ao quadro metabólico de camundongos obesos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o papel do Metotrexato nas alterações sistêmicas e do tecido adiposo associadas à obesidade.

### 2.2. Objetivos Específicos

Estudar o possível efeito do tratamento com Metotrexato em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, avaliando:

- o peso corpóreo, glicemia e sensibilidade periférica à insulina;
- as alterações dos estoques de tecido adiposo (epididimal e perirenal);
- o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo (expressão de F4/80 e MCP-1)
- a produção de adipocitocinas e outros marcadores pró-inflamatórios no tecido adiposo (TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, iNOS, JNK)
- a produção de adipocitocinas antiinflamatórias (adiponectina, IL-10)
- a atividade lipolítica

Estudar o efeito *in vitro* do Metotrexato em culturas de adipócitos e em co-culturas de adipócitos/macrófagos quanto:

- a produção de adipocitocinas;
- a atividade lipolítica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss com 6 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas individuais e mantidos no Biotério da UNIFAG, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Os animais se serviram *ad libitum* de água e ração. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal - USF Protocolo 1/2008 (Anexo).

#### 3.2. Obesidade induzida por dieta e tratamento dos animais

Ao completarem 6 semanas de idade, os animais foram inicialmente divididos em dois grupos, onde um recebeu ração comercial para roedores (Labina®, Agribands-Purina, Paulínia, SP, Brasil) e o outro recebeu uma dieta preparada em nosso laboratório conforme Tabela 1. Dois protocolos distintos de tratamento foram utilizados:

1) os animais foram tratados com Metotrexato (Sigma Aldric, Co. – Saint Louis, Missouri, USA) 1 mg/kg, via intraperitoneal semanalmente durante as 8 semanas em que foram mantidos com dieta hiperlipídica e este grupo foi denominado MTX 1mg.

2) os animais foram tratados nas duas últimas semanas das 12 semanas em que foram mantidos com dieta hiperlipídica com 2 ou 4 mg/kg/semana de Metotrexato e foram denominados grupo MTX 2mg e grupo MTX 4mg. A divisão dos grupos experimentais está ilustrada na Figura 1.

Tabela 1. Composição de macronutrientes da dieta (Pauli *et al.*, 2008).

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipídica	
	g/kg	Kcal/kg	g/kg	Kcal/kg
Amido de Milho (Q.S.P.)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Maltodextrina	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de Minerais	35	-	35	-
Mix de Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>3948</b>	<b>1000</b>	<b>5358</b>

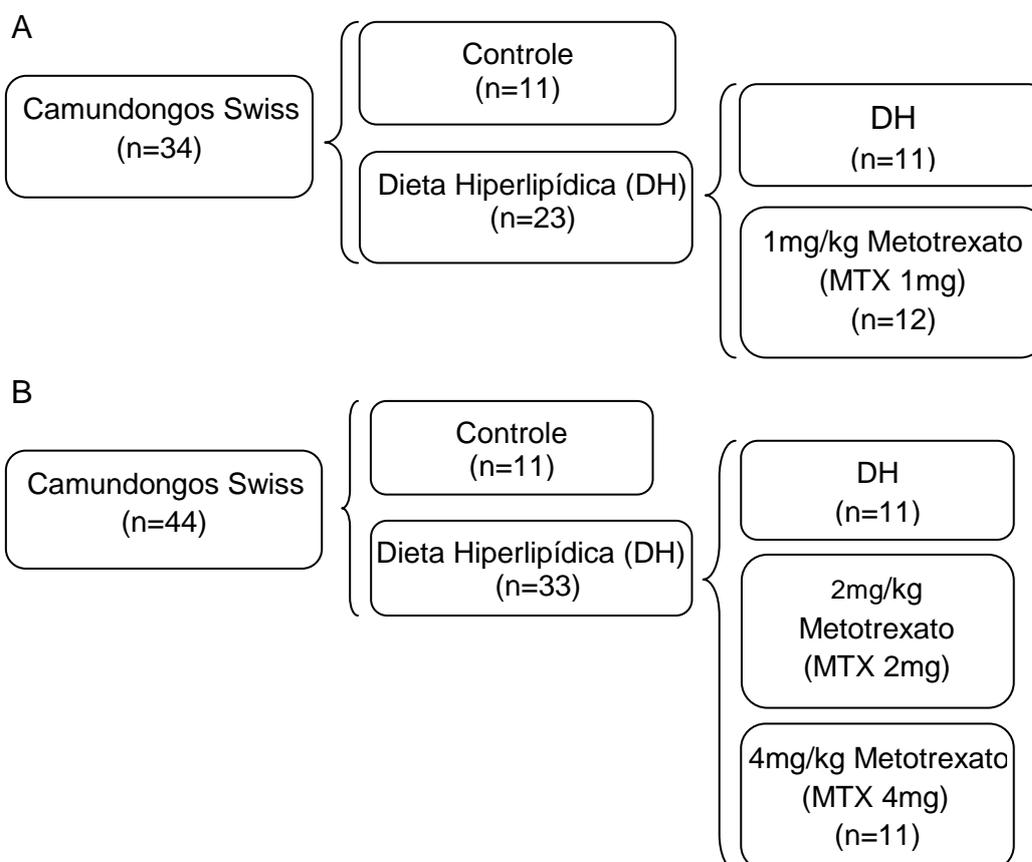


Figura 1: Divisão dos animais nos grupos experimentais. A) Protocolo de 8 semanas e B) protocolo de 12 semanas.

### 3.3. Glicemia basal e Teste de tolerância à Insulina (ITT)

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e foram anestesiados com uma mistura 1:1 de cetamina 100 mg/ml e xilasina a 2% no volume de 0,1 ul para cada 100 g de peso corpóreo. Após o procedimento anestésico foi feita uma pequena incisão na cauda de cada animal para a coleta de uma pequena gota de sangue e determinação da glicemia basal utilizando glicosímetro. Para o ITT, os animais receberam via i.p. 1,5 U/kg de insulina e os níveis glicêmicos foram avaliados após 5, 10, 15 e 30 minutos. Os valores glicêmicos foram plotados e a inclinação das curvas avaliada usando o programa GraphPad InStat (Kitt). O ITT foi realizado na semana anterior ao sacrifício dos animais.

### 3.4. Determinação do peso corpóreo e avaliação dos estoques de tecido adiposo

Os animais foram pesados semanalmente durante a vigência da dieta e ao final do experimento tiveram seus estoques de tecido adiposo (epididimal e perirenal) dissecados e pesados.

### 3.5. Cultura de curto-prazo de tecido adiposo e determinação da produção de adipocitocinas da lipólise

Biópsias do tecido adiposo foram fragmentadas e incubadas por 3 h em Meio 199 (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY), contendo Albumina de Soro Bovino (BSA) 1% (Sigma Aldric, Co. – Saint Louis, Missouri, USA), a 37°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. Após a incubação o meio foi coletado e estocado a -70°C para posterior determinação de TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, adiponectina e IL-10. A quantificação dos níveis de citocinas e adipocinas foi feita utilizando kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A atividade lipolítica foi avaliada pela quantificação de glicerol nas mesmas amostras utilizando kit comercial (LABORLAB, Guarulhos - SP, Brasil)

### 3.6. Extração de proteína e análise por Western blot

Os animais foram anestesiados, a cavidade abdominal aberta e o tecido adiposo epididimal coletado e homogeneizado em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinin 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  10 mM, NaF 100 mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10 mM e EDTA 4 mM. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C, 45 min. Ao sobrenadante coletado foi adicionado tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%; SDS – dodecil sulfato de sódio – 10%) contendo DTT 100 mM e as amostras foram aquecidas em água fervente por 5 min., aplicadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separadas por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos anti-F4/80, anti-MCP-1, anti-iNOS, anti-JNK, anti-fosfo-JNK e anti- $\beta$ -Actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. – Santa Cruz, Califórnia, USA) overnight a 4°C antes de serem reveladas com Kits comerciais de quimioluminescência (GE Healthcare Bio-Sciences AB, UK).

### 3.7. Cultura e Co-Cultura de células

Foram utilizadas as linhagens de macrófagos RAW 264.7 e de adipócitos 3T3-L1 adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e da ATCC (USA), respectivamente e, estabelecidas em nosso laboratório. A linhagem RAW 264.7 foi cultivada em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementada com 10% de soro fetal bovino, 10 ml/L de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL, NY, USA), a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 foi cultivada em meio basal de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 ml/L de penicilina/estreptomicina, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 48 horas de atingirem a confluência, as células foram incubadas com o meio de diferenciação (0,25  $\mu\text{M}$  de dexametasona, 10  $\mu\text{g/ml}$  de insulina e 0,5 mM IBMX em meio basal). Após 96 horas, as células foram expostas ao meio de maturação (5

$\mu\text{g/ml}$  de insulina em meio basal). Os adipócitos foram utilizados em ensaios de co-cultura ou de lipólise basal após 10 dias de manutenção em meio de maturação.

As co-culturas de adipócitos e macrófagos foram realizadas utilizando "transwell inserts" com poros de  $0,4 \mu\text{m}$  (Millipore, CO, Cork, Ireland) para separar os dois tipos celulares. Foram pipetados, na parte superior do *insert*, os estímulos: Metotrexato na concentração de  $3,0 \mu\text{g/ml}$  e em outro poço, DPCPX em duas concentrações  $0,1$  e  $1,0 \mu\text{M}$  juntamente com metotrexato. Após 48 hs de cultura, o sobrenadante foi coletado para ensaio de lipólise basal. Outra co-cultura foi realizada para a quantificação da presença das seguintes citocinas: IL-6 e IL-10, utilizando-se Kit comercial de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os estímulos utilizados foram: Metotrexato  $3,0 \mu\text{g/ml}$ ; LPS  $100 \text{ ng/ml}$  e outro poço recebia LPS e Metotrexato.

As culturas de adipócitos foram estimuladas com Metotrexato nas seguintes concentrações:  $0,3$ ;  $1,0$  e  $3,0 \mu\text{g/ml}$ , uma outra cultura foi estimulada com Metotrexato  $3,0 \mu\text{g/ml}$ , e em outros poços foram pipetados o DPCPX em duas concentrações diferentes  $0,1$  e  $1,0 \mu\text{M}$  juntamente com MTX, após 48 horas de cultura em estufa, o sobrenadante foi coletado para ensaio de lipólise basal.

### 3.8. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média, acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significante foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinação do peso corpóreo

Durante a vigência da dieta hiperlipídica, os animais do grupo DH apresentaram uma alteração significativa no peso corpóreo quando comparados aos animais controle (Figura 2A). No entanto, observou-se que não houve redução do peso corpóreo dos animais tratados com Metotrexato 1mg/Kg quando comparados ao grupo DH. O mesmo foi observado nos animais tratados com 2mg/kg e 4mg/kg de Metotrexato (Figura 2B) quando comparados ao grupo DH. Vale ressaltar que quando comparamos o grupo DH ao Controle do segundo protocolo experimental, há também um aumento significativo do peso corpóreo (Figura 2B).

### 4.2. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal e perirenal

A avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal e perirenal mostrou que não há reduções na adiposidade após o tratamento com as três doses de Metotrexato (Figura 3A e 3B).

### 4.3. Controle de ingesta de alimento

A quantidade de dieta ingerida foi monitorada durante o tratamento dos dois grupos experimentais. Nota-se uma diminuição de ingesta nos DH quando comparado aos grupos Controle (Figura 4A e 4B), mas o mesmo não foi observado entre os animais tratados com 1, 2 e 4mg/kg de Metotrexato (Figura 4A e 4B) quando comparados aos DH.

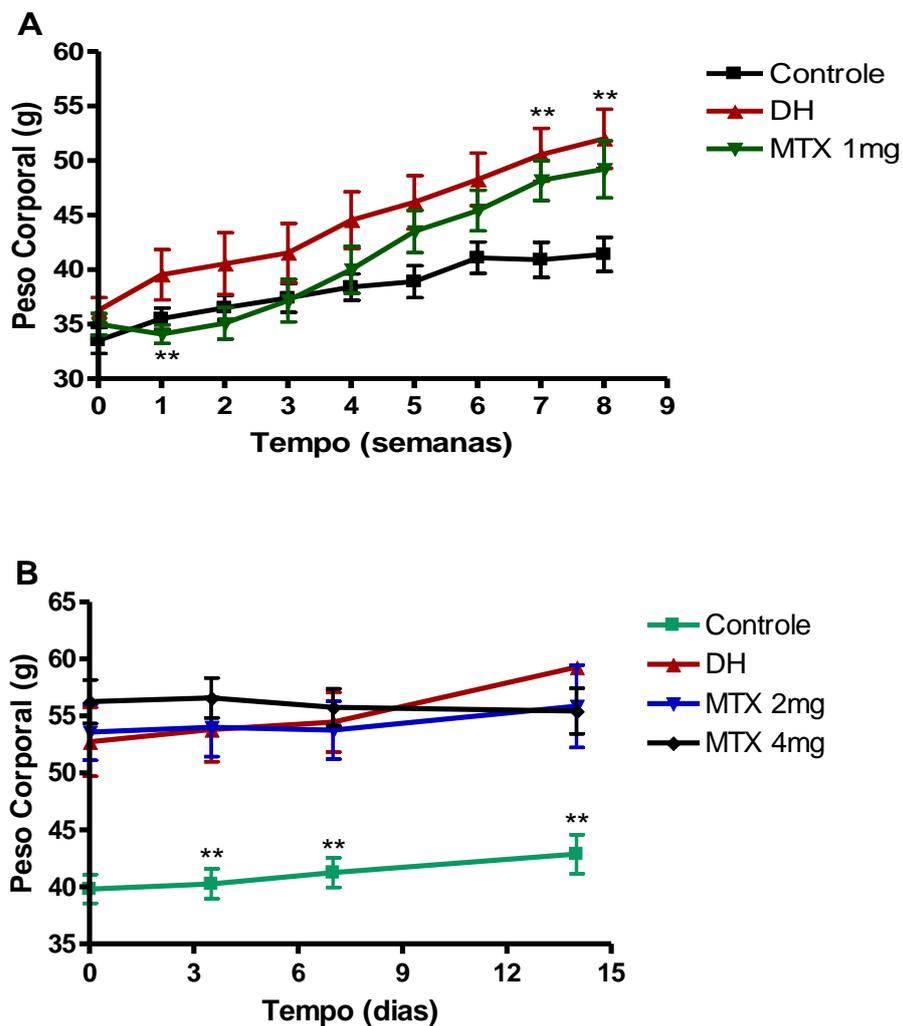


Figura 2. Peso corpóreo dos animais Controle, DH e MTX 1mg durante 8 semanas (Painel A) e dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg durante os 14 dias de tratamento (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 10 animais. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo DH.

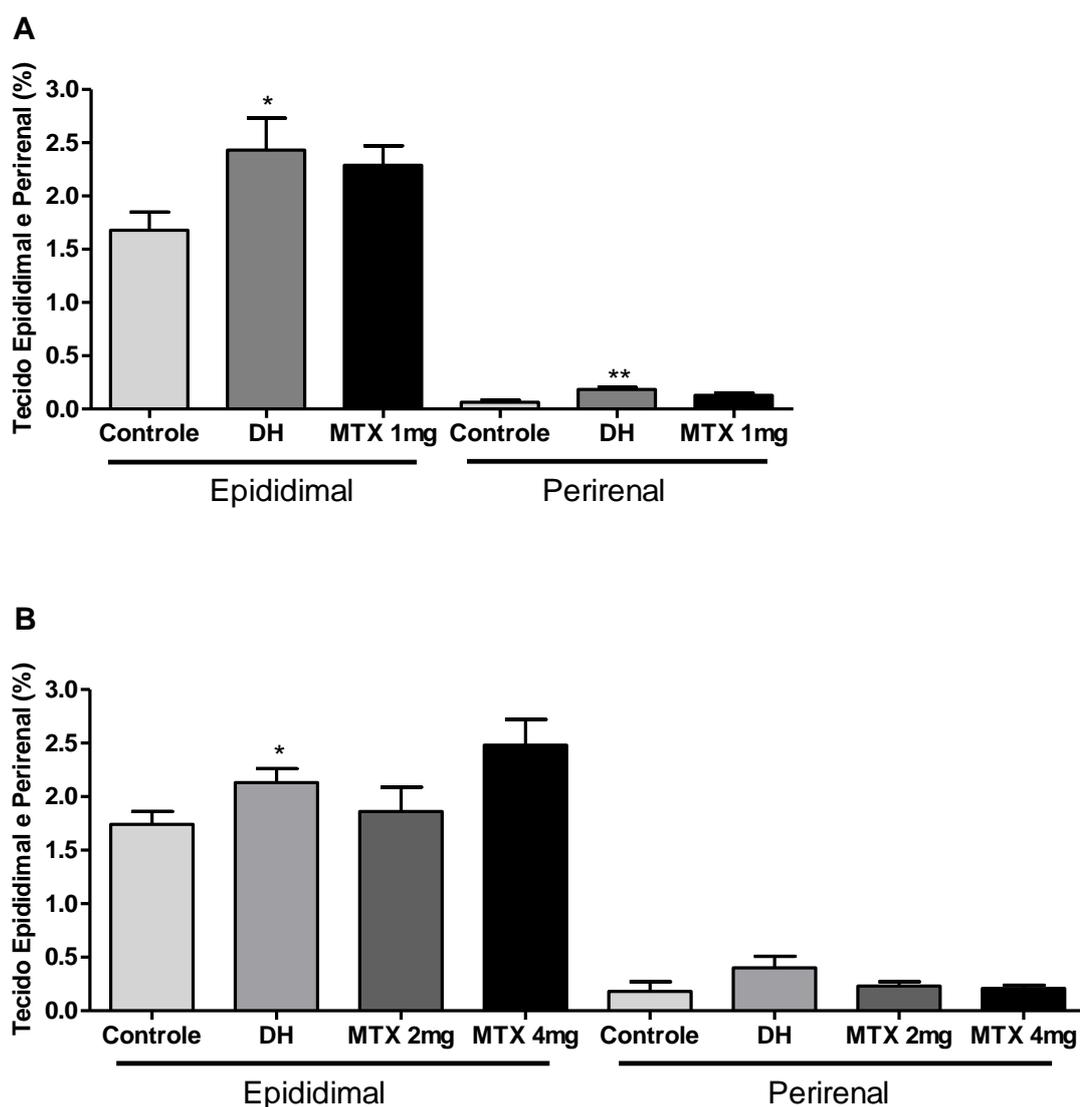


Figura 3. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal e perirenal dos animais Controle, DH e MTX 1mg (Painel A) e dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 10 animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao Controle

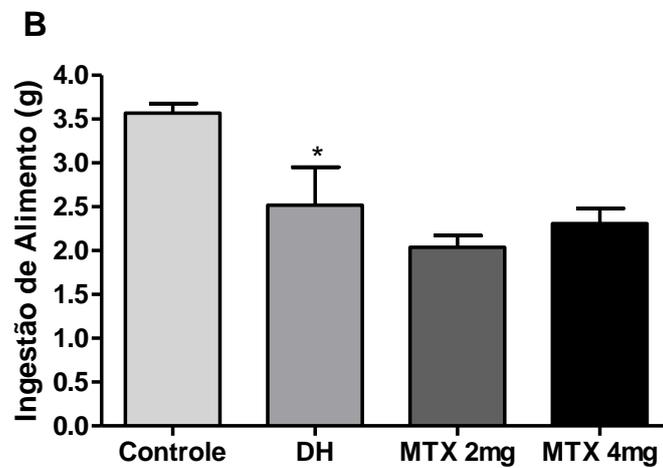
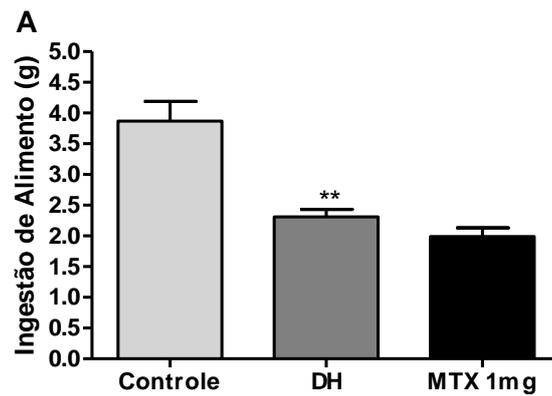


Figura 4. Controle de ingestão de dieta dos animais Controle, DH e MTX 1mg (Painel A) e dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 16 animais. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle.

#### 4.4. Avaliação dos níveis glicêmicos

Os níveis glicêmicos foram avaliados ao final do tratamento e não estavam modificados nos animais tratados com MTX 1 mg quando comparados aos DH, somente no DH quando comparado ao Controle (Figura 5A). Entretanto, observou-se uma redução da glicemia basal nos animais tratados com MTX 2 e 4mg quando comparado ao grupo DH (Figura 5B).

#### 4.5. Teste de tolerância à insulina

A administração de insulina aos animais em dieta hiperlipídica (DH) resulta em uma queda moderada nos níveis glicêmicos quando comparada ao grupo controle, sugerindo a presença de resistência à insulina (Figura 6A e 6B). O tratamento com MTX 1mg não foi capaz de alterar de maneira significativa o resultado observado com o teste de tolerância a insulina (Figura 6A).

Nos grupos tratados com MTX 2 e 4mg pudemos observar que os animais recuperaram a capacidade de reduzir sua glicemia em resposta à insulina, sugerindo que estes possam estar mais sensíveis à sinalização periférica da insulina quando comparados ao DH (Figura 6B).

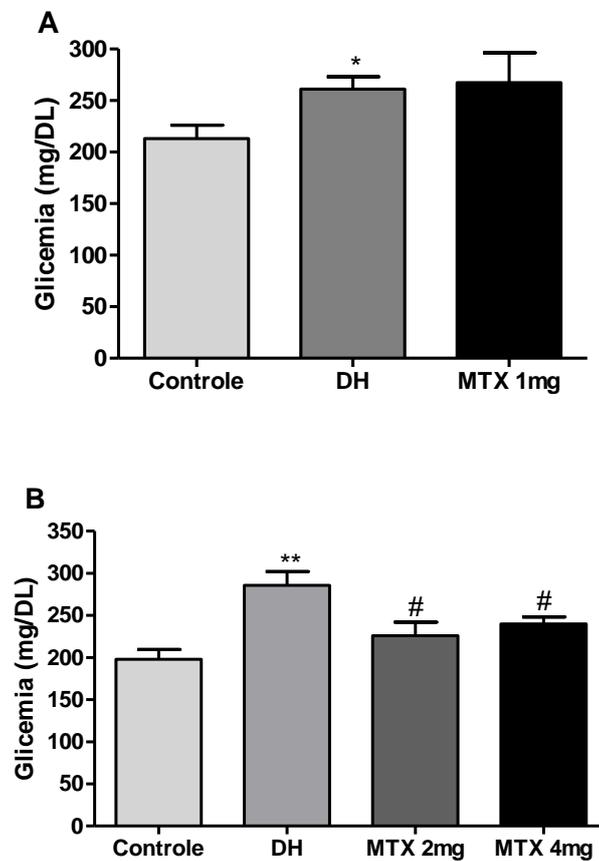


Figura 5. Níveis glicêmicos dos animais Controle, DH e MTX 1mg (Painel A) e dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 10 animais. \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH (n=10).

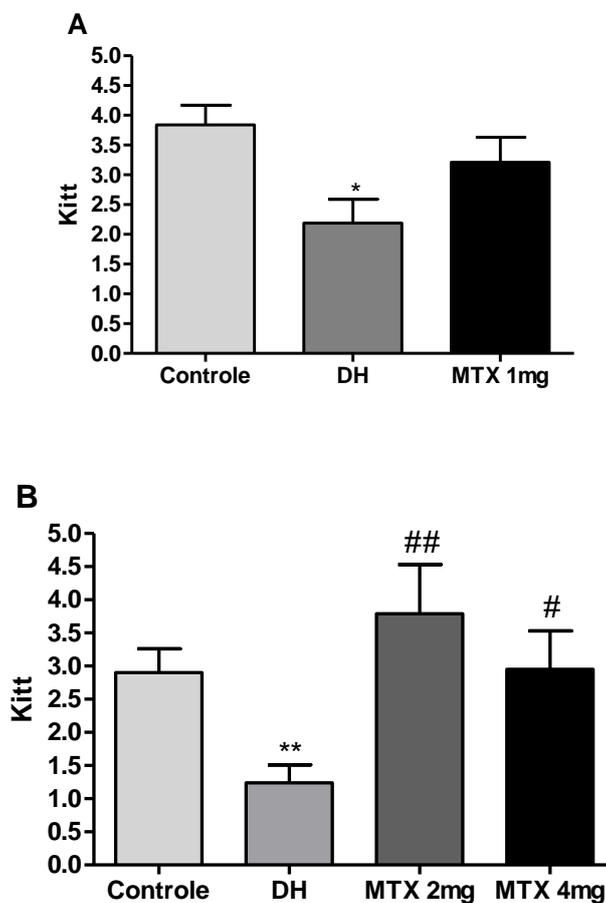


Figura 6. Teste de tolerância à insulina dos animais Controle, DH e MTX 1mg (Painel A) e dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (Painel B). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 7 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao DH.

#### 4.6. Avaliação *ex-vivo* da produção de adipocitocinas antiinflamatórias

Os níveis de adiponectina avaliados após a cultura de curto-prazo do tecido adiposo epididimal dos camundongos mantidos durante 12 semanas com dieta hiperlipídica mostram que nos obesos o tecido adiposo epididimal libera quantidades reduzidas de adiponectina, quando comparado ao controle (Figura 7). Nos grupos tratados com Metotrexato 2mg e 4 mg observou-se grande variação e há diferenças estatisticamente significativas somente entre o grupo experimental tratado com 2mg quando comparado ao grupo DH (Figura 7).

Ao avaliarmos os níveis de IL-10 durante a cultura pudemos observar que o tecido adiposo dos animais que receberam Metotrexato na dose de 4mg liberou quantidades significativamente maiores desta citocina quando comparado ao grupo DH, mas o mesmo não ocorreu na dose de 2mg (Figura 8).

#### 4.7. Avaliação *ex-vivo* da produção de adipocitocinas pró-inflamatórias

Ao avaliarmos os níveis de leptina liberados *ex-vivo* nas culturas de curto-prazo realizadas com tecido adiposo epididimal de animais do grupo DH observamos que houve um aumento significativo quando comparado aos animais do grupo Controle e, também pudemos observar uma redução significativa no grupo tratado com 4mg de Metotrexato quando comparada ao DH (Figura 9).

Quando avaliamos os níveis de TNF- $\alpha$  nas mesmas culturas observamos um aumento significativo destes no grupo DH quando comparados ao controle, mas o tratamento com Metotrexato 2mg e 4 mg não foi capaz de promover alterações estatisticamente significativas (Figura 10).

Os níveis de IL-6 liberados durante a cultura de curto-prazo mostram que houve uma redução destes somente no grupo de animais que recebeu 4mg de Metotrexato quando comparados ao DH (Figura 11).

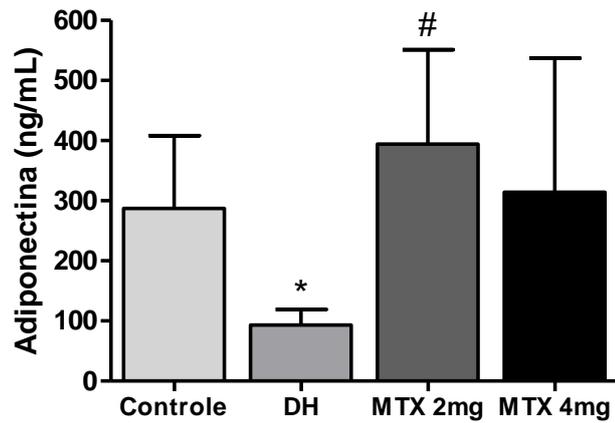


Figura 7. Adiponectina liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 6 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e #  $p < 0,05$  quando comparado ao DH.

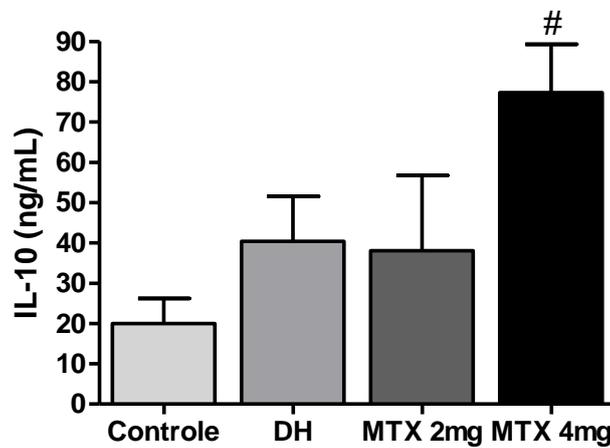


Figura 8. IL-10 liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais do grupo Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 6 animais. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

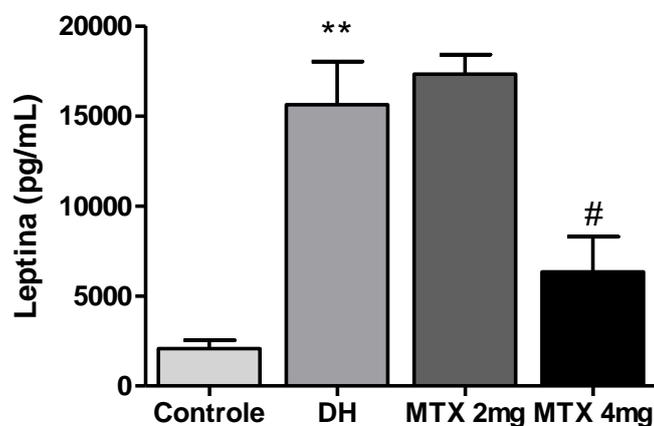


Figura 9. Leptina liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 6 animais. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  quando comparado ao DH.

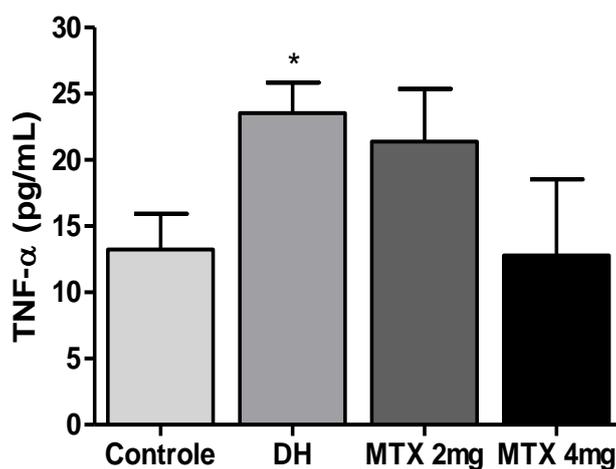


Figura 10. TNF- $\alpha$  liberado *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 6 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

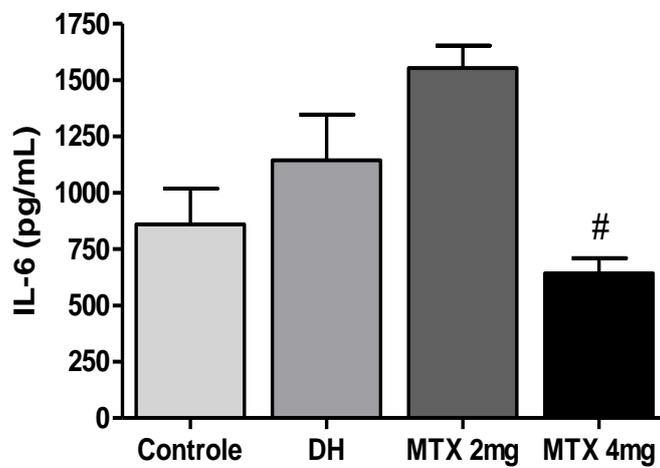


Figura 11. IL-6 liberada *ex-vivo* pelo tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão (EPM) de 6 animais. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

#### 4.8. Avaliação do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo

A expressão da proteína F4/80, um marcador de macrófagos ativados, foi avaliada por Western blot em extratos protéicos de tecido adiposo epididimal e observou-se um aumento significativo da expressão desta no grupo DH quando comparado ao grupo Controle (Figura 12). No tecido adiposo obtido dos animais tratados com 2mg e 4mg observamos uma redução significativa desta expressão, sugerindo uma redução do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal decorrente da obesidade (Figura 12).

Ao avaliarmos a expressão da proteína MCP-1, observamos novamente um aumento de sua expressão no tecido adiposo mesentérico dos animais do grupo DH e uma redução significativa desta expressão após o tratamento com Metotrexato em ambas doses empregadas (Figura 13).

#### 4.9. Avaliação de outros marcadores inflamatórios no tecido adiposo

Podemos observar na Figura 14, a presença aumentada de JNK fosforilada no tecido adiposo epididimal dos animais DH quando comparado aos animais controles. Porém, no tecido adiposo dos animais tratados com 4mg de Metotrexato, observamos uma redução da fosforilação da JNK, embora o mesmo não tenha sido observado com a dose de 2mg de Metotrexato.

A expressão de iNOS foi também avaliada no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e 4mg. Um aumento da expressão protéica de iNOS foi observado no grupo DH, quando comparado ao Controle. Já nos grupos tratados com 2mg e 4mg de Metotrexato observamos uma redução desta expressão quando comparado ao grupo DH (Figura 15).

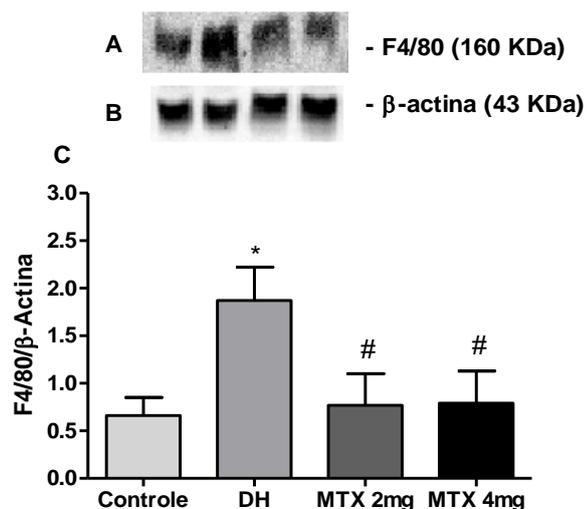


Figura 12. Expressão da proteína F4/80 no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (A e B representam um experimento). C. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos da quantificação de F4/80 corrigida pela expressão de  $\beta$ -actina. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

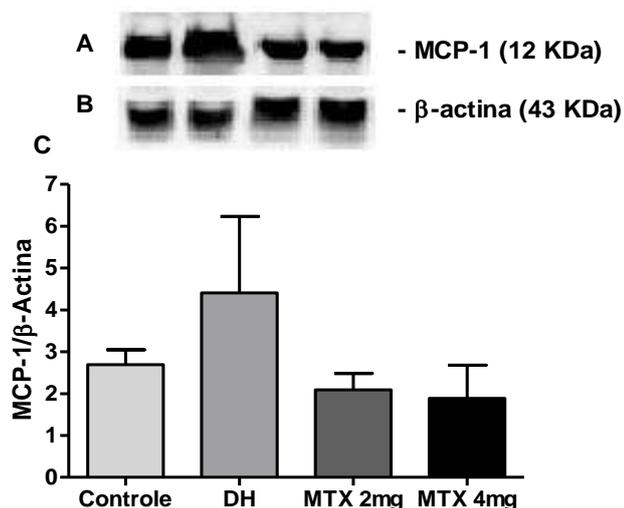


Figura 13. Expressão da proteína MCP-1 no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (A e B representam um experimento). C. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos da quantificação de MCP-1 corrigida pela expressão de  $\beta$ -actina. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

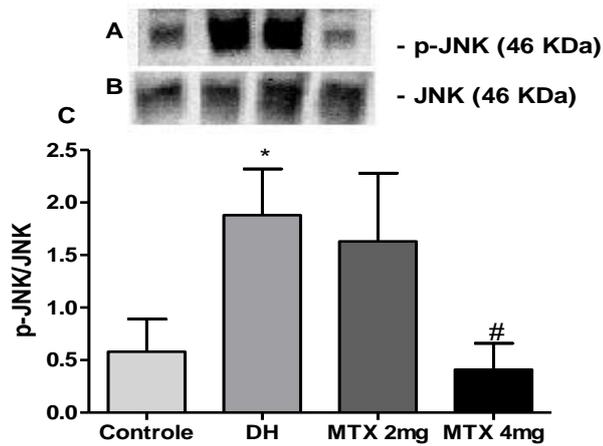


Figura 14. Níveis de fosforilação da c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) no tecido adiposo epididimal de animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (A e B representam um experimento). C. As barras mostram a quantificação de fosfo-JNK normalizados pela quantificação da JNK nativa apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

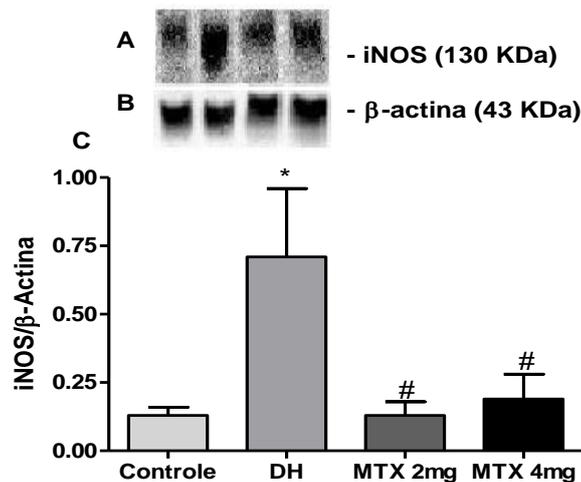


Figura 15. Expressão da proteína iNOS no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg (A e B representam um experimento). C. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos da quantificação de iNOS corrigida pela expressão de beta-actina. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

#### 4.10. Avaliação da atividade lipolítica *in vivo* e *in vitro*

Como podemos observar na Figura 16, a avaliação da atividade lipolítica basal obtida *ex-vivo* mostrou que o tecido adiposo epididimal dos animais mantidos em DH apresentava-se aumentada em relação ao Controle. Mas o tratamento com Metotrexato 4 mg foi capaz de reduzir a lipólise basal quando comparado ao grupo DH.

*In vitro*, o Metotrexato também foi capaz de inibir a lipólise basal em culturas de adipócitos 3T3-L1 na concentração de 3 ug/mL, sugerindo a presença de uma atividade antilipolítica do imunossupressor (Figura 17). Este efeito inibitório não está associado a toxicidade do Metotrexato, visto que o ensaio de MTT não mostrou alterações na respiração celular frente a incubação com diferentes concentrações do Metotrexato (dados não mostrados). A avaliação *in vitro* permitiu que pudéssemos avaliar o mecanismo envolvido nesta ação. O emprego de um antagonista de receptor de adenosina A1 foi capaz de reverter a ação antilipolítica observada para o Metotrexato *in vitro* (Figura 18). O mesmo pode ser observado no sistema de co-cultura adipócitos/macrófagos murinos que simula *in vitro* a interação entre adipócitos e macrófagos infiltrados no tecido adiposo que ocorre durante a obesidade. Nestes experimentos, novamente o Metotrexato mostrou sua atividade antilipolítica e a capacidade do antagonista de adenosina em reverter tal ação (Figura 19).

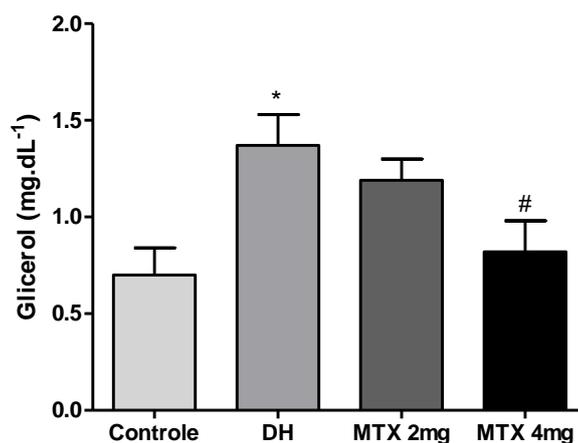


Figura 16. Lipólise basal no tecido adiposo epididimal dos animais Controle, DH, MTX 2mg e MTX 4mg. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos da quantificação de glicerol no sobrenadante das culturas de curto prazo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DH.

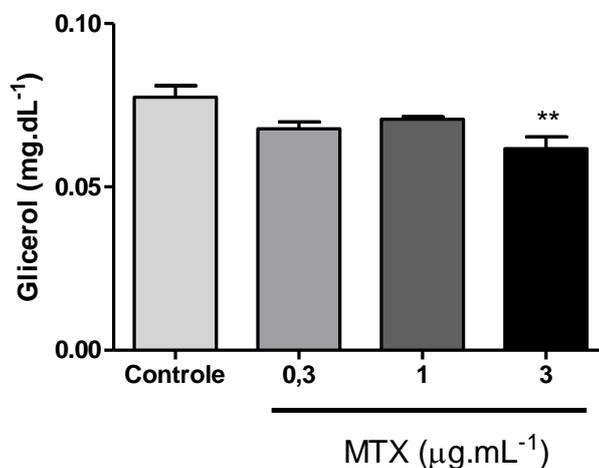


Figura 17. Lipólise basal em cultura de 3T3-L1 na ausência (controle) e presença de Metotrexato. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos da quantificação de glicerol no sobrenadante das culturas. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao controle.

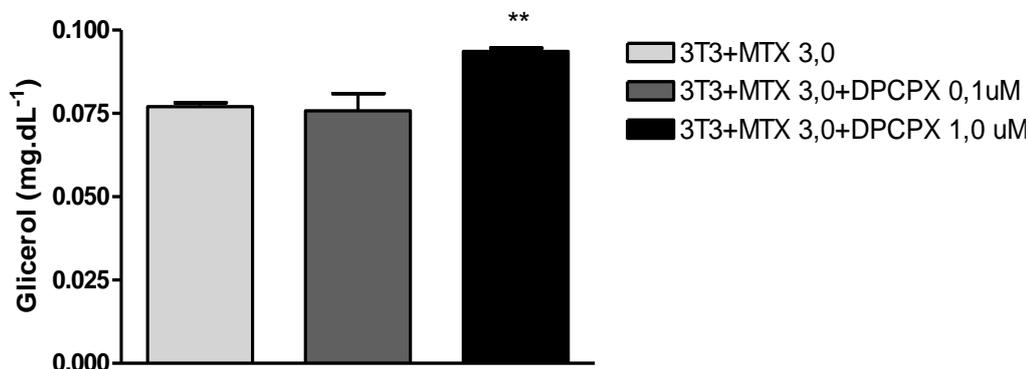


Figura 18. Lipólise basal em cultura de 3T3-L1 na presença de Metotrexato 3 ug/ml e DPCPX 0,1 e 1,0 ug/ml. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos da quantificação de glicerol no sobrenadante das culturas. \*\*p<0,01 quando comparado ao Metotrexato 3 ug/ml.

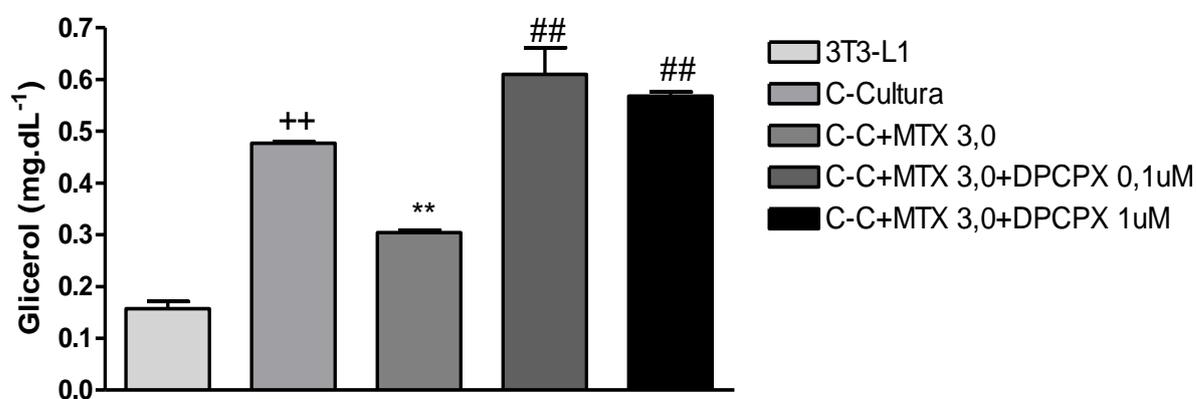


Figura 19. Lipólise basal em cultura isolada de 3T3-L1, co-cultura de 3T3-L1 e RAW 267.4 na ausência (C-C) e presença de Metotrexato 3 ug/ml e DPCPX 0,1 e 1,0 ug/ml. As barras mostram a média e erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos da quantificação de glicerol no sobrenadante das culturas. ++ p<0,01 quando comparado a 3T3-L1 isolada, \*\* p<0,01 quando comparado a ausência de Metotrexato e ##p<0,01 quando comparado ao Metotrexato 3 ug/ml.

#### 4.11. Avaliação da atividade imunossupressora em sistema de co-cultura

Como podemos observar em um ensaio preliminar realizado, a co-cultura de adipócitos e macrófagos estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, como a IL-6 e IL-10, respectivamente. Este sistema de co-cultura também permite o uso de estímulos, como o LPS respondendo com uma produção também aumentada de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias. Tem sido sugerido que este modelo *in vitro* pode ser útil no estudo das alterações inflamatórias associadas à obesidade. *In vitro*, o Metotrexato também foi capaz de inibir a produção de IL-6 e IL-10 quando a co-cultura foi estimulada com LPS (Figura 20 e 21).

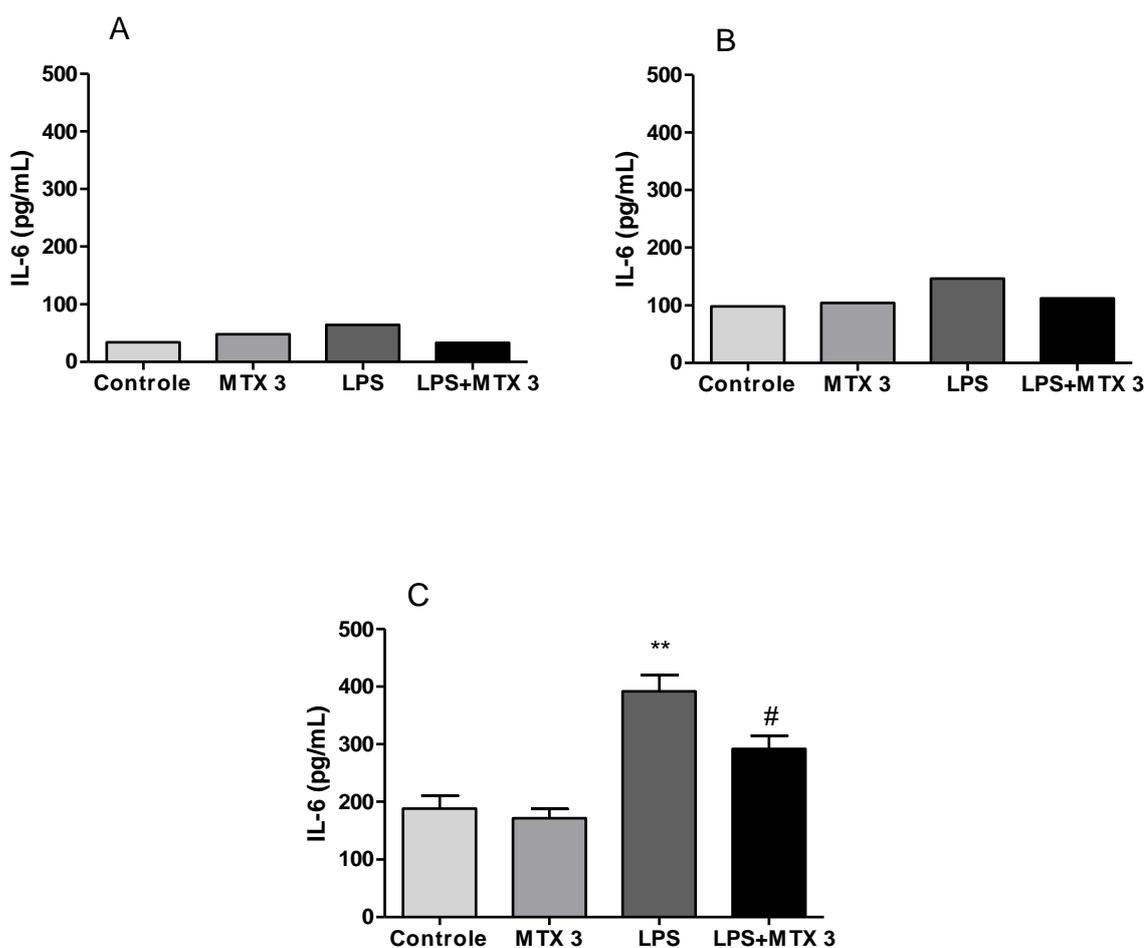


Figura 20. IL-6 no sobrenadante de cultura isolada de 3T3-L1 (Painel A), de RAW 267.4 (Painel B) e de co-cultura de 3T3-L1 e RAW 267.4 (Painel C). A barra Controle refere-se a cultura não-estimulada, MTX3 a cultura não estimulada na presença de Metotrexato 3 ug/ml, LPS a cultura estimulada com LPS e LPS+MTX3 a cultura estimulada com LPS na presença de Metotrexato 3 ug/ml. Resultados expressos como média e erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos (Painel C) e de um único experimento (Painel A e B). \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao LPS.

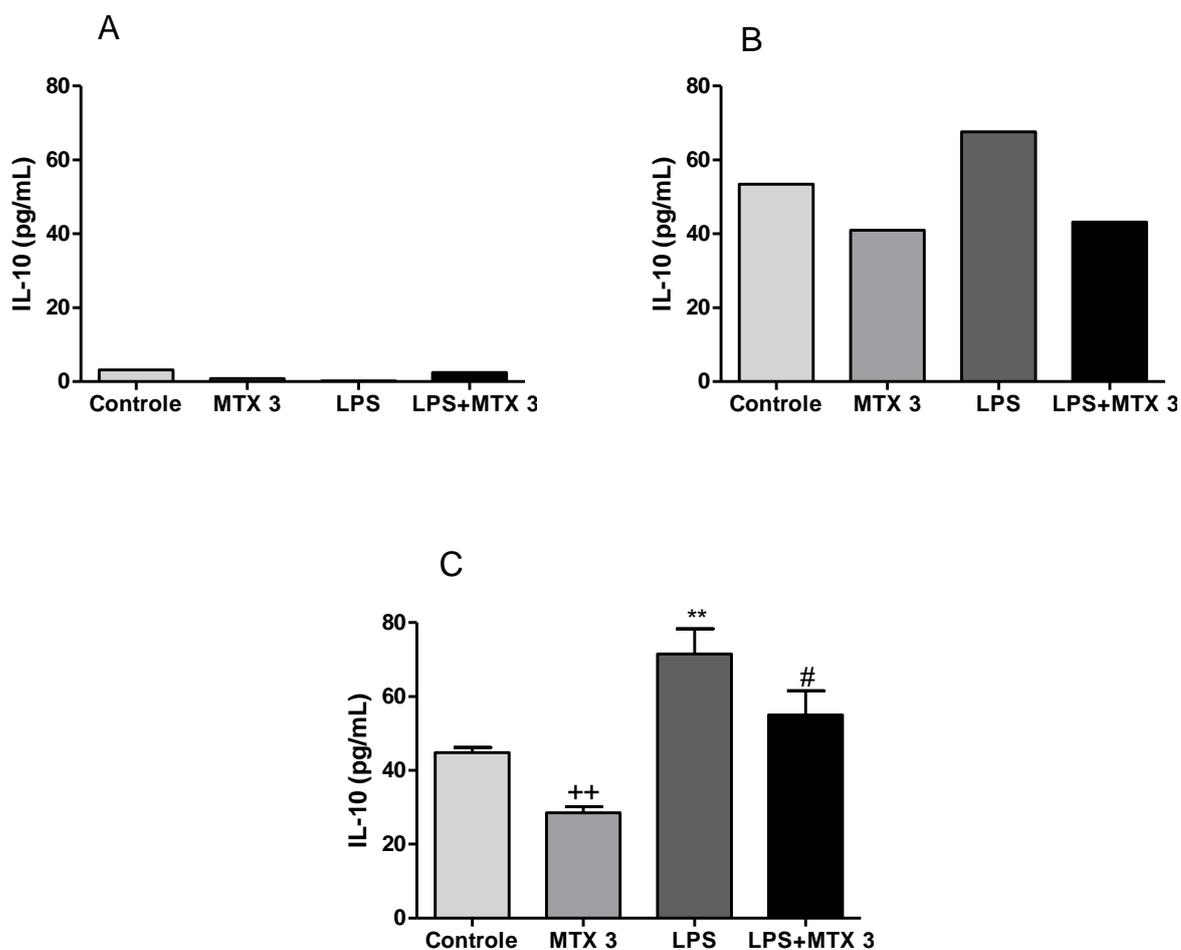


Figura 21. IL-10 no sobrenadante de cultura isolada de 3T3-L1 (Painel A), de RAW 267.4 (Painel B) e de co-cultura de 3T3-L1 e RAW 267.4 (Painel C). A barra Controle refere-se a cultura não-estimulada, MTX3 a cultura não estimulada na presença de Metotrexato 3 ug/ml, LPS a cultura estimulada com LPS e LPS+MTX3 a cultura estimulada com LPS na presença de Metotrexato 3 ug/ml. Resultados expressos como média e erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos (Painel C) e de um único experimento (Painel A e B). \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao LPS.

## 5. DISCUSSÃO

A obesidade, caracterizada pela expansão do tecido adiposo, tem sido correlacionada a um quadro de inflamação sistêmica, envolvendo a produção de adipocitocinas pró-inflamatórias e a resistência à insulina. Evidências sugerem uma relação entre obesidade, risco cardio-metabólico, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (Lakka *et al.*, 2002; McNeill *et al.*, 2005).

Camundongos mantidos em dieta hiperlipídica apresentam um aumento de tecido adiposo, resistência periférica a insulina e glicemia alterada, mostrando-se um modelo eficiente de obesidade onde é possível estudar a ação de fármacos que possam modificar estas alterações maléficas associadas à obesidade (De Souza *et al.*, 2005). De fato, os experimentos mostraram que após 8 ou 12 semanas de dieta hiperlipídica foi possível observar a indução da obesidade em nossos animais, caracterizada pelo aumento do peso corporal e da adiposidade. Este aumento de adiposidade foi acompanhado de alterações metabólicas caracterizadas pelo aumento da glicemia basal e redução da sensibilidade periférica à insulina, demonstrado pela redução das inclinações das curvas glicêmicas após a administração da insulina (Kitt). Em nossos resultados podemos observar que a manutenção de baixas doses de Metotrexato durante a indução da obesidade não foi capaz de modificar o peso corpóreo final e adiposidade, bem como parâmetros glicêmicos e de sensibilidade à insulina. No entanto, doses maiores (2 e 4 mg) ao final do período experimental, ou seja, quando a obesidade já está instalada, resultou em uma melhora na homeostase glicêmica e na captação de glicose pelos tecidos, embora não haja redução do peso corporal ou adiposidade. Deste modo, prosseguimos apenas com este protocolo avaliando quais mecanismos estariam envolvidos na melhoras observadas.

Sabemos atualmente, que o tecido adiposo possui a capacidade de produção de adipocitocinas, substâncias que participam da resposta inflamatória. Estas adipocitocinas podem apresentar ações pró- ou antiinflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptina e, adiponectina e IL-10, respectivamente. Estas adipocitocinas podem modificar a função dos adipócitos e atuar como um fator importante para a redução da sensibilidade tecidual à insulina e contribuir para a expansão do próprio tecido adiposo (Zeyda e Stulnig, 2007).

Como mencionado, o TNF- $\alpha$  produzido pelo tecido adiposo é capaz de induzir resistência a insulina por competir pela mesma via de sinalização da insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993; Shoelson *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, tratados com Infliximab, um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  apresentaram uma redução significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  e leptina após 2 semanas de tratamento, e paralelamente a inibição destas citocinas, observou-se melhora da capacidade de sinalização da insulina no músculo esquelético e no fígado, contribuindo para a homeostasia glicêmica (Araújo *et al.*, 2007). Nossos experimentos mostram que após 12 semanas de dieta hiperlipídica, os animais apresentaram um aumento da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptina, mas que após duas semanas de tratamento com a dose de 4 mg de Metotrexato, houve uma redução dos níveis de leptina e IL-6, que podem estar relacionadas à melhora observada na resistência a insulina e a glicemia basal. Mas curiosamente, não observamos uma redução dos níveis de TNF- $\alpha$  nos animais tratados com Metotrexato. O Metotrexato é um antagonista do ácido fólico, que tem como sítio de ação primário a enzima dihidrofolato-redutase. A inibição dessa enzima leva a efeitos tóxicos, através da depleção parcial de cofatores tetrahidrofolato, que são necessários para a síntese de purinas e timidilato, precursores do DNA e do RNA. Sendo a síntese de DNA e RNA interrompida e a replicação celular bloqueada, o Metotrexato pode ser empregado no tratamento de câncer, como inicialmente era utilizado, e subsequentemente, utilizado no tratamento de patologias não-neoplásicas, como uma droga antiinflamatória e imunossupressora (Genestier *et al.*, 2000). Observa-se um efeito antiinflamatório e imunossupressor associado ao uso do Metotrexato, pois este é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-6 e, induzir apoptose de linfócitos ativados (Fraser *et al.*, 2002).

A melhora observada nos camundongos obesos também pode estar associada ao fato do Metotrexato ter revertido redução na produção de adipocitocinas antiinflamatórias, como a adiponectina e a IL-10 (Hu *et al.*, 1996; Hotta *et al.*, 2001).

O tecido adiposo secreta várias substâncias com atividade quimiotáxica que tem como função atrair monócitos da circulação periférica que se diferenciarão em macrófagos no tecido adiposo e passarão a contribuir com a produção de mais adipocitocinas e substâncias quimiotaxias para atração de novos monócitos. Foi

demonstrado que o tecido adiposo de obesos possui um aumento da expressão de MCP-1 (ou CCL2), um fator chave no recrutamento de macrófagos (Kanda *et al.*, 2006). Quando avaliamos esta expressão em nossos experimentos, observamos que o tratamento com Metotrexato foi capaz de reduzir a expressão de MCP-1 condizente com a redução da expressão do marcador celular de macrófagos F4/80 observada (Weisberg *et al.*, 2003).

Ou seja, o imunossupressor reduz o infiltrado de macrófagos e duas possibilidades podem ser responsáveis e até co-existirem para explicar esta ação observada: a migração de monócitos ao tecido adiposo pode estar sendo inibida de maneira direta pelo Metotrexato via inibição da expressão de moléculas de adesão (Vivasnathan *et al.*, 2007) ou o Metotrexato pode estar atuando sobre o tecido adiposo inibindo a produção de MCP-1 e se observaria uma redução da migração de monócitos para este local (Ho *et al.*, 2003).

A c-Jun amino-terminal quinase (JNKs) pode interferir com a ação da insulina em células cultivadas e são ativadas por citocinas inflamatórias e ácidos graxos livres, moléculas que têm sido implicados no desenvolvimento da diabetes tipo 2 (Hirosumi *et al.*, 2002). Em modelos animais de obesidade induzida por dieta ocorre maior ativação de JNK no fígado e músculo (Prada *et al.*, 2004). Observamos a presença aumentada de JNK fosforilada no tecido adiposo epididimal dos animais DH quando comparado aos animais controles. Porém, no tecido adiposo dos animais tratados com 4mg de Metotrexato, observamos uma redução da expressão de JNK fosforilada.

Outro marcador inflamatório avaliado foi a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida, a iNOS, no tecido adiposo epididimal. A iNOS e a SOCS, cujos genes são alvos das vias da JNK e I $\kappa$ B, também estão implicadas na resistência a insulina promovida pelo TNF- $\alpha$  (Emanuelli *et al.*, 2001). A expressão de iNOS é estimulada pelo TNF- $\alpha$  e está elevada na obesidade; camundongos com mutações no gene da iNOS desenvolvem menos resistência a insulina, associada a obesidade do que seus controles com gene intacto da iNOS (Rui *et al.*, 2002). Observamos em nossos experimentos que os animais mantidos em dieta hiperlipídica por 12 semanas apresentam um aumento da expressão iNOS, e que o tratamento com as duas doses (2 e 4 mg) resultou na redução dessa expressão, sugerindo que a inibição da iNOS também possa contribuir para os eventos observados.

A redução da lipólise em patologias como diabetes, dislipidemias e risco cardio-metabólico é benéfica, visto que, em situações patológicas como essas existem um aumento de ácidos graxos livres na circulação (lipólise acentuada). Para o diabetes, por exemplo, ocasiona resistência a insulina e hiperglicemia, já em casos de risco cardio-metabólico em que temos um aumento da lipólise devido a própria doença, estes ácidos graxos livres podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, visto que estes podem oxidar-se na circulação e levar a formação de placas de ateroma – aterosclerose, trombose entre outras, além de dislipidemia (Kirk e Klein, 2009). Como citado, a estimulação de receptores de adenosina A1 (A1AdoR) está associada a uma ação antilipolítica e, como parte dos efeitos farmacológicos do Metotrexato parecem ser decorrentes de sua capacidade de liberar adenosina, avaliamos a capacidade deste fármaco de modificar a lipólise basal *ex vivo* e *in vitro*.

Trabalhos recentes sugerem que a redução da ação da adenosina por sua decomposição ou por bloqueio do receptor de adenosina A1 em animais obesos não modifica o peso corporal e a adiposidade, mas resulta em melhora da tolerância à glicose e reduz os níveis de insulina (Xu *et al.*, 1998). *In vitro*, a utilização do antagonista DPCPX aumenta a lipólise basal e a induzida pela adrenalina em adipócitos. Acredita-se que o próprio adipócito libere adenosina e o bloqueio da ação desta explicaria o aumento da lipólise observada (Szkudelski *et al.*, 2009). Em nossos experimentos, a atividade lipolítica basal obtida *ex-vivo* mostrou que o tecido adiposo epididimal dos animais mantidos em DH apresentava-se aumentada em relação ao Controle. Quando tratados com Metotrexato, a lipólise basal foi reduzida quando comparado ao grupo DH. *In vitro*, o Metotrexato também foi capaz de inibir a lipólise basal em culturas de adipócitos 3T3-L1 na concentração de 3 ug/mL, sugerindo a presença de uma atividade antilipolítica do imunossupressor mediada pela liberação de adenosina, visto que *in vitro*, a utilização do antagonista de receptor de adenosina A1, o DPCPX, foi capaz de reverter a ação antilipolítica observada para o Metotrexato. O mesmo pode ser observado no sistema de cocultura adipócitos/macrófagos murinos que simula *in vitro* a interação entre adipócitos e macrófagos infiltrados no tecido adiposo que ocorre durante a obesidade. Nesta situação a lipólise também é estimulada e mais uma vez o

Metotrexato foi capaz de inibir a lipólise por mecanismos mediados por ativação do receptor de adenosina.

Ao avaliarmos a produção de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias no sistema de co-cultura, observamos que também há modificações na produção destas quando adipócitos entram em contato com macrófagos. Nesta situação, a estimulação de receptores do tipo *toll-4* (TLR-4) pelo lipopolissacarídeo (LPS) atua potenciando a produção de mediadores pró-inflamatórios. Evidências sugerem que ácidos graxos saturados liberados pelos adipócitos durante a lipólise servem como ligantes naturais que estimulam os TLR-4 induzindo a ativação da resposta inflamatória nos macrófagos infiltrados no tecido adiposo (Suganami *et al.*, 2009). Deste modo, o sistema de co-cultura macrófagos/adipócitos com a estimulação de TLR-4 pode servir como um modelo *in vitro* adequado ao estudo da inflamação no tecido adiposo durante a obesidade. Os efeitos antiinflamatórios exercidos pelo Metotrexato também foram observados *in vitro* pela inibição da produção de IL-6. No entanto, o Metotrexato *in vitro* também foi capaz de inibir a produção de IL-10, uma citocina considerada antiinflamatória, sugerindo que *in vivo*, outros mecanismos imunomoduladores possam estar presentes.

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados sugerem que o imunossupressor metotrexato melhora o controle glicêmico e a sinalização da insulina em camundongos obesos, apesar de não reduzir a adiposidade, por reduzir o infiltrado de macrófagos e a produção de adipocitocinas pró-inflamatórias e, aumentar a produção das adipocitocinas antiinflamatórias no tecido adiposo.

Adicionalmente, o metotrexato atua como agente antilipolítico via liberação de adenosina e ação desta em receptor A1 o que também pode contribuir para a reversão da resistência à insulina observada na obesidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, E. P.; De Souza, C. T.; Ueno, M.; Cintra, D. E.; Bertolo, M. B.; Carvalheira, J. B.; Saad, M. J.; Velloso, L. A. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, 148(12): 5991-5997, 2007.

Bahceci, M.; Gokalp, D.; Bahceci, S.; Tuzcu, A.; Atmaca, S.; Arikan, S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and highsensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? **J Endocrinol Invest**, 30(3):210-4, 2007

Bassols, J.; Botas, P.; Moreno-Navarrete, J. M.; Delgado, E.; Ortega, F.; Ricart, W.; Fernandez-Real, J. M. Environmental and genetic factors influence the relationship between circulating IL-10 and obesity phenotypes. **Obesity (Silver Spring)**, 18(3):611-8, 2010.

Bastard, J. P.; Jardel, C.; Bruckert, E.; Blondy, P.; Capeau, J.; Laville, M.; Vidal, H.; Hainque, B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, 85(9):3338-42, 2000.

Bastos, D. H.; Rogero, M. M.; Arêas, J. A. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 53(5):646-56, 2009.

Bernstein, L. E.; Berry, J.; Kim, S.; Canavan, B.; Grinspoon, S. K. Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. **Arch Intern Med**, 166: 902-908, 2006.

Blackburn, S. D.; Wherry, E. J. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. **Trends Microbiol**, 15(4):143-6, 2007.

Boucher, J.; Castan-Laurell, I.; Daviaud, D.; Guigne, C.; Buleon, M.; Carpene, C.; Saulnier-Blache, J. S.; Valet, P. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. **Horm Metab Res**, 37(12):761-7, 2005.

Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassell, R. L.; Green, S., Fiore, N; Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.** 72,3666, 1975.

Cawthorn, W. P.; Heyd, F.; Hegyi, K.; Sethi, J. K. Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. **Cell Death Differ**, 14(7):1361-73, 2007.

Christiansen, T.; Richelsen, B.; Bruun, J. M. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 29:146-50, 2004.

Cinti, S.; Mitchell, G.; Barbatelli, G.; Murano, I.; Ceresi, E.; Faloia, E.; Wang, S.; Fortier, M.; Greenberg, A. S.; Obin, M. S. Adipocyte death defines macrophage

localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, 46(11):2347- 55, 2005.

Corso, A. L. **Análise da resposta de fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-10 no lavado traqueobrônquico de recém-nascidos prematuros submetidos à ventilação mecânica**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2003.

Costa, J. V.; Duarte, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Med Port**, 19: 251-256, 2006.

Cronstein, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **J Appl Physiol**, 76(1):5-13, 1994.

Curat, C. A.; Miranville, A.; Sengenès, C.; Diehl, M.; Tonus, C.; Busse, R.; Bouloumié, A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. **Diabetes**, 53: 1285-92, 2004.

Dal Farra, C.; Zsürger, N.; Vincent, J. P.; Cupo, A. Binding of a pure 125I-monoiodoleptin analog to mouse tissues: a developmental study. **Peptides**, 21(4):577-87, 2000.

De Souza, C. T.; Araujo, E. P.; Bordin, S.; Ashimine, R.; Zollner, R. L.; Boschero, A. C.; Saad, M. J.; Velloso, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, 146(10):4192– 4199, 2005.

Elmquist, J. K. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 25 Suppl 5:S78-82, 2001.

Emanuelli, B.; Peraldi, P.; Filloux, C.; Chavey, C.; Freidinger, K.; Hilton, D. J.; Hotamisligil, G. S.; Van Obberghen, E. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adipose tissue of obese mice. **J Biol Chem**, 276(51):47944-9, 2001.

Eskdale, J.; Gallagher, G.; Verweij, C. L.; Keijsers, V.; Westendorp, R. G.; Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95(16):9465-70,1998.

Fabbri L., Caramori G.; Cosma P.; Ciaccia A. Methotrexate in the Treatment of Systemic Glucocorticoid-Dependent Severe Persistent Asthma : a Word of Caution. **Am Rev Respir Dis**. 143 ( 1 ) : 179-81, 1991.

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, 115(5):911-9, 2005.

Fatholahi, M.; Xiang, Y.; Wu, Y.; Li, Y.; Wu, L.; Dhalla, A. K.; Belardinelli, L.; Shryock, J. C. A novel partial agonist of the A(1)-adenosine receptor and evidence of receptor homogeneity in adipocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, 317(2):676-84, 2006.

Feagan, B. G.; Rochon, J.; Fedorak, R. N.; Irvine, E. J.; Wild, G.; Sutherland, L.; Steinhart, A. H.; Greenberg, G. R.; Gillies, R.; Hopkins, M.; Hanauer, S. B.; McDonald, J. W. D. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. **N Engl J Med**, 2;332(5):292-7, 1995.

Fonseca-Alaniz, M. H; Takada, J.; Alonso-Vale, M. I.; Lima, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatrics**. 83:S192-203, 2007.

Fraser, A. G.; Morton, D.; McGovern, D.; Travis, S.; Jewell, D. P. The efficacy of methotrexate for maintaining remission in inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, 16: 693–697, 2002.

Fruebis, J.; Tsao, TS.; Javorschi, S.; Ebbets-Reed, D.; Erickson, M. R.; Yen, F. T.; Bihain, B. E.; Lodish, H. F. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 13;98(4):2005-10, 2001.

Genestier, L.; Paillot, R.; Quemeneur, L.; Izeradjene, K.; Revillard, J. P. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology**, 47(2-3):247-57, 2000.

Gerards, A. H.; de Lathouder, S.; de Groot, E. R.; Dijkmans, B. A.; Aarden, L. A. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, 42(10):1189-96, 2003.

Godoy-Matos, A. F. **Síndrome metabólica**. São Paulo: Atheneu, 2006.

Gonokami, Y.; Konno, S. I.; Kurokawa, M.; Adachi, M. Effect of methotrexate on asthmatic reaction in sensitized guinea pigs. **Int Arch Allergy Immunol**, 106(4):410-5, 1995.

Gonzalez-Gay, M. A.; De Matias, J. M.; Gonzalez-Juanatey, C.; Garcia-Porrúa, C.; Sanchez-Andrade, A.; Martin, J.; Llorca, J. Anti-tumor necrosis factor alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, 24(1):83-6, 2006.

Goodman, L. S.; Gilman, G. A.; Rall, T. W.; Murad, F. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª edição, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005

Guimarães, D. E. D.; Sardinha, F. L. C.; Mizurini, D. M.; Carmo, M. G. T. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev. Nutr**, 20(5):549-559, set./out., 2007

Haddy, N.; Sass, C.; Drosch, S.; Zaiou, M.; Siest, G.; Ponthieux, A.; Lambert, D.; Visvikis, S. IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort. **Atherosclerosis**, 170(2):277-83, 2003.

Havel, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, 53(Suppl 1): S143-51, 2004.

Herfarth, H.; Scholmerich, J. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroad. **Gut**, 50(2): 146–147, 2002.

Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Görgün, C. Z.; Uysal, K. T.; Maeda, K.; Karin, M.; Hotamisligil, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, 21;420(6913):333-6, 2002.

Ho, C. Y.; Wong, C. K.; Li, E. K.; Tam LS.; Lam CW. Suppressive effect of combination treatment of leflunomide and methotrexate on chemokine expression in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol**, 133(1):132–8, 2003.

Hotamisligil, G. S.; Budavari, A.; Murray, D.; Spiegelman, B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor alpha. **J Clin Invest**, 94(4):1543-9, 1994.

Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259:87-91, 1993.

Hotta, K.; Funahashi, T.; Bodkin, N. L.; Ortmeyer, H. K.; Arita, Y.; Hansen, B. C.; Matsuzawa, Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. **Diabetes**, 50:1126-33, 2001.

Hu, E.; Liang, P.; Spiegelman, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J Biol. Chem**, 271:10697-703, 1996.

Kanda H.; Tateya S.; Tamori Y.; Kotani K.; Hiasa K.; Kitazawa R.; Kitazawa S.; Miyachi H.; Maeda S.; Egashira K.; Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**. 2006;116(6):1494-505.

Kirk, E. P.; Klein, S. Pathogenesis and pathophysiology of the cardiometabolic syndrome. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, 11(12):761-5, 2009.

Koerner, A.; Kratzsch, J.; Kiess, W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin—the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 19(4):525-46, 2005.

Kumada, M.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Kobayashi, H.; Okamoto, Y.; Ohashi, K. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloprotease-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. **Circulation**, 109:2046-9, 2004.

Lakka, H. M.; Laaksonen, D. E.; Lakka, T. A. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, 288:2709-2716, 2002.

Lam, Q. L.; Liu, S.; Cao, X.; Lu, L. Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. **Eur J Immunol**, 36(12):3118-30, 2006.

Masaki, T.; Chiba, S.; Tatsukawa, H.; Yasuda, T.; Noguchi, H.; Seike, M, Yoshimatsu, H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. **Hepatology**, 40:177-84, 2004.

Mattison, R.; Jesen, M. The adipocyte as an endocrine cell. **Curr Op Endocrinol Diab**, 10:317-21, 2003.

McDonald, C. J. The uses of systemic chemotherapeutic agents in psoriasis **Pharmacy Ther**, 14:1-24, 1981.

McNeill, A. M.; Rosamond, W. D.; Girman, C. J. The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Diabetes Care**, 28:385-390, 2005.

Mocellin, S.; Panelli, M. C.; Wang, E.; Nagorsen, D.; Marincola, F. M. The dual role of IL-10. **Trends Immunol**, 24(1):36-43, 2003.

Moller, D. E. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, 11(6):212-7, 2000.

Moore, K. W.; Vieira, P.; Fiorentino, D. F.; Trounstein, M. L.; Khan, T. A.; Mosmann, T. R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, 248(4960):1230-4, 1990.

Morin, C.L.; Eckel, R. H.; Marcel, T.; Pagliassotti, M. J. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity. **Endocrinology**, 138(11):4665-71, 1997.

Muoio, D. M.; Lynis Dohm, G. Peripheral metabolic actions of leptin. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 16(4):653-66, 2002.

Nishimura, K.; Setoyama, T.; Tsumagari, H.; Miyata, N.; Hatano, Y.; Xu, L.; Jisaka, M.; Nagaya, T.; Yokota, K. Endogenous prostaglandins E2 and F 2alpha serve as an anti-apoptotic factor against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in mouse 3T3-L1 preadipocytes. **Biosci Biotechnol Biochem**, 70(9):2145-53, 2006.

Nonogaki, K.; Fuller, G. M.; Fuentes, N. L.; Moser, A. H.; Stappans, I.; Grunfeld, C.; Feingold, K. R. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. **Endocrinology**, 136(5):2143-9, 1995.

Otto, T. C.; Lane, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 40(4):229-42, 2005.

Pauli, J. R.; Ropelle, E. R.; Cintra, D. E.; Carvalho-Filho, M. A.; Moraes, J. C.; De Souza, C. T.; Velloso, L. A.; Carvalheira, J. B.; Saad, M. J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology**. 586 659-71, 2008.

Pinto, L. deF.; Compri, C. M.; Fornari, J. V.; Bartchewsky, W.; Cintra, D. E.; Trevisan, M.; Carvalho, Pde. O.; Ribeiro, M. L.; Velloso, L. A.; Saad, M. J.; Pedrazzoli, J. Jr.; Gambero, A. The immunosuppressant drug, thalidomide, improves hepatic alterations induced by a high-fat diet in mice. **Liver Int**. 30(4):603-10, 2010.

Prada, P. O.; Zecchin, H. G.; Gasparetti, A. L.; Torsoni, M. A.; Ueno, M.; Hirata, A. E.; Corezola do Amaral, M. E.; Höer, N. F.; Boschero, A. C.; Saad, M. J. Western

diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, 146(3):1576-87, 2005.

Prins, J. B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 16(4):639-651, 2002.

Rui, L.; Yuan, M.; Frantz, D.; Shoelson, S.; White, M. F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. **J Biol Chem**. 1;277(44):42394-8, 2002. Epub 2002 Sep 12.

Schwartz, M. W.; Baskin, D. G.; Bukowski, T. R.; Kuijper, J. L.; Foster, D.; Lasser, G.; Prunkard, D. E.; Porte, D. Jr.; Woods, S. C.; Seeley, R. J.; Weigle, D. S. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, 45(4):531-5, 1996.

Senn, J. J.; Klover, P. J.; Nowak, I. A.; Zimmers, T. A.; Koniaris, L. G.; Furlanetto, R. W.; Mooney, R. A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. **J Biol Chem**, 278(16):13740-6, 2003.

Shoelson, S. E.; Lee, J.; Yuan, M. Inflammation and the IKK $\beta$ /I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B axis in obesity – and diet-induced insulin resistance. **J Obes Relat Metab Disord**, 27 (Suppl 3):S49-S52, 2003.

Skurk, T.; Alberti-Huber, C.; Herder, C.; Hauner, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, 92(3):1023-33, 2007.

Suganami, T.; Yuan, X.; Shimoda, Y.; Uchio-Yamada, K.; Nakagawa, N.; Shirakawa, I.; Usami, T.; Tsukahara, T.; Nakayama, K.; Miyamoto, Y.; Yasuda, K.; Matsuda, J.; Kamei, Y.; Kitajima, S.; Ogawa, Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. **Circ Res**, 2;105(1):25-32, 2009.

Szkudelski, T.; Szkudelska, K.; Nogowski, L. Effects of adenosine A1 receptor antagonism on lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. **Physiol Res**, 58(6):863-71, 2009.

Tam, C. S.; Garnett, S. P.; Cowell, C. T.; Heilbronn, L. K.; Lee, J. W.; Wong, M.; Baur, L. A. IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. **Horm Res Paediatr**, 73(2):128-34, 2010.

Tian, H.; Cronstein, B. N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, 65(3):168-73, 2007.

Tomlinson, J. W.; Walker, E. A.; Bujalska, I. J.; Draper, N.; Lavery, G. G.; Cooper, M. S.; Hewison, M.; Stewart, P. M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. **Endocr Rev**, 25:831– 866, 2004.

Uysal, K. T.; Wiesbrock, S. M.; Marino, M. W.; Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, 389(6651):610-4, 1997.

Ventre, J.; Doebber, T.; Wu, M.; MacNaul, K.; Stevens, K.; Pasparakis, M.; Kollias, G.; Moller, D. E. Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and non-obese mice. **Diabetes**, 46(9):1526-31, 1997.

Visvanathan, S.; Marini, J. C.; Smolen, J. S.; Clair, E. W.; Pritchard, C.; Shergy, W.; Pendley, C.; Baker, D.; Bala, M.; Gathany, T.; Han, J.; Wagner, C. Changes in biomarkers of inflammation and bone turnover and associations with clinical efficacy following infliximab plus methotrexate therapy in patients with early rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, 34(7):1465-74, 2007.

Weisberg, S. P.; Hunter, D.; Huber, R.; Lemieux, J.; Slaymaker, S.; Vaddi, K.; Charo, I.; Leibel, R. L.; Ferrante, A. W. Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **J Clin Invest**, 116(1):115-24, 2006.

Weisberg, S. P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A. W. Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, 112:1796-808, 2003.

Weyer, C.; Funahashi, T.; Tanaka, S.; Hotta, K.; Matsuzawa, Y.; Pratley, R. E.; Tataranni, P. A. Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 86(5):1930-5, 2001.

White, U. A.; Stephens, J. M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**. 318(1-2):10-4, 2010.

Wolf, A. M.; Wolf, D.; Rumpold, H.; Enrich, B.; Tilg, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, 323:630-5, 2004.

Wulster-Radcliffe, M. C.; Ajuwon, K. M.; Wang, J.; Christian, J. A.; Spurlock, M. E. Adiponectin differentially regulate cytokines in porcine macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, 316:924-9, 2004.

Xu, B.; Berkich, D. A.; Crist, G. H.; LaNoue, K. F. A1 adenosine receptor antagonism improves glucose tolerance in Zucker rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 274:271-279, 1998.

Xu, H.; Barnes, G. T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C. J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J. S.; Tartaglia, L. A.; Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, 112:1821-30, 2003.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K.; Eto, K.; Akanuma, Y.; Froguel, P.; Foufelle, F.; Ferre, P.; Carling, D.; Kimura, S.; Nagai, R.; Kahn, B. B.; Kadowaki, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, 8(11):1288-95, 2002.

Yazdani-Biuki, B.; Stelzl, H.; Brezinschek, H. P.; Hermann, J.; Mueller, T.; Kripl, P.; Graninger, W.; Wascher, T. C. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. **Eur J Clin Invest**, 34:641-2 15, 2004.

Zeyda, M.; Stulnig, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunol Lett**, 112(2):61-7, 2007.

## 8. Anexo

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**



Bragança Paulista, 21 de Fevereiro de 2008

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: “ AVALIAÇÃO DA TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA NAS ALTERAÇÕES SISTÊMICAS E DO TECIDO ADIPOSEO EM CAMUNDOGNOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA.”

**Autor(es):** PROF(A).DR(A) ALESSANDRA GAMBERO

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 001/08 (Citar este número nas correspondências referentes a este projeto)

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** APROVADO

Atenciosamente,

  
**MARCELO LIMA RIBEIRO**

**Vice-coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas – USF**  
**Universidade São Francisco**

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arç - CEP 13045-270 (19) 3779-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036