

**ÉRICA MARTINS FERREIRA GOTARDO**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA  
ENDOCANABINÓIDE NA ATIVAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS E NAS ALTERAÇÕES PRESENTES NO  
TECIDO ADIPOSEO DURANTE A OBESIDADE**

**Bragança Paulista**

**2012**

**ÉRICA MARTINS FERREIRA GOTARDO**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA  
ENDOCANABINÓIDE NA ATIVAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS E NAS ALTERAÇÕES PRESENTES NO  
TECIDO ADIPOSEO DURANTE A OBESIDADE**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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**

**2012**

W D 210 Gotardo, Érica Martins Ferreira.  
G699a Avaliação da participação do sistema endocanabinóide na ativação de macrófagos e nas alterações presentes no tecido adiposo durante a obesidade / Érica Martins Ferreira Gotardo. -- Bragança Paulista, 2012.  
61 p.

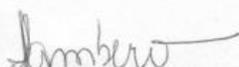
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Alessandra Gambero.

1. Sistema endocabinóide. 2. Obesidade. 3. Adipócitos.  
4. Receptor CB1. 5. Receptor CB2. 6. Macrófagos.  
I. Gambero, Alessandra. II. Título.

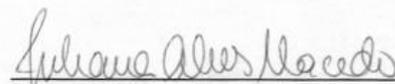
Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

GOTARDO, ÉRICA MARTINS FERREIRA "AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E NAS ALTERAÇÕES PRESENTES NO TECIDO DURANTE A OBESIDADE", Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e oito de Fevereiro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



---

Profa. Dra. Alessandra Gambero  
Universidade São Francisco



---

Profa. Dra. Juliana Alves Macedo  
Universidade Estadual de Campinas



---

Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero  
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 Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300  
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

“A minha família, que sempre está ao meu lado apoiando e incentivando na construção do meu projeto de vida”

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda de inúmeras pessoas e instituições. A todos manifesto minha eterna gratidão. E de modo particular:

Agradeço primeiramente a Deus, pela paciência, fé e perseverança, presentes que carrego comigo sempre.

A minha professora Alessandra Gambero por tudo, pela orientação, amizade, conselhos, apoio e confiança, em especial, pelo meu esforço e trabalho. Muitíssimo obrigada.

A todos meus amigos de bancada, meus eternos agradecimentos, e em especial a Carol, Simone, Naty, Thay, Aline, Lara e Demétrius, pois com vocês não só aprendi conhecimentos técnicos, mas também o verdadeiro sentido de uma amizade sincera e divertida.

A todos os membros da minha família, meus pais, minha irmã, tia e ao Ney, agradeço todos os dias a Deus por fazer parte desse laço de amor tão especial em minha vida. Vocês me dão mais do que apoio, me fazem acreditar nos meus sonhos e perseverar na construção do mesmo todos os dias.

Ao departamento da UNIFAG-USF, pela utilização do laboratório.

Aos professores do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da USF, muito grata pelos bons momentos vivenciados durante o curso e pelas produtivas discussões em sala de aula.

À FAPESP, por todo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta com a elaboração desse trabalho, eternos agradecimentos.

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro  
passo para a vitória é o desejo de vencer”*

*Mahatma Gandhi*

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

3T3-L1 – Linhagem celular de pré-adipócitos murino

AEA – N-araquidonoil etanolamina

AGPICL - ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CB – Receptores canabinóides

CB1 – Receptor canabinóide 1

CB2 – Receptor canabinóide 2

CCL2 - Ligante de quimiocina 2

CCL5 - Ligante de quimiocina 5

cDNA – *complementary DNA*

células NK – Células Natural Killer

CLL3 - Ligante de quimiocina 3

CN – Controle negativo (grupo controle)

CO<sub>2</sub> - Gás Carbônico

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CP 55940 – Agonista de receptor canabinóide não seletivo

DAG Lipase – sn-1-diacilglicerol lipase seletiva

DH – Dieta Hiperlipídica

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EPM – Erro padrão da média

FAAH – Fatty acid amide hydrolase

fMPL-N - Formil-metil-leucil-fenilalanina

GAPDH - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gene)

HCl – Ácido Clorídrico

HL-60 – Linhagem celular de leucemia promielócítica

IBMX - 3-isobutyl-1-methylxanthine

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13  
IL-1ra – antagonista de receptor de IL-1  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$   
IL-4 – Interleucina 4  
IL-6 – Interleucina 6  
IL-8 – Interleucina 8  
INF- $\gamma$  – *Interferon gama*  
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida  
ITT – Teste de tolerância a insulina  
Kitt – Constante de Inclinação da Curva obtida com o teste de tolerância à insulina  
JWH 015 – Agonista de receptor canabinóide CB2  
JWH 133 – Agonista seletivo de receptor CB2  
LPS – lipopolissacarídeo  
M1 – Fenótipo de macrófagos 1 alternativamente ativados  
M2 – Fenótipos de macrófagos 2 alternativamente ativados  
MAG lipase – Monoacil glicerol  
MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1  
NAPE-PLD – N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva  
PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
PPAR- $\gamma$  - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*  
q-PCR – *Polymerase Chain Reaction quantitative*  
RAW 264.7 – Linhagem celular de macrófagos murino  
RPM – Rotações por minuto  
SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*  
SR 141617 – *Rimonabant* (antagonista de receptor CB1)  
SR 144528 – Agonista inverso seletivo de receptor CB2  
SVC – Células estromais vasculares  
THC –  $\Delta$ -9 tetrahydrocannabinol  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
VEGF – fator de crescimento angiogênico  
WIN 55212-2 – Agonista sintético de receptor canabinóide

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição de macronutrientes das dietas.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para análise das expressões gênicas do sistema endocanabinóide.

**Tabela 3.** Expressão gênica do sistema endocanabinóide no tecido adiposo de animais controle e DH.

**Tabela 4.** Expressão gênica do sistema endocanabinóide nos macrófagos isolados do tecido adiposo de animais controle e DH.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Formação e inativação dos endocanabinóides anandamida e o 2-araquidonoiglicerol.

**Figura 2.** Peso corporal de animais controles e mantidos em dieta hiperlipídica no período de 12 e 24 semanas.

**Figura 3.** Avaliação do estoque de tecido adiposo epididimal de animais controles e mantidos em dieta hiperlipídica no período de 12 e 24 semanas.

**Figura 4.** Níveis glicêmicos dos animais controle e DH de 12 e 24 semanas.

**Figura 5.** Teste de tolerância a insulina dos animais controle e DH de 12 e 24 semanas.

**Figura 6.** Níveis de citotoxicidade dos agonista em RAW 264.7.

**Figura 7.** Migração de RAW 264.7 *in vitro* espontânea e estimula por MCP-1 (WIN 55212-2).

**Figura 8.** Migração de RAW 264.7 *in vitro* espontânea e estimula por MCP-1 (JWH 015).

**Figura 9.** Migração de RAW 264.7 *in vitro* estimulada por WIN 55212-2 e JWH 015.

**Figura 10.** Níveis de TNF- $\alpha$  liberado *in vitro* na co-cultura de RAW 264.7 e 3T3-L1.

**Figura 11.** Níveis de IL-10 liberado *in vitro* na co-cultura de RAW 264.7 e 3T3-L1.

**Figura 12.** Níveis de adiponectina liberado *in vitro* na co-cultura de RAW 264.7 e 3T3-L1.

**Figura 13.** Determinação da adipogênese *in vitro* pelo ensaio de OilRed-O em cultura de adipócitos maduros na presença ou ausência dos agonistas WIN 55212-2 e JWH 015.

**Figura 14.** Lipólise basal em cultura celular de 3T3-L1 maduros na presença ou ausência dos agonistas WIN 55212-2 e JWH 015.

**Figura 15.** Lipólise basal em cultura células de adipócitos isolados de camundongos na presença ou ausência dos agonistas WIN 55212-2 e JWH 015.

## RESUMO

O sistema endocanabinóide é composto pelos receptores CB1 e CB2 e, pelas enzimas de síntese e degradação dos mediadores endógenos anandamida e 2-araquidonoilglicerol. Esse sistema parece estar super ativado em animais e humanos obesos e é responsável por controlar processos metabólicos, como o controle central da ingestão de alimentos e o funcionamento do tecido adiposo (TA). Esse sistema também modifica respostas inflamatórias através da ativação de receptores CB2 em células do sistema imune. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar se a expressão do sistema endocanabinóide é alterada no TA e em macrófagos isolados do TA durante a obesidade e, analisar a ação de agonistas de receptores canabinóides em modelos *in vitro* que simulam a inflamação no TA associada à obesidade.

Para isso, camundongos Swiss foram mantidos em dieta hiperlipídica (DH) ou dieta padrão (C) durante 12 ou 24 semanas. Foi avaliado o peso corporal e parâmetros metabólicos (glicose basal e resistência periférica a insulina). A expressão gênica de CB1, CB2, NAPE, FAAH e DAGL foi avaliada no TA epididimal e em macrófagos isolados. As linhagens de adipócitos 3T3-L1 e macrófagos Raw 264.7 foram utilizadas em ensaios de co-cultura na presença ou ausência do agonista de CB1 WIN55212-2 e de CB2 JWH-015. A produção de TNF- $\alpha$ , IL-10 e adiponectina no sobrenadante das co-culturas estimuladas ou não por lipopolissacarídeo (LPS) foi avaliada por ELISA. Ensaios de migração celular utilizando Raw 264.7 foram realizados em Câmara de Boyden modificada frente ao estímulo MCP-1. Intervenções no processo de adipogênese foram realizados com 3T3-L1 e avaliados pelo ensaio de Oil-red. Lipólise basal foi avaliada em culturas de 3T3-L1 bem como de adipócitos isolados de camundongos magros ou obesos.

Camundongos mantidos em DH apresentam aumento no peso corporal, resistência a insulina e níveis glicêmicos elevados associado a uma maior expressão gênica do receptor CB2 no TA. No entanto, a expressão gênica nos macrófagos isolados do TA não diferiu entre os grupos. O nível basal de TNF- $\alpha$  no sobrenadante das co-culturas foi aumentado na presença de WIN55212-2 e de JWH015, mas reduzido quando as co-culturas foram estimuladas com LPS. O WIN55212-2 foi capaz de reduzir os níveis basais de adiponectina. O pré-tratamento com WIN55212-2 e JWH015 aumenta a migração espontânea *in vitro* de macrófagos, bem como os mesmos agonistas são capazes de induzir a migração celular. Não foi observado efeito dos agonistas sobre a atividade lipolítica em 3T3-L1 ou em adipócitos de camundongos. A adipogênese parece ser inibida somente pelo agonista CB2.

Nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de CB2, observado no TA de camundongos obesos está relacionado ao aumento do infiltrado de macrófagos e não decorrente de uma expressão aumentada deste receptor nestas células. A estimulação de receptores canabinóides resulta em efeitos pró-inflamatórios nos modelos *in vitro* que mimetizam a interação entre adipócitos e macrófagos. Adicionalmente, os agonistas apresentam a capacidade de induzir a migração de macrófagos *in vitro*, o que poderia contribuir para piorar do quadro de inflamação TA.

**Palavras-chave:** SISTEMA ENDOCANABINÓIDE, OBESIDADE, RECEPTOR CB1, RECEPTOR CB2, MACRÓFAGOS, ADIPÓCITOS.

## ABSTRACT

Endocannabinoid system comprises CB1 and CB2 receptors and, synthesis or metabolism enzymes for anandamide and 2-arachidonoylglycerol endogenous mediators. Obese animals and humans seem to over activate this system that control metabolic process such as central food intake control and adipose tissue (AT) functions. The endocannabinoid system also modulates inflammatory responses through CB2 activation in immune cells. Thus, the aim of this work was investigate if endocannabinoid system expression is altered in AT and in macrophages isolated from AT during obesity and, analyzed cannabinoids agonists action in in vitro inflammation models associated to obesity.

Swiss mice were feed with high-fat diet (HFD) or standard diet (N) during 12 or 24 weeks. Body weight and metabolic parameters (basal glucose and peripheral insulin resistance) were evaluated. Gene expression of *CB1*, *CB2*, *NAPE*, *FAAH* and *DAGL* was analyzed in epididymal AT or isolated macrophages. 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages were co-cultured in presence or absence of CB1 agonist WIN 55212-2 or CB2 agonist JWH-015. TNF- $\alpha$ , IL-10 and adiponectin were measured by ELISA in co-cultures stimulated or not by lipopolysaccharide (LPS). Cell migration assay were performed in modified Boyden Chamber with RAW 264.7 using MCP-1 as stimulus. Adipogenesis studies were performed with 3T3-L1 and assessed with Oil-red assay. Basal lipolysis was evaluated using 3T3-L1 as well as isolated adipocyte from lean and obese mice.

HFD mice present high body weight, insulin resistance and elevated blood glucose levels associated to an increased CB2 receptor gene expression in AT. However, gene expression in isolated macrophages was not different between experimental groups. The basal level of TNF- $\alpha$  was increases due WIN55212-2 and JWH 015 presence in co-cultures and reduced when co-cultures were stimulated with LPS. WIN55212-2 was able to reduce the basal adiponectin level in co-cultures. In the presence of WIN55212-2 and JWH015 at the levels of macrophage spontaneous migration was increased, as well as the agonists induced macrophage migration *in vitro*. There were no effects of agonists in 3T3-L1 or adipocyte basal lipolysis. Adipogenesis was only inhibited by CB2 agonist.

Our results suggest that the CB2 gene expression increase in AT is due macrophage infiltration. The cannabinoid receptor stimulation seems to result in an pro-inflammatory activity in *in vitro* model of macrophage and adipocyte interaction. Additionally, cannabinoid agonist were able to induce macrophage migration which could contribute to worsening the AT inflammation during obesity.

**Keywords:** ENDOCANNABINOID SYSTEM, OBESITY, CB1 RECEPTOR, CB2 RECEPTOR, MACROPHAGES, ADIPOCYTES.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Sistema Endocanabinóide.....	01
1.2 Obesidade e Inflamação.....	03
1.3 Macrófagos na obesidade.....	06
1.4 O sistema endocanabinóide na obesidade e inflamação.....	07
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Modelo de obesidade.....	12
3.2 Avaliação Metabólica: Glicemia Basal e Teste de Tolerância a Insulina (ITT).....	12
3.3 Avaliação da obesidade: Determinação do peso corpóreo e dos estoques de tecido adiposo.....	13
3.4 Obtenção de macrófagos do tecido adiposo.....	14
3.5 Avaliação da expressão gênica por q-PCR.....	14
3.6 Culturas celulares.....	15
3.7 Avaliação da citotoxicidade dos agonistas CB1 e CB2.....	16
3.8 Ensaio de migração celular.....	16
3.9 Ensaios de co-cultura e tratamento com os agonistas de CB1 e CB2.....	17
3.10 Determinação da produção de citocinas na ensaio de co-cultura.....	17
3.11 Ensaios de diferenciação e lipólise basal em 3T3-L1 e adipócitos isolados de camundongos.....	17

3.12 Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1 Determinação de peso corporal.....	19
4.2 Avaliação do estoque de tecido adiposo epididimal.....	21
4.3 Avaliação dos níveis glicêmicos.....	22
4.4 Teste de Tolerância a Insulina.....	23
4.5 Avaliação da expressão do sistema endocanabinóide no tecido adiposo e em macrófagos.....	24
4.6 Avaliação da citotoxicidade dos agonistas CB1 e CB2.....	27
4.7 Ensaios de migração celular.....	29
4.8 Determinação da produção de citocinas <i>in vitro</i> .....	33
4.9 Determinação da diferenciação e lipólise basal em adipócitos isolados.....	37
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8. ANEXO.....	61

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema endocanabinóide

Cultivada a mais de cinco mil anos, a *Cannabis sativa* era utilizada como medicina alternativa pelas antigas civilizações orientais no tratamento de algumas dores e doenças como cólicas, reumatismo e outras doenças inflamatórias (Tibiriça, 2010; Zuardi, 2006). Embora conhecida a milhares de anos, a caracterização química do principal princípio ativo da *Cannabis*, o  $\Delta$ -9 tetrahydrocannabinol (THC), foi descrito somente na década de 1960 (Francischetti e Abreu, 2006; Di Marzo, 2006).

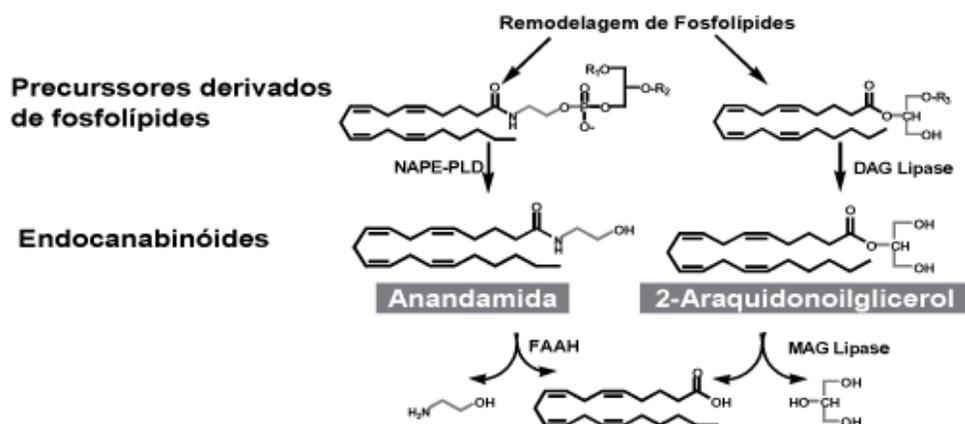
O sistema endocanabinóide começou a ser caracterizado com a descoberta dos receptores canabinóides (CB) tipo 1 e 2, receptores esses que estão acoplados a proteína G e, pertencem a uma grande e diversificada família de proteínas acopladas a membrana. A sua ativação modula a adenil-ciclase, canais de cálcio e potássio e fatores de transcrição (Pan *et al.* 2010; Francischetti e Abreu, 2006). Além dos receptores CB1 e CB2, o sistema endocanabinóide é composto por receptores adicionais ainda não identificados, ligantes endógenos e por enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação (Pacher, 2009; Di Marzo, 2006).

O receptor CB1 é basicamente expresso no sistema nervoso central e em órgãos periféricos como fígado, músculo, pâncreas, tecido adiposo, coração, pulmão, próstata, útero, ovário, testículo, timo e medula óssea (Guindon e Hohmann 2009, Motaghedi e McGraw, 2008). Há evidências de que a inibição prolongada do receptor CB1 por antagonistas seletivos, como o composto *rimonabant* (SR141716), poderia atuar centralmente no apetite e no metabolismo energético periférico, promovendo perda de peso e melhora na sensibilidade à insulina (Bensaid *et al.*, 2003).

Já o receptor CB2, está abundantemente expresso em células do sistema imunológico e hematopoiético, células da microglia e em baixos níveis nos neurônios do tronco encefálico (Cabral *et al.*, 2008). O CB2 apresenta uma atividade imunomoduladora muito significativa. Inúmeros relatos indicam que a ativação de CB2 resulta em analgesia, pois suprimem a resposta aguda de dor em alguns modelos de experimentação animal. Os níveis de receptores CB2 podem aumentar em

determinadas condições e patologias tornando-o ainda mais atrativo como um possível alvo terapêutico (Atwood e Ken Mackie, 2010).

A anandamida (N-araquidonoil etanolamina - AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são os dois principais endocanabinóides já descritos. Eles são compostos formados principalmente a partir da hidrólise de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL), especificamente o ácido araquidônico (Figura 1). A anandamida e o 2-AG são formados por vias dependentes de fosfolipídios, sendo sintetizados, respectivamente, pelas enzimas N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e a sn-1-diacilglicerol lipase seletiva (DAG Lipase), ambos são sintetizados sob demanda de estímulos e respostas fisiológicas ou patológicas (Liu *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2004; Bizogno *et al.*, 2002). Os endocanabinóides são, respectivamente, metabolizados e hidrolisados em compostos inativos pela FAAH (do inglês “fatty acid amide hydrolase”) e pela MAG (monoacil glicerol) lipase (Kunos *et al.*, 2008; Bizogno *et al.*, 2002). A deficiência da expressão ou atividade da enzima FAAH está correlacionada com a obesidade e sobrepeso em humanos (Sipe *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Formação e inativação dos endocanabinóides anandamida e o 2-araquidonoilglicerol. Francischetti e Abreu, 2006.

O AEA possui uma alta afinidade aos receptores CB1 centrais e apresentam ações e comportamentos muito semelhantes ao canabinóide exógeno THC. Já o 2-AG possui uma afinidade semelhante para ambos receptores canabinóides (Nagarkatti *et al.*, 2009). Ambos endocanabinóides são encontrados em regiões periféricas e, principalmente, na região do hipotálamo, responsáveis por controlar a ingestão de alimentos (Leite *et al.*, 2009).

O sistema endocanabinóide é um sistema de sinalização endógena envolvido em várias funções fisiológicas, entre as quais, é um importante regulador da homeostase energética e funções endócrinas, que vão da regulação do apetite por mecanismos centrais ao controle do metabolismo de gordura periférica (Cunha *et al.*, 2011; Pagotto *et al.* 2006; Hyiaman *et al.* 2006). Além disso, o sistema endocanabinóide está envolvido com o controle de emoções, percepção de dor, sono, controle de movimentos e memória (Siegmund *et al.*, 2007; Di Marzo *et al.*, 1998).

Dados sugerem que a hiperativação do sistema endocanabinóide não só vai resultar no aumento de peso corporal, como também pode induzir fenótipos de dislipidemia e disglucemia, característicos da obesidade (Motaghedi e McGraw, 2008; Francischetti e Abreu, 2006). Essa hiperativação já foi relatada no hipotálamo e nos tecidos periféricos, incluindo o fígado, pâncreas e tecido adiposo de animais alimentados com dieta rica em gordura e, no sangue e gordura visceral de pacientes obesos (Starowicz *et al.*, 2008).

## **1.2 Obesidade e Inflamação**

A obesidade é um fenômeno mundial que representa um dos principais desafios a saúde e bem-estar da sociedade e dados revelam que o número de pessoas obesas ou com sobrepeso está aumentando em proporções epidêmicas em todo mundo. A predisposição à obesidade é um processo influenciado por fatores genéticos e ambientais, em especial, a mudança de estilos de vida e hábitos alimentares (Samaan, 2011; Pan *et al.*, 2010; Gary-Bobo *et al.*, 2006; Sipe *et al.*, 2005).

Por muito tempo a obesidade foi caracterizada somente pelo depósito de gordura inerte. Atualmente é cada vez mais aceito que a obesidade contribui para o estabelecimento de um quadro inflamatório sistêmico, que gera desordem metabólica, desequilíbrio da homeostase energética, expansão adicional do tecido adiposo e desequilíbrio na produção e secreção de hormônios e de citocinas com ações pró- e antiinflamatórias. Esse desequilíbrio vai contribuir para o estabelecimento de alterações metabólicas e cardiovasculares, das doenças do fígado gorduroso e para a progressão do diabetes do tipo 2 (Rocha e Folco, 2011; Robbins, 1999).

O tecido adiposo humano é dividido em tecido adiposo marrom, envolvido na atividade termogênica, e tecido adiposo branco considerado atualmente como um órgão endócrino. O tecido adiposo branco é composto por um grande número de células adiposas (adipócitos) e células do estroma (fibroblastos, pré-adipócitos, macrófagos, outros leucócitos e componentes vasculares). Durante a obesidade há um aumento do número de adipócitos (hiperplasia) ou do próprio volume da célula (hipertrofia) e na maioria das vezes ocorre uma modificação no perfil de células estromais (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011).

Considerado um órgão endócrino, o tecido adiposo tem capacidade de produzir e secretar substâncias que vão participar de inúmeros processos, dentre estes, o processo inflamatório. Estudos mostram que durante a obesidade ocorre a produção desregulada dessas substâncias, tais como citocinas, adipocinas, quimiocinas, hormônios e outros mediadores inflamatórios que vão contribuir ainda mais para a fisiopatologia das doenças associadas à obesidade (Aprahamian e Sam, 2011; Zeyda e Stulnig, 2007).

O processo inflamatório que se estabelece em decorrência da obesidade é caracterizado principalmente pelo aumento dos níveis circulantes e teciduais de substâncias pró-inflamatórias, redução da produção de substâncias antiinflamatórias e aumento do infiltrado de células inflamatórias, principalmente de macrófagos no tecido adiposo (Samaan, 2011; Gregor e Hotamisligil, 2011).

As adipocinas, citocinas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo, possuem a capacidade de modificar processos inflamatórios e metabólicos na obesidade. O tecido adiposo de indivíduos obesos produz mais proteínas pró-inflamatórias tais como leptina,

fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 IL-8 e níveis reduzidos das antiinflamatórias, como a adiponectina e IL-10 quando comparados a indivíduos magros, o que torna a capacidade de controlar o processo inflamatório limitada (Arahamian e Sam, 2011; Weisberg *et al.*, 2003).

Receptores da leptina foram identificados em vários tecidos do organismo e o principal local de expressão da leptina é o tecido adiposo. A leptina é considerada um hormônio pleiotrópico envolvido com várias funções incluindo o controle de crescimento, reprodução, controle metabólico e regulação do sistema imune. No entanto, seu principal papel está na regulação de peso. A leptina é um regulador chefe do eixo “intestino-cérebro”, que fornece sinais de saciedade através de sua ação sobre receptores hipotalâmicos. Os níveis da leptina estão elevados em obesos, e com a redução de peso também há uma queda desses níveis (Singla *et al.*, 2010).

A adiponectina é exclusivamente expressa por adipócitos maduros, suas funções metabólicas no organismo estão relacionadas com a regulação da glicemia, ação da insulina sobre o fígado e com o catabolismo de ácidos graxos. Durante um quadro de obesidade, a adiponectina se encontra em níveis diminuídos (Arahamian e Sam, 2011; Singla *et al.*, 2010). A adiponectina inibe a expressão e secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6, assim como ambos inibem a expressão da adiponectina. Portanto, dados sugerem que altos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser parcialmente responsáveis pela diminuição da produção de adiponectina na obesidade (Arahamian e Sam, 2011; Fasshauer *et al.*, 2002).

O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas mais importantes implicadas no estabelecimento da resistência à insulina. Pesquisas já demonstraram que a expressão de TNF- $\alpha$  no tecido de roedores obesos é aumentada e, após a neutralização desta, há uma melhora do quadro inflamatório e da resistência a insulina no animal (Rocha e Folco, 2011).

Estas adipocinas, transcritas tanto pelos adipócitos como pelos macrófagos, 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). A desregulação das adipocinas com conseqüentes disfunções metabólicas e comportamentais podem ser a principal causa

de obesidade e doenças associadas, incluindo diabetes, dislipidemia, doenças cardiovasculares e inflamação (Gary-Bobo *et al.*, 2006).

Durante a obesidade, a hipóxia é um fator importante para expansão do tecido adiposo. Em resposta a hipóxia o tecido adiposo produz citocinas e fatores, como leptina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e TNF- $\alpha$  que em conjunto vão regular a angiogênese e a vasculogênese. Além disso, o recrutamento de células inflamatórias vai contribuir significativamente para a neovascularização do tecido adiposo, pois os macrófagos ativados são células produtoras de fatores angiogênicos, como o VEGF (Cao, 2007).

### **1.3 Macrófagos na obesidade**

Os macrófagos são células mononucleares que residem em diferentes tecidos, possuem como principais funções fagocitar microorganismos patogênicos e/ou substâncias que desencadeiam respostas inflamatórias, produzir e secretar moléculas que atraem outras células imunes para a área de infecção e atuam como células produtoras de mediadores que participam da resposta imunológica inata (Samaan, 2011; Janeway *et al.*, 2002).

A obesidade em alguns casos está relacionada ao acúmulo de macrófagos no tecido adiposo e, conseqüentemente, os produtos liberados por esses macrófagos infiltrados participam da inflamação desse tecido. A proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) e seus receptores tem papel chave no desenvolvimento de respostas inflamatórias e no recrutamento de monócitos da circulação sanguínea para se tornar macrófagos teciduais (Rull *et al.*, 2010; Bastarrachea *et al.*, 2007). Macrófagos do tecido adiposo podem ser derivados de monócitos que migraram para o tecido ou de pré-adipócitos (Dupasquier *et al.*, 2006). Os macrófagos podem apresentar variações fenotípicas em resposta a diferentes fatores produzidos no microambiente em que se insere (Rocha e Folco, 2011; Zeyda e Stulnig, 2007).

Diferentes estímulos ativam os macrófagos para expressarem padrões distintos de quimiocinas, marcadores de superfície e enzimas metabólicas. A ativação dos

macrófagos resulta em fenótipos clássicos de M1 e M2 definidos *in vitro*. Macrófagos M1 são basicamente induzidos pelo lipopolissacarídeo (LPS) e mediadores pró-inflamatórios, como INF- $\gamma$ , e reforçam a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e de iNOS. Já os M2 são macrófagos gerado pela exposição à IL-4 e IL-13, produzem citocinas pró-inflamatórias em menor quantidade e têm a capacidade de produzir algumas citocinas antiinflamatórias, tais como IL-10 e o antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra) (Zhang *et al.*, 2011; Lumeng *et al.*, 2007).

Macrófagos do tecido adiposo parecem mesclar as características de M1 e M2, sendo capazes de produzir citocinas como os clássicos M1, tais como TNF- $\alpha$  e iNOS, mas expressam vários marcadores de superfície comuns ao macrófagos M2 (Rocha e Folco, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Zeyda e Stulnig, 2007; Lumeng *et al.*, 2007). Além de macrófagos, no tecido adiposo também são encontrados outras células do sistema imunológico que vão desempenhar importantes funções durante a obesidade, entre essas células estão neutrófilos, linfócitos, mastócitos e células NK (*Natural Killer*) (Caspar-Bauguil *et al.*, 2009; Berg e Scherer, 2005).

#### **1.4 O sistema endocanabinóide na obesidade e inflamação**

Como já citado anteriormente, o sistema endocanabinóide é apontado como um sistema que exerce controle sobre a homeostase energética, função endócrina e imunológica (Pagotto *et al.*, 2006). Sua hiperativação está relacionada com o aumento do peso corpóreo e alteração metabólicas.

Estudos com animais e humanos, demonstraram que os endocanabinóides AEA e 2-AG desempenham um papel muito importante no controle de ingestão de alimentos e de peso corporal. A ação de ambos endocanabinóides ocorre através de mecanismos centrais e periféricos, onde centralmente eles parecem desempenhar uma interação nas vias do sistema mesolímbico e no hipotálamo, ativado “sob demanda” após um curto período de privação de comida. (Spoto *et al.*, 2006; Francischetti e Abreu, 2006). No hipotálamo, as mudanças dos níveis de endocanabinóides correlacionam-se inversamente com as concentrações plasmáticas da leptina. Camundongos obesos com deficiência na via de sinalização da leptina exibem elevadas concentrações de

endocanabinóides, reafirmando a hipótese de que a leptina diminui os níveis do endocanabinóides nas vias centrais (Di Marzo *et al.*, 2001). A expressão dos receptores CB1 e CB2, bem como os níveis dos ligantes endocanabinóides encontram-se aumentados durante a obesidade (Deveaux *et al.*, 2009).

Apesar de atuarem “sob demanda”, o sistema endocanabinóide apresenta uma hiperatividade durante a obesidade, a hipótese de que isso ocorre, também, pode estar associada a dietas de alto conteúdo calórico e o próprio estoque de gordura que disponibiliza ácidos graxos poliinsaturados para a biosíntese dos endocanabinóides (Bizogno *et al.*, 2002). Autores relatam que pacientes com obesidade ou diabetes do tipo 2 e doenças relacionadas, apresentam elevadas concentrações de endocanabinóides em gordura visceral e soro, confirmando que o sistema endocanabinóide é desregulado na obesidade e em múltiplos fatores de risco cardiovascular (Matias *et al.*, 2006; Engeli *et al.*, 2005).

Deveaux e colaboradores (2009) demonstram em seus estudos que durante a progressão da obesidade, a expressão gênica do receptor CB2 (Cnr2) sofre um forte aumento em paralelo com o desenvolvimento da inflamação no tecido adiposo. A ativação do receptor CB2 vai aprimorar a inflamação no tecido adiposo, contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina e no estabelecimento da esteatose hepática na fase inicial da obesidade.

Assim como o receptor CB2, a superexpressão de CB1 também está relacionada com a progressão do peso corpóreo, resistência a insulina e esteatose hepática, embora sua principal atuação esteja na indução da ingestão de alimentos, redução periférica de gastos de energia e aumento da lipogênese hepática via receptores CB1 expressos pelos hepatócitos (Deveaux *et al.*, 2009; Di marzo, 2008; Gary-Bobo *et al.*, 2007).

A ativação do receptor CB1 pelo endocanabinóide endógeno 2-AG promove o agravamento à sensibilidade a insulina, enquanto que o antagonismo de CB1 com *rimonabant* reduz a resistência à insulina (Motaghedi e McGraw, 2008).

O *rimonabant* demonstrou ter potentes efeitos anti-obesidade e controlar a progressão das patologias associadas à obesidade. Estudos mostram que o *rimonabant* atua sobre a inibição da proliferação celular e sobre marcadores de diferenciação de

pré-adipócitos de ratos (Spoto *et al.*, 2006). Outros relatos ainda acrescentam que o *rimonabant* reduz a ingestão alimentar, peso corpóreo, massa gorda e hiperinsulinemia e, melhora a sensibilidade a insulina em humanos e roedores obesos (Gary-Bobo *et al.*, 2007). Benefícios do bloqueio do receptor CB1 sobre fatores de riscos cardiovasculares parecem estar relacionados ao aumento da secreção de adiponectina pelos adipócitos (Jbilo *et al.*, 2005).

O sistema endocanabinóide tem um importante papel na modulação das funções imunológicas, assim, acredita-se que ele tenha um grande potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias (Montecucco *et al.*, 2008). Inúmeras publicações têm mostrado os efeitos imunossupressivos e antiinflamatórios dos canabinóides exógenos, mas o papel dos endocanabinóides enquanto modulador de respostas imunológicas ainda é controverso (Booz *et al.*, 2011; Greineisen & Turner, 2010; Nagarkatti *et al.*, 2009).

O bloqueio com *rimonabant* em macrófagos humanos *in vitro*, resulta em um benéfico efeito antiinflamatório, com redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Este mesmo estudo demonstra que durante a diferenciação de macrófagos há um aumento da enzima de biosíntese de endocanabinóides e uma diminuição da enzima de degradação (Sugamura *et al.*, 2009).

Kishimoto e colaboradores (2004) observaram em seus resultados que a adição de 2-AG e de canabinóide sintético, o CP55940, na cultura celular de uma linhagem leucêmica (HL-60), induz a produção de IL-8 e MCP-1. Quando adicionado o antagonista de CB2 SR144528, a produção dessas citocinas foram inibidas. A cultura celular quando estimulada com LPS, produziu um aumento de IL-8 e MCP-1, sugerindo que 2-AG pode ter um papel essencial no recrutamento de células inflamatórias por induzir a produção MCP-1, além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Outros autores investigaram o efeito da ativação do receptor canabinóide CB2 sobre a resposta quimiotática de monócitos humanos, eles observaram que os agonistas JWH 015 e JWH 133 modulam o recrutamento de monócitos humanos, quando incubado as células por um longo período (12 à 18 horas), reduzindo a migração frente à quimiocinas CCL2 e CCL3 (Montecucco *et al.*, 2008).

Vários autores sugerem que uma das funções dos endocanabinóides no sistema imunológico é regular a migração de células imune (Nilsson *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2003). Embora, ainda haja uma grande controversia quanto ao efeito dos endocanabinóides sobre a modulação da resposta migratória (Raborn e Cabral, 2010).

Sacerdote e colaboradores (2005) investigaram o efeito do canabidiol sobre a migração de macrófagos murinos *in vitro*, e demonstraram que na presença deste canabinóide há uma redução na migração de macrófagos frente ao estímulo com o N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMPL). Assim como, o THC também inibiu a migração de macrófagos frente a vários estímulos químicos como CCL2, CCL3 e CCL5 (Raborn e Cabral, 2010).

Em contrapartida, outros autores descrevem o 2-AG possui efeito quimiotático sobre células da migroglia, macrófagos e monócitos (Montecucco *et al.*, 2008; Kishimoto *et al.*, 2003, Walter *et al.*, 2003). Deste modo os estudos sugerem que os canabinóides exógenos exercem efeitos inibitórios sobre a quimiotaxia de células, enquanto que os endocanabinóides provocam efeito oposto.

Deste modo, esse trabalho teve como objetivo avançar na compreensão do papel da ativação dos receptores canabinóides como moduladores dos eventos inflamatórios resultantes da interação entre macrófagos e adipócitos, bem como das alterações do sistema endocanabinóide no tecido adiposo decorrente da obesidade.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Estudar o sistema endocanabinóide, bem como sua modulação por agentes farmacológicos em macrófagos em cultura, em co-cultura com adipócitos e isolados do tecido adiposo de animais obesos e não obesos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a expressão de receptores CB1 e CB2, bem como a expressão das enzimas envolvidas na síntese e degradação dos endocanabinóides no tecido adiposo e em macrófagos isolados do tecido adiposo de animais obesos comparando-a com animais não obesos.
- Avaliar a ação de agonistas CB1 e CB2:
  - na quimiotaxia de macrófagos induzida por MCP-1;
  - na diferenciação de adipócitos;
  - na atividade lipolítica de adipócitos;
  - nas respostas decorrentes da interação entre macrófagos e adipócitos, como a produção de citocinas e outros marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-10, Adiponectina).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Modelo de obesidade**

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. Os animais foram divididos em quatro grupos, onde dois receberam ração comercial para roedores (Labina®) contendo 20% Kcal de proteína, 70% Kcal de carboidrato e 10% Kcal de lipídeos (n=12) e, outros dois foram alimentados com uma dieta hiperlipídica (DH) contendo 20% Kcal de proteína, 20% Kcal de carboidrato e 60% Kcal de lipídeos (n=12), conforme Tabela 1. Dois grupos foram mantidos em dieta por 12 semanas e os demais, por 24 semanas.

#### **3.2 Avaliação metabólica: 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 ketamina 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, para avaliar a constante do teste de tolerância a insulina (kITT).

**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	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
Oleo 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	-
Total	1000	3948	1000	5358

### **3.3 Avaliação da obesidade: Determinação do peso corpóreo e dos estoques de tecido adiposo**

Os animais foram pesados semanalmente durante a vigência da dieta e ao final do período de 12 semanas e 24 semanas tiveram seus estoques de tecido adiposo epididimal dissecados e pesados.

### **3.4 Obtenção de macrófagos do tecido adiposo**

Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram obtidos e digeridos utilizando colagenase 0,2 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em tampão Krebs-Henseleit (pH 7,4). O tecido digerido foi filtrado em filtro com malha de 70 µm e centrifugado para obtenção da fração de células estromais vasculares (SVC). A SVC foi contada e submetida à separação imunomagnética utilizando microbeads ligados à anti-CD11b e colunas MS (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A viabilidade das células isoladas foi avaliada e estas foram estocadas em *RNAlater* para posterior análise da expressão gênica por q-PCR em tempo real.

### **3.5 Avaliação da expressão gênica por q-PCR**

A expressão de *CB1*, *CB2*, *DAG Lipase*, *NAPE Lipase* e *FAAH* em estoque de tecido adiposo visceral e nos macrófagos isolados foi realizada por PCR em tempo real (q-PCR). Amostras de tecido adiposo foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. A extração foi realizada utilizando o *RNeasy<sup>®</sup> tissue kit* (QIAGEN). Após a extração, ~50 µg de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise de expressão dos genes e do gene constitutivo GAPDH foram feitas por meio da PCR em tempo real, utilizando-se o *Platinum<sup>®</sup> qPCR Supermix UDG* (Invitrogen). As amostras foram cicladas no equipamento 7300 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em triplicata, e as amostras foram normalizadas com os valores do gene constitutivo. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** *Primers* utilizados para análise das expressões gênicas do sistema endocanabinóides.

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'→3')</b>
Cnr1	<i>CB1 mouse F</i>	acagggcagtacccttctt
Cnr1	<i>CB1 mouse R</i>	agcccctgggtggtattctct
Cnr2	<i>CB2 mouse F</i>	tcattgccatcctcttttcc
Cnr2	<i>CB2 mouse R</i>	gaaccagcatatgagcagca
Dagla	<i>DAGLA alpha F</i>	ctctggacgacaacaaggt
Dagla	<i>DAGLA alpha R</i>	gggtctgcatgctggtattt
Nape	<i>NAPE-PLD F</i>	ctctggacgacaacaaggt
Nape	<i>NAPE-PLD R</i>	gggtctgcatgctggtattt
Faah	<i>FAAH F</i>	catgtcactctctgctcca
Faah	<i>FAAH R</i>	agccagggctacacagagaa

### 3.6 Culturas celulares

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 CO<sub>2</sub>. 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 CO<sub>2</sub>. Após 48 horas de atingirem a confluência, as células foram incubadas com o meio de diferenciação (0,25 µM de dexametasona, 10 µg/ml de insulina e 0,5 mM de IBMX em meio basal). Após 48 horas, as células foram expostas ao meio de maturação (5 µg/ml de insulina em meio basal).

### **3.7 Avaliação da citotoxicidade dos agonistas de CB1 e CB2**

Para a avaliação de uma possível ação citotóxica dos agonistas utilizados foi realizado o ensaio de MTT. Foram semeadas em placas de 96 poços  $1 \times 10^6$  células/poço da linhagem de macrófago murino RAW 264.7, em seguida a placa foi mantida em condições estéreis com meio de cultivo DMEM a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Após o período de incubação as células foram expostas a diferentes concentrações (1, 3 e  $10 \mu\text{M}$ ) dos agonistas CB1 (WIN 55212-2) e CB2 (JWH 015) ambos da Cayman Chemical (Michigan, USA) por 6 e 48 horas. Após os respectivos períodos de exposição as placas foram centrifugadas à  $22^\circ\text{C}$ , a 1200 rpm por 10 minutos, em seguida foi descartado todo o sobrenadante e foi adicionado  $90 \mu\text{l}$  de PBS com mais  $10 \mu\text{l}$  da solução de MTT 5mg/ml (Sigma-Aldrich) em cada poço, as células foram incubadas por mais 3 horas. Passado esse período, foram adicionados sobre as células  $100 \mu\text{l}$  da solução de SDS 10% em 0,01M HCl para lise celular. Após a incubação por 18 horas a reação foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm.

### **3.8 Ensaio de Migração celular**

Os ensaios de migração celular foram realizados em Câmara de Boyden modificada, onde  $50 \mu\text{L}$  de suspensão celular de macrófagos RAW 264.7 ( $3 \times 10^6$  cel/ml), expostas ou não a presença de agonistas CB1 WIN 55212-2 e CB2 JWH 015 ( $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$   $10 \mu\text{M}$ ), foram adicionadas ao compartimento superior e  $26 \mu\text{L}$  do meio de cultura (migração espontânea) ou do agente quimiotático MCP-1 (25ng/ml) foram adicionados ao compartimento inferior, sendo estes separados por um filtro contendo poros de  $8\text{-}\mu\text{m}$  pré-tratado com soro de camundongo na proporção 1:100. Após 6 horas, a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , as células não-migradas foram raspadas e as células migradas fixadas e coradas com Diff-Quik (Merck Corp, Darmstadt, Germany). Foram contados 5 campos aleatórios em cada ponto de migração celular utilizando microscópio ótico. Em outro protocolo, os agonistas de CB1 e CB2 foram utilizados na parte inferior da câmara como agentes quimiotáticos.

### **3.9 Ensaios de co-cultura e tratamento com agonistas de CB1 e CB2**

As Co-culturas de adipócitos e macrófagos foram realizadas utilizando "transwell inserts" com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Ireland) para separar os dois tipos celulares. Os adipócitos foram utilizados neste ensaio após 10 dias de manutenção em meio de maturação. Após 48h de cultura, os sobrenadantes de ambos os poços foram coletados para análise. As co-culturas foram tratadas com o agonista seletivo WIN 55212-2 (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) e de CB2 JWH 015 (1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ). Avaliou-se também a atividade dos agonistas em co-culturas estimuladas com Lipopolissacarídeo (LPS) 1 ng/ml. Os sobrenadantes coletados foram estocados em  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.10 Determinação da produção de citocina no ensaio de co-cultura**

A análise da produção de TNF- $\alpha$ , IL-10 e adiponectina do sobrenadante das culturas foi realizada utilizando-se kit comercial de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) seguindo as instruções do fabricante.

### **3.11 Ensaios de diferenciação e lipólise basal em 3T3-L1 e adipócitos isolados de camundongos.**

A lipólise basal na ausência e presença dos agonistas canabinóides JWH 015 e WIN 55212-2 foi avaliada em cultura de 3T3-L1 (adipócitos maduros) e em adipócitos isolados do tecido adiposo de camundongos. Conforme descrito anteriormente, após os 10 dias de maturação das 3T3-L1 foram aplicados nos respectivos poços as diferentes concentrações: 0,3; 1; 3 e 10 $\mu\text{M}$  dos agonistas, sendo que depois de 48 horas incubadas na estufa, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , foram coletados os sobrenadantes das culturas para quantificação de glicerol utilizando kit comercial (LABORLAB, Guarulhos – SP, Brasil).

Para a análise da lipólise de adipócitos isolados de camundongos, foi coletado tecido adiposo epididimal de animais obesos e normais mantidos em dieta de 12 semanas. Os tecidos coletados foram fragmentos e digeridos utilizando colagenase 0,2 mg/ml (Sigma-Aldrich) em tampão Krebs-Henseleit (pH 7,4). O tecido digerido foi filtrado em malha de 70  $\mu\text{m}$  e centrifugado a  $22^{\circ}\text{C}$  em 1000 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação coletamos o halo superior de adipócitos e em seguida lavamos os

adipócitos com Krebs para retirada total da colagenase. Os adipócitos foram semeados em placas de 96 poços com meio de cultivo 199 (Gibco BRL, NY, USA) e em seguida foram aplicadas as diferentes concentrações dos agonistas, incubadas e realizada a coleta do sobrenadante, conforme citado acima para posterior análise de glicerol no kit comercial.

Já a adipogênese foi observada 15 dias após a indução da diferenciação dos pré-adipócitos (3T3-L1), período no qual as células também receberam os agonistas. A análise do grau de diferenciação dos adipócitos foi feita pela determinação do acúmulo de vesículas lipídicas intracelulares coradas pelo OilRed-O (Sigma-Aldrich). As células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4 % por 30 minutos e incubadas por 1 hora com solução de OilRed-O. As células coradas foram então lavadas com água, secas a 37°C e visualizadas por microscopia óptica. Em seguida o corante foi extraído com isopropanol 100 % e quantificado por espectrofotometria a 540 nm.

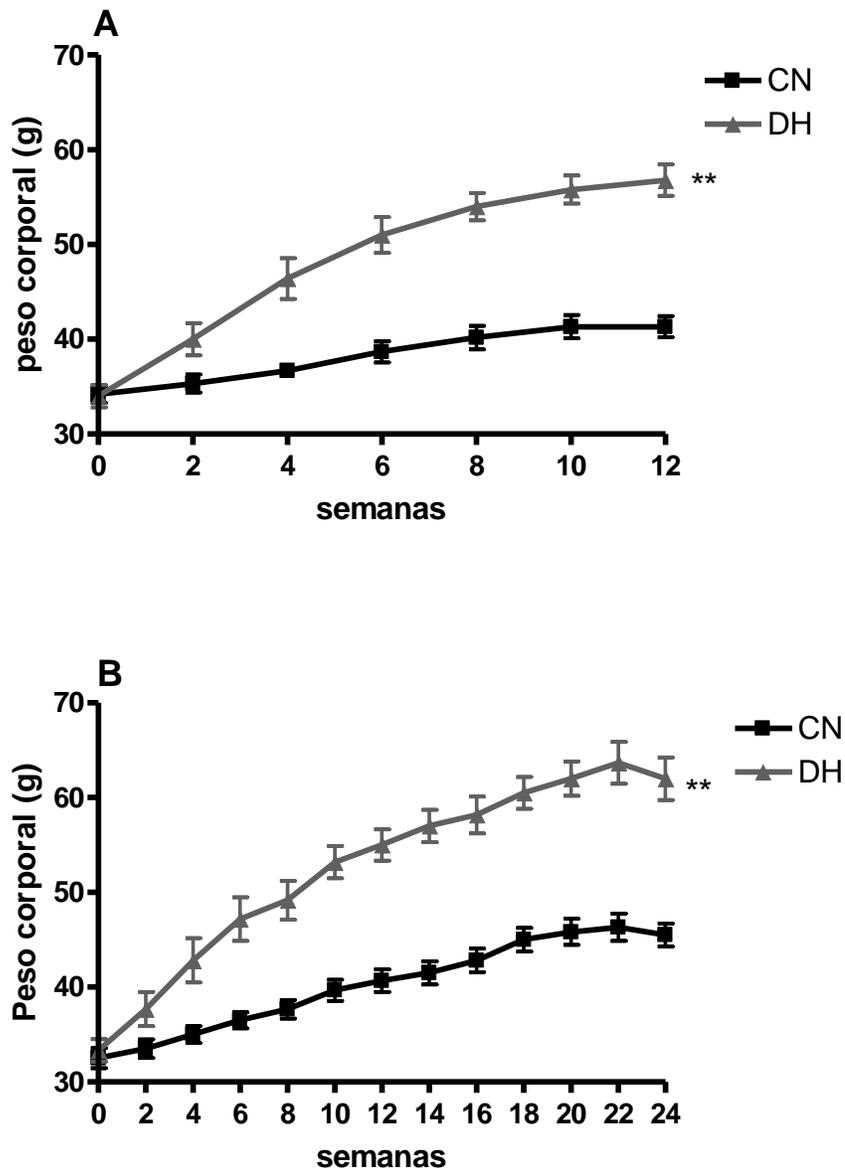
### **3.12 Análise Estatística**

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 e Teste T. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Determinação do peso corporal**

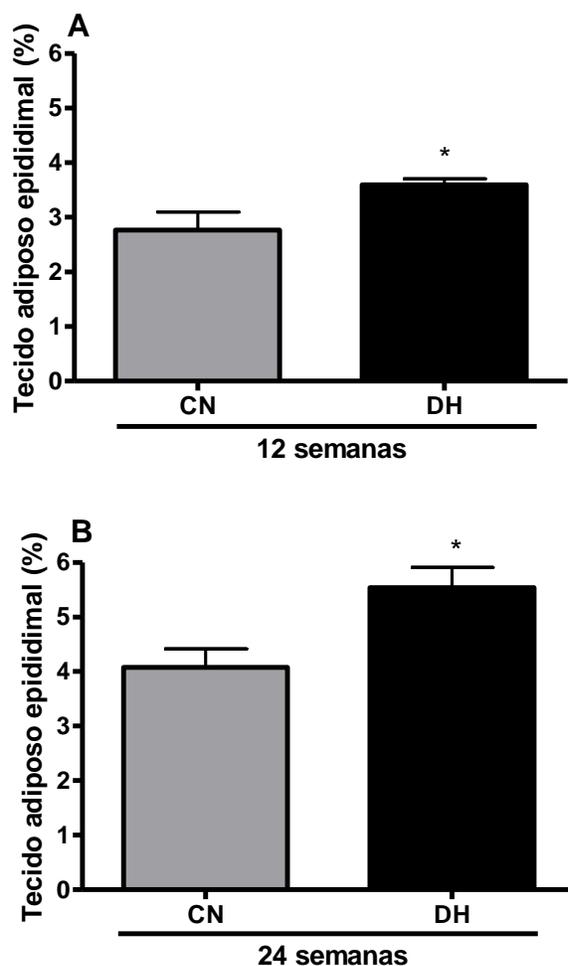
No período de 12 semanas de dieta hiperlipídica, foi observado um aumento no peso corpóreo dos animais mantidos na dieta hiperlipídica quando comparados ao peso dos animais mantidos na dieta padrão. O mesmo foi observado nos animais mantidos em dieta hiperlipídica por 24 semanas (Figura 2).



**Figura 2.** Peso corporal de animais controles (CN) e mantidos em dieta hiperlipídica (DH) no período de 12 (Painel A) e 24 (Painel B) semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 06 animais por grupo. \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle.

## 4.2 Avaliação do estoque de tecido adiposo epididimal

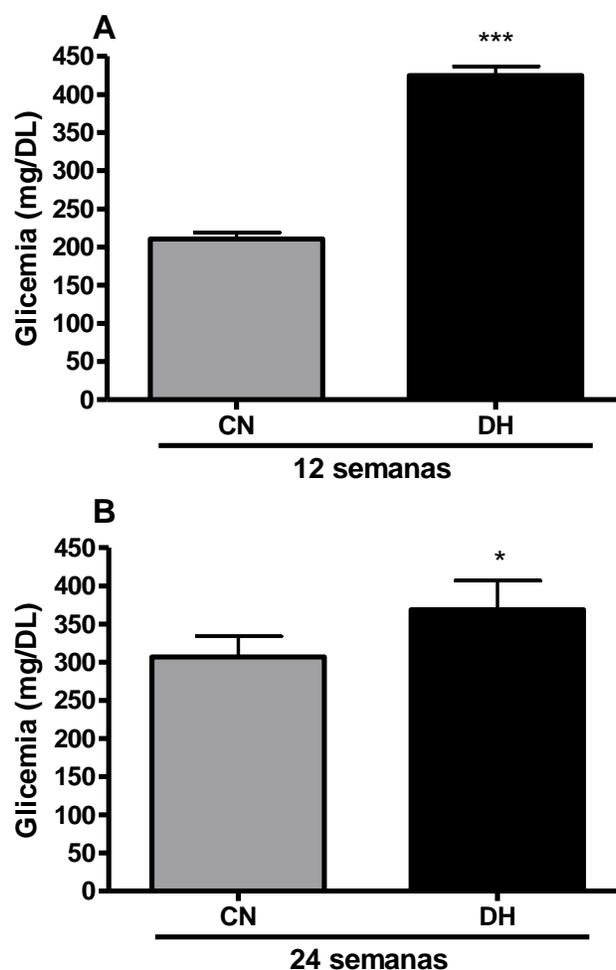
A avaliação do estoque de tecido adiposo epididimal demonstra um aumento da adiposidade nos animais mantidos na dieta hiperlipídica (DH) por 12 semanas e 24 semanas quando comparados ao grupo controle (Figura 3).



**Figura 3.** Avaliação do estoque de tecido adiposo epididimal dos animais controle e DH dos grupos de 12 (Painel A) e 24 (Painel B) semanas. Os valores estão expressos na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 06 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

### 4.3 Avaliação dos níveis Glicêmicos

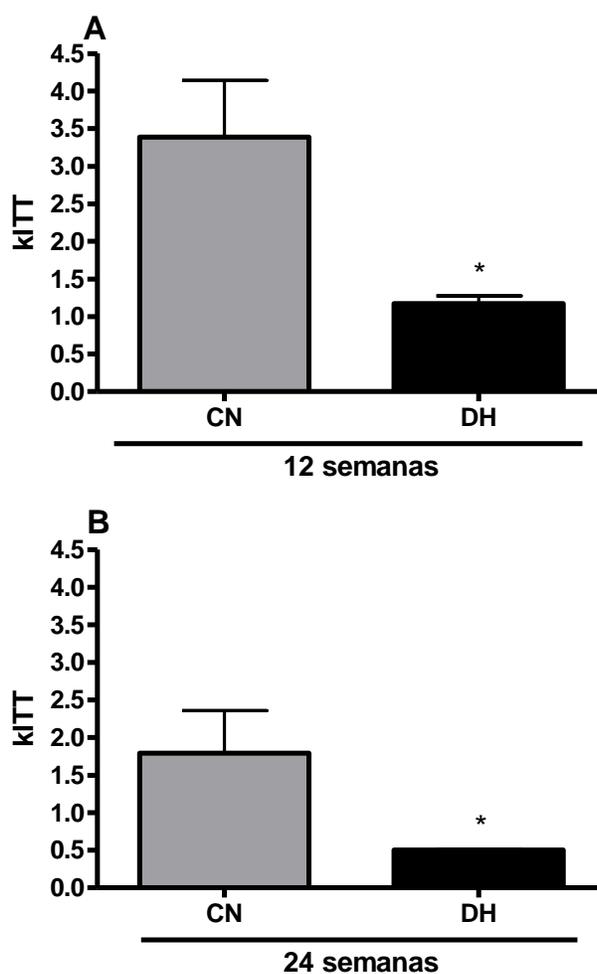
A avaliação dos níveis glicêmicos foi realizada ao final da 12<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana dos respectivos grupos de dieta hiperlipídica (DH). Comparando os níveis do grupo DH com o controle observa-se um aumento do nível de glicose de jejum nos animais obesos (Figura 4).



**Figura 4.** Níveis glicêmicos dos animais controle e DH dos grupos de 12 (Painel A) e 24 (Painel B) semanas. Os valores estão expressos na forma de média e erro padrão da média (EPM). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao controle.

#### 4.4 Teste de Tolerância a insulina

A administração de insulina nos animais controle promoveu uma queda nos níveis glicêmicos e resultou em curvas glicêmicas com grande inclinação. Quando se administrou a insulina aos animais em dieta hiperlipídica (DH) esta queda acentuada não é observada, promovendo curvas com inclinação menor (kITT) tanto no grupo de 12 quanto de 24 semanas (Figura 5).



**Figura 5.** Teste de tolerância a insulina dos animais controle e DH dos grupos de 12 (Painel A) e 24 (Painel B) semanas. Os valores estão expressos na forma de média e erro padrão da média (EPM). \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

#### **4.5 Avaliação da expressão do sistema endocanabinóide no tecido adiposo e em macrófagos**

A análise por PCR em tempo real da expressão gênica no tecido adiposo epididimal, revelou que a expressão do receptor CB2 é aumentada no grupo de animais mantidos na dieta hiperlipídica (DH) em 12 e 24 semanas, já a expressão do receptor CB1 foi aumentada somente nos animais de 24 semanas. A expressão das enzimas do sistema endocanabinóide não demonstra diferenças significativas em seus valores nos grupos de 12 semanas, embora haja uma tendência de queda da expressão da enzima NAPE em animais mantidos em dieta hiperlipídica quando se compara com o grupo de animais controle. No entanto, após 24 semanas a expressão da enzima NAPE foi reduzida em animais DH (Tabela 3).

Na análise da expressão do sistema endocanabinóide nos macrófagos isolados do tecido adiposo epididimal, observamos uma queda significativa na expressão de CB1 nos macrófagos de animais obesos de 12 semanas quando comparados ao controle. Os demais valores avaliados não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 4).

**Tabela 3:** Expressão gênica dos receptores CB1 e CB2, enzimas de síntese NAPE e DAGLA e a enzima de degradação FAAH no tecido adiposo epididimal de animais controle (CN) e mantidos em dieta hiperlipídica (DH). Os valores estão expressos na forma de média seguido do erro padrão da média (EPM). \*p<0,05 e \*\* p<0,01 quando comparado ao controle.

<b>12 semanas</b>		
<b>Gene</b>	<b>CN</b>	<b>DH</b>
<b>CB1</b>	10.16±2.32	11.03±1.56
<b>CB2</b>	3.32±0.45	14.04±3.39*
<b>NAPE</b>	21.02±3.52	13.7±4.08
<b>DAGLA</b>	0.13±0.05	0.13±0.02
<b>FAAH</b>	2.36±0.51	3.26±0.48

<b>24 semanas</b>		
<b>Gene</b>	<b>CN</b>	<b>DH</b>
<b>CB1</b>	12.80±2.53	17.50±0.90*
<b>CB2</b>	11.31±2.89	23.66±0.50*
<b>NAPE</b>	38.8±8.3	15.55±6.03**
<b>DAGLA</b>	2.47±0.9	3.83±2.15
<b>FAAH</b>	20.77±1.1	22.33±4.76

**Tabela 4:** Expressão gênica dos receptores CB1 e CB2, enzimas de síntese NAPE e DAGLA e a enzima de degradação FAAH em macrófagos isolados do tecido adiposo epididimal de animais CN e DH. Os valores estão expressos na forma de média seguido do erro padrão da média (EPM). \* $p < 0,05$  quando comparados ao controle. # valores não identificados

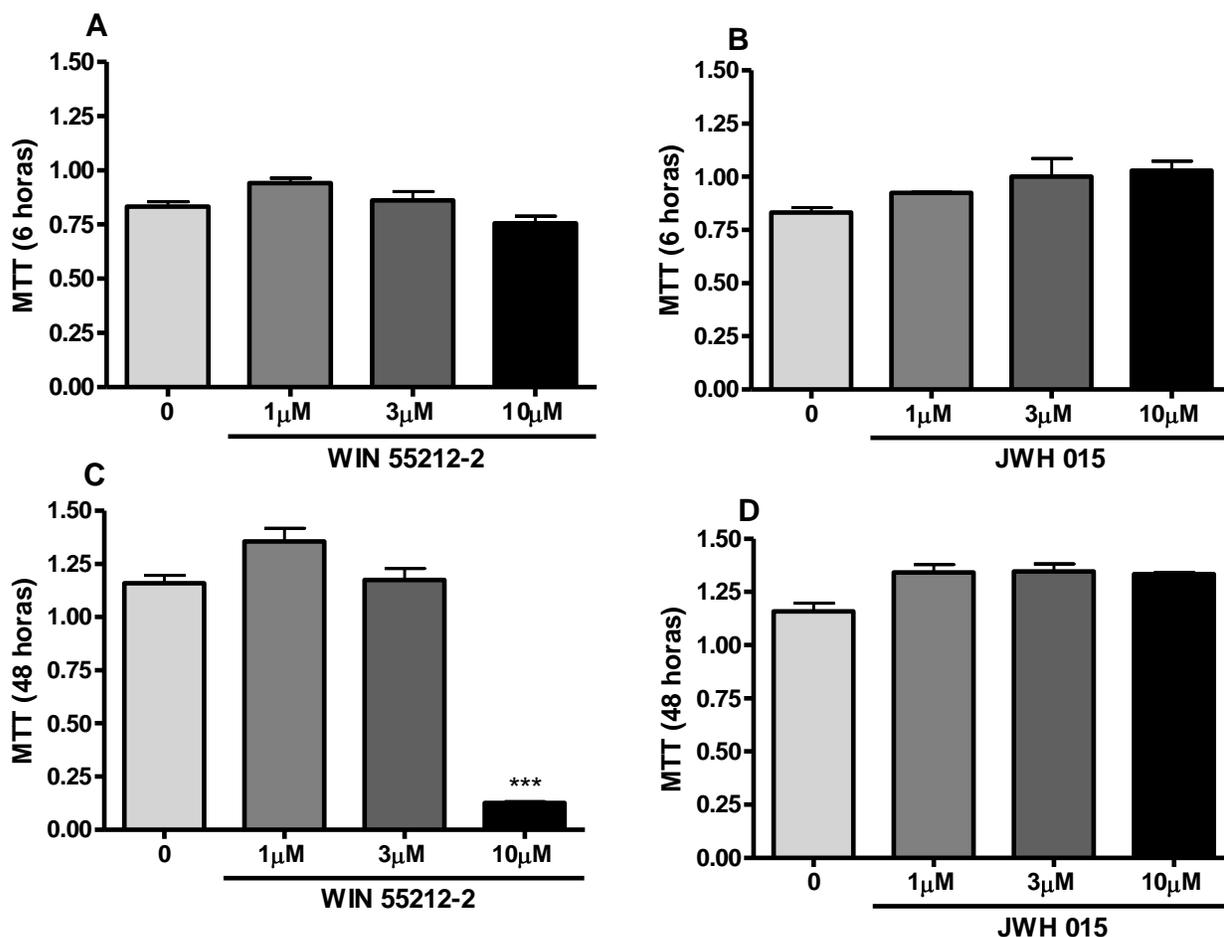
<b>12 semanas</b>		
<b>Gene</b>	<b>CN</b>	<b>DH</b>
<b>CB1</b>	0.40±0.23	0.016±0.006*
<b>CB2</b>	0.90±0,11	0.69±0.07
<b>NAPE</b>	29.87±21.12	3.91±0.45
<b>DAGLA</b>	#	0.18±0.02

<b>24 semanas</b>		
<b>Gene</b>	<b>CN</b>	<b>DH</b>
<b>CB1</b>	0.14±0.08	0.07±0.02
<b>CB2</b>	0.78±0.11	1.61±0.64
<b>NAPE</b>	5.58±1.50	2.87±0.40
<b>DAGLA</b>	0.46±0.20	0.21±0.013

#### **4.6 Avaliação da citotoxicidade dos agonistas canabinóides WIN 55212-2 e JWH 015**

No ensaio de citotoxicidade *in vitro* com as células RAW 264.7, com 6 horas de incubação na presença dos agonista, não observamos efeitos citotóxicos dos compostos (Figura 6 A e B). Porém, ao incubar as células por 48 horas na presença de 10 $\mu$ M do agonista de CB1 WIN 55212-2, observamos que esta concentração é tóxica para as células, deste modo a concentração máxima utilizada nos experimentos com tempo prolongado de incubação com este agonista foi de 3 $\mu$ M (Figura 6C).



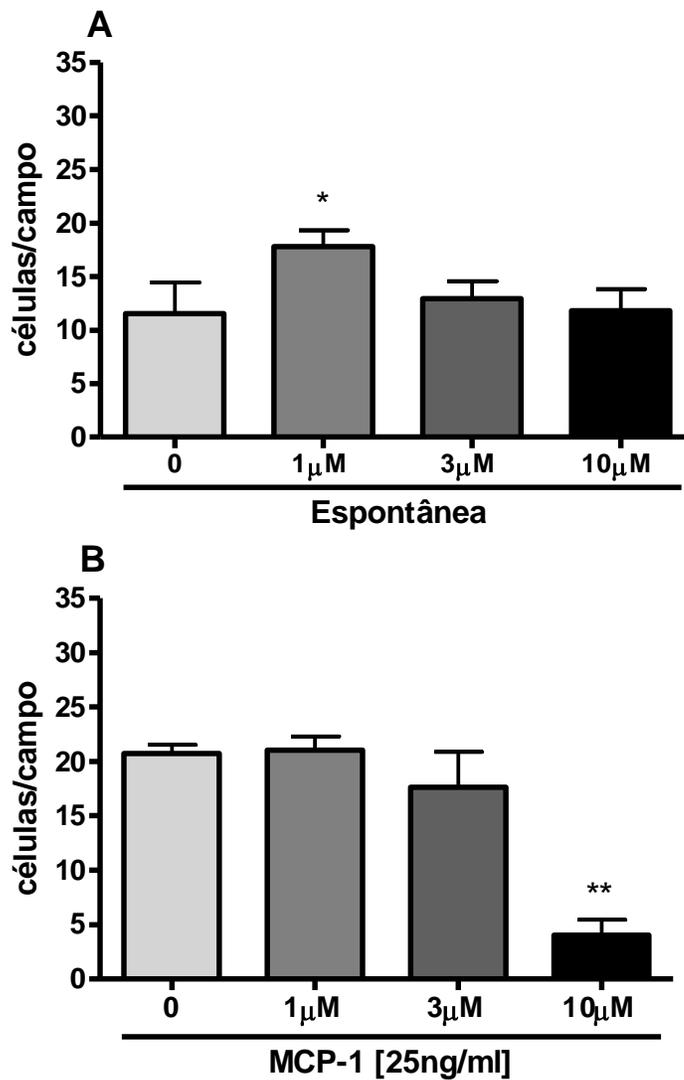
**Figura 6.** Níveis de citotoxicidade dos agonistas canabinóides em Raw 264.7; A. Células incubadas por 6 horas com o agonista seletivo WIN 55212-2; B. Células incubadas por 6 horas com o agonista de CB2 JWH015; C. Células incubadas por 48 horas com o agonista seletivo WIN 55212-2; D. Células incubadas por 48 horas com o agonista de CB2 JWH015. Os valores estão expressos na forma de média seguido do erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao controle não tratado com os agonista.

#### 4.7 Ensaios de migração celular

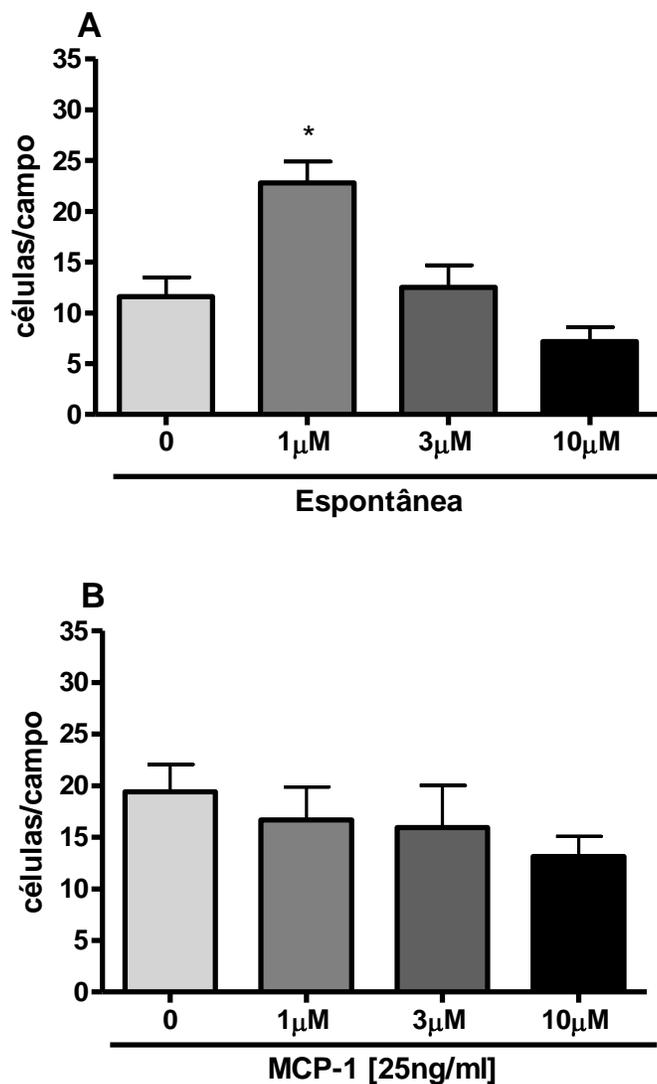
Na análise dos ensaios de migração celular *in vitro*, observamos que ao tratar as células RAW 264.7, brevemente antes do ensaio, com diferentes concentrações do agonista WIN 55212-2, o nível de migração celular espontânea (Figura 7A) aumenta de forma significativa na concentração mais baixa do agonista, embora na concentração mais alta do agonista foi observado uma redução significativa da migração frente ao agente quimiotático MCP-1 (Figura 7B).

Um perfil semelhante foi observado na presença do agonista de CB2 JWH 015, cujo pré-tratamento das células resulta em aumento da migração celular espontânea (Figura 8A). Não se observou a redução significativa da migração frente o agente MCP-1 com este agonista (Figura 8B).

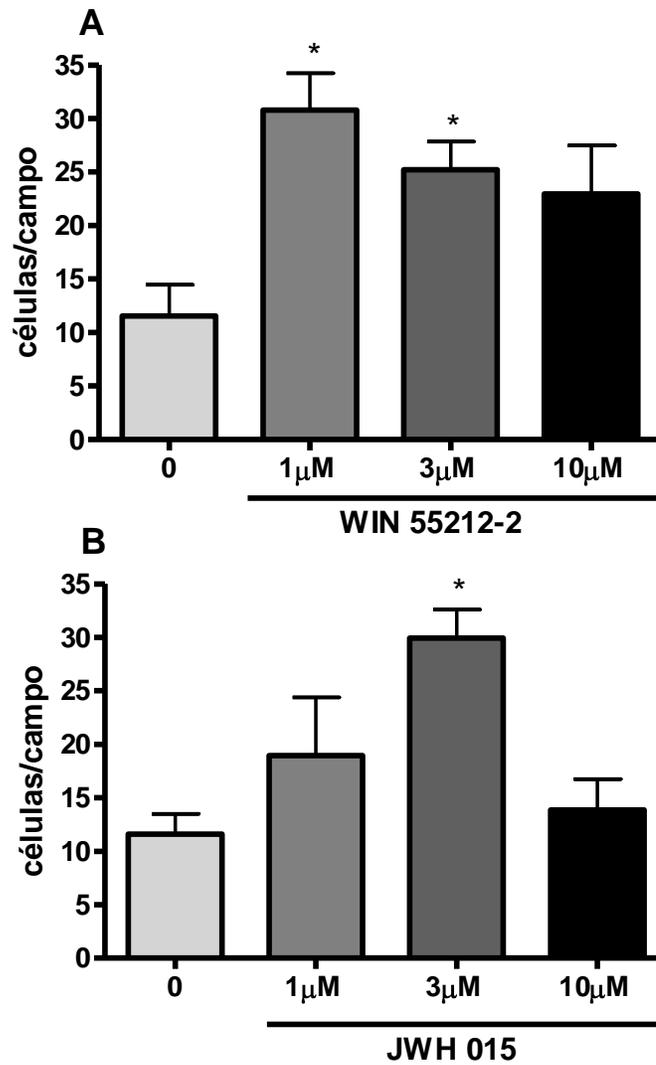
O agonista WIN 55212-2 e o JWH 015 também atuaram como potentes agentes quimiotáticos, induzindo por si a migração de macrófagos *in vitro* (Figura 9).



**Figura 7.** Migração *in vitro* de RAW 264.7 pré-tratadas com agonista sintético WIN 55212-2 na concentração de 1, 3 e 10  $\mu$ M; A. Migração espontânea de células; B. Migração induzida por MCP-1. Os valores estão expressos na forma de média seguido do erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o controle não tratado com os agonistas.



**Figura 8.** Migração *in vitro* de RAW 264.7 pré-tratadas com agonista de CB2 JWH 015 na concentração de 1, 3 e 10  $\mu$ M; A. Migração espontânea de células; B. Migração induzida por MCP-1. Os valores estão expressos na forma de média seguido do erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \* $p < 0,05$  quando comparado com o controle não tratado com o agonista.



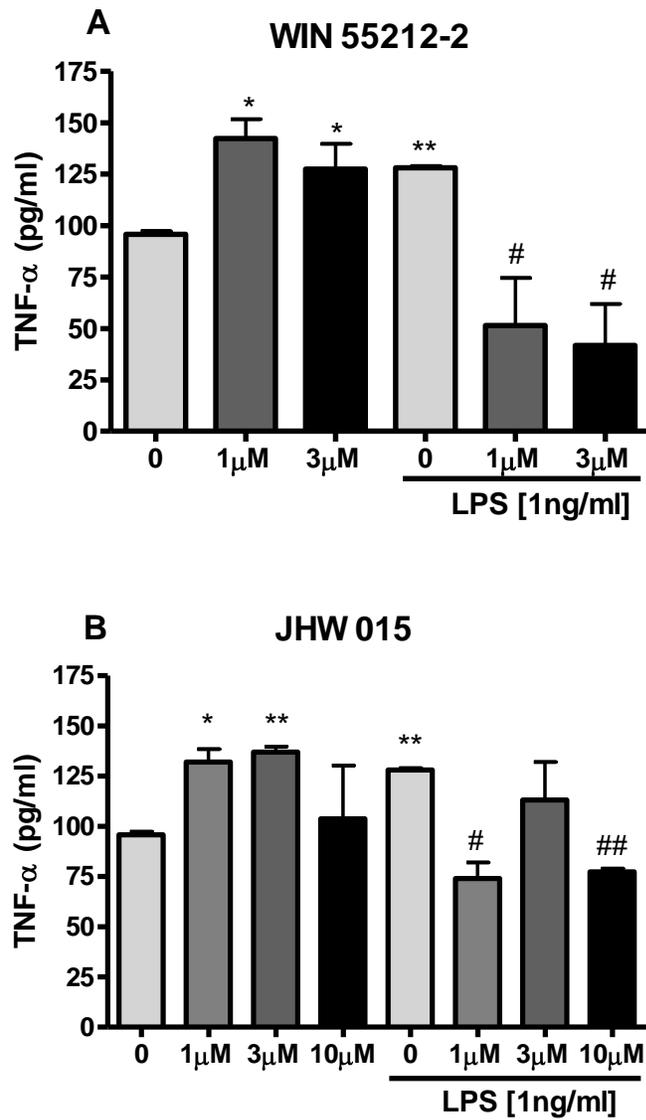
**Figura 9.** Migração *in vitro* de RAW 264.7; A. Migração induzida com o agonista WIN 55212-2 nas concentrações de 1, 3 e 10 μM; B. Migração induzida com o agonista JWH 015 nas concentrações de 1, 3 e 10 μM. Os valores estão expressos na forma de média seguido do erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \* $p < 0,05$  quando comparado com o controle.

#### 4.8 Determinação da produção de citocinas *in vitro*

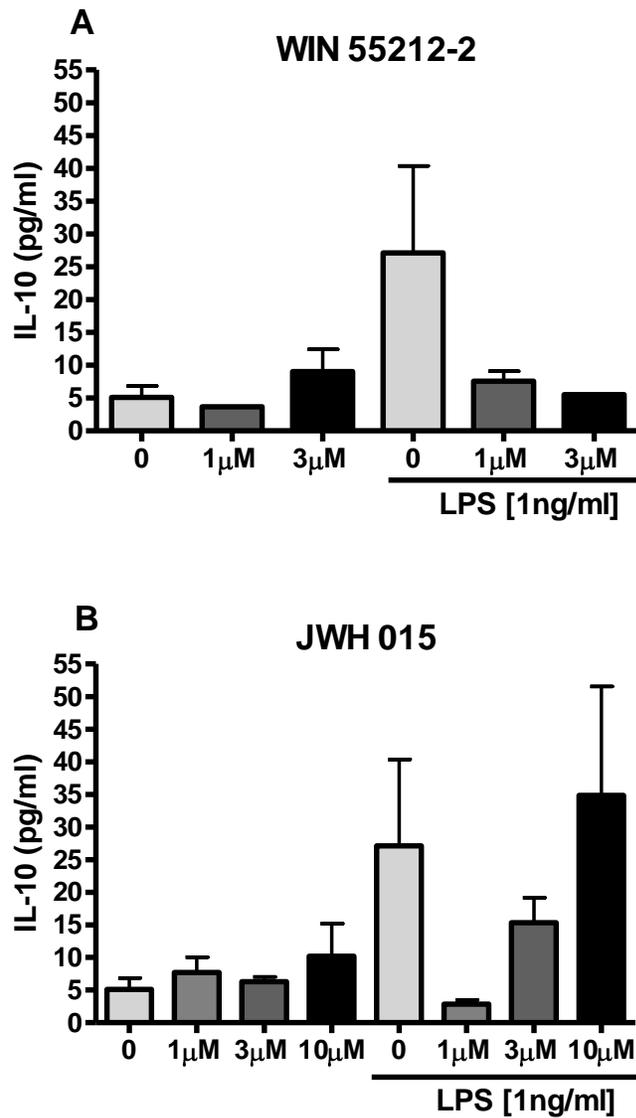
Foram determinados os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10 e adiponectina *in vitro* a partir do sobrenadante da co-cultura de macrófagos (RAW 264.7) com adipócitos maduros (3T3-L1). Avaliamos a atividade do agonista do receptor CB1 e CB2 na liberação de citocinas basal e estimulada com LPS. As células que foram estimuladas com LPS produzem mais TNF- $\alpha$  quando comparada a liberação basal (Figura 10A e B), que não recebeu nenhum tipo de tratamento ou estímulo. Os níveis de TNF- $\alpha$  nas culturas onde houve a adição do WIN 55212-2 (Figura 10A) e do JWH 015 (Figura 10B) nas diferentes concentrações encontram-se mais elevados quando comparados as células não-tratadas. No entanto, células estimuladas com LPS apresentam níveis reduzidos desta citocina quando estão na presença dos agonistas.

Quanto à produção de IL-10, a adição dos agonistas não modificou a produção basal ou a induzida pelo LPS (Figura 11).

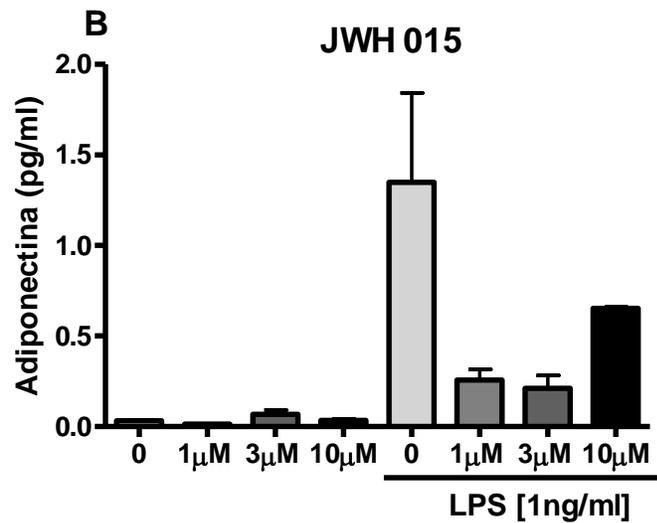
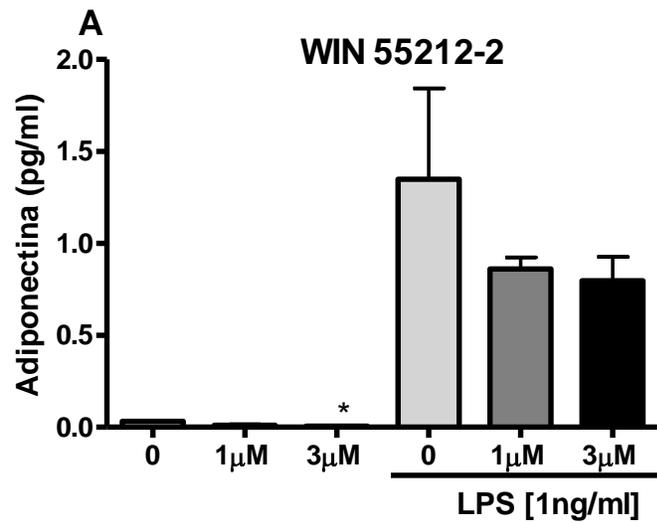
A produção de adiponectina *in vitro* encontra-se reduzida na maior dose (3 $\mu$ M) de WIN 55212-2 na liberação basal (Figura 12A).



**Figura 10.** Níveis de TNF- $\alpha$  liberado *in vitro* na co-cultura de RAW 264.7 e 3T3-L1, na forma basal (0) e estimulada com LPS, na presença do agonista WIN 55212-2 (Painel A) e do JHW 015 (Painel B). Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparados ao controle, # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  quando comparados ao controle LPS.



**Figura 11.** Níveis de IL-10 liberado *in vitro* na co-cultura de RAW 264.7 e 3T3-L1, na forma basal (0) e estimulada com LPS, na presença do agonista WIN 55212-2 (Painel A) e do JWH 015 (Painel B). Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (EPM) de triplicatas.

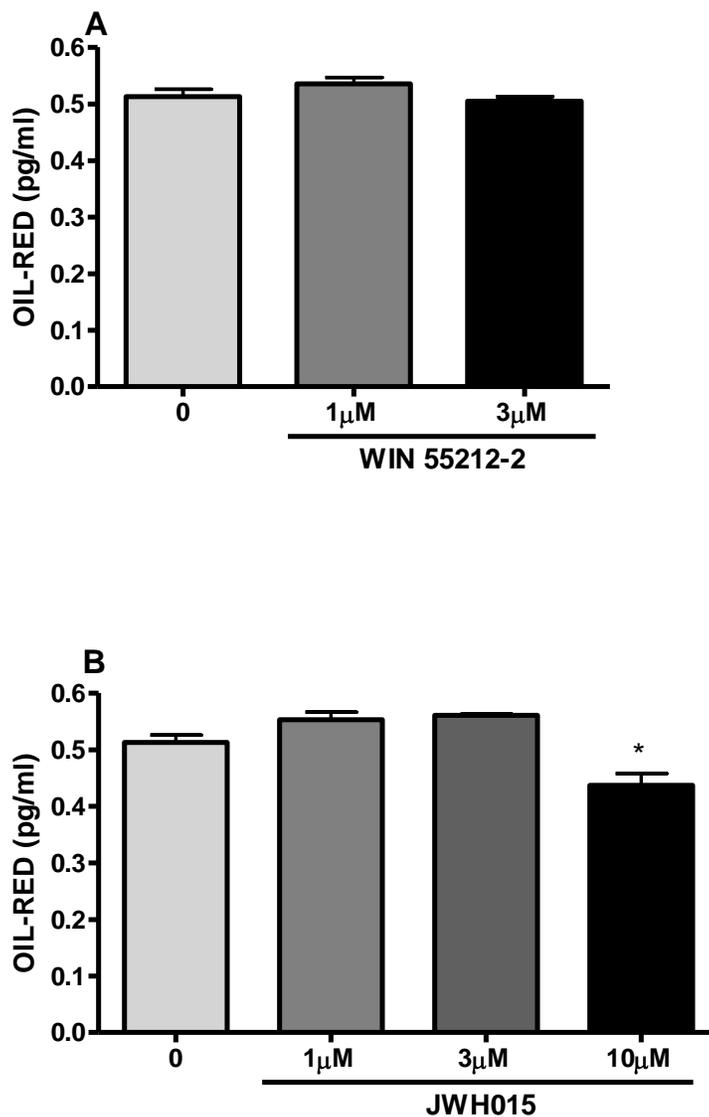


**Figura 12.** Níveis de Adiponectina liberada *in vitro* na co-cultura de RAW 264.7 e 3T3-L1, na forma basal (0) e estimulada com LPS, na presença do agonista WIN 55212-2 (Painel A) e do JWH 015 (Painel B). Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \* $p < 0,05$  quando comparados ao controle da forma basal.

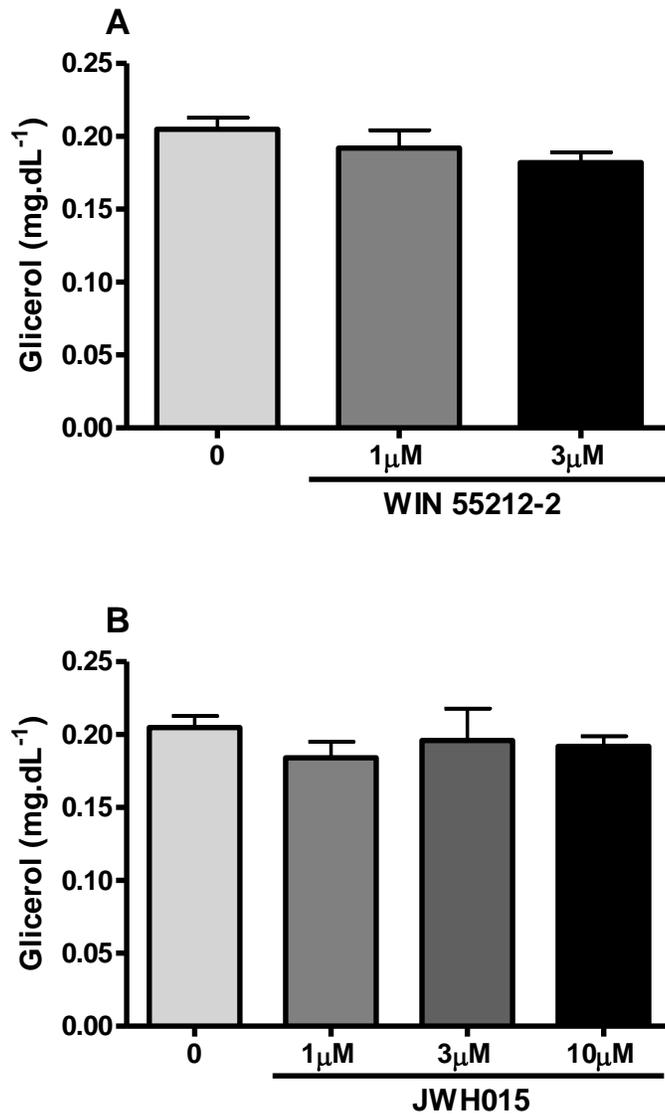
#### 4.9 Determinação da diferenciação e lipólise basal em adipócitos isolados

Avaliamos a diferenciação dos adipócitos na presença dos agonistas de receptores CB1 e CB2 pelo ensaio de OilRed-O. Foi possível observar que na presença de 3 $\mu$ M do agonista JWH 015 há um aumento significativo da adipogênese, porém na maior dose do agonista (10 $\mu$ M) foi avaliado uma diminuição estatisticamente significativa quando comparada aos controles. Quanto à presença do agonista WIN 55212-2, não se observou alterações sobre a adipogênese *in vitro* (Figura 13).

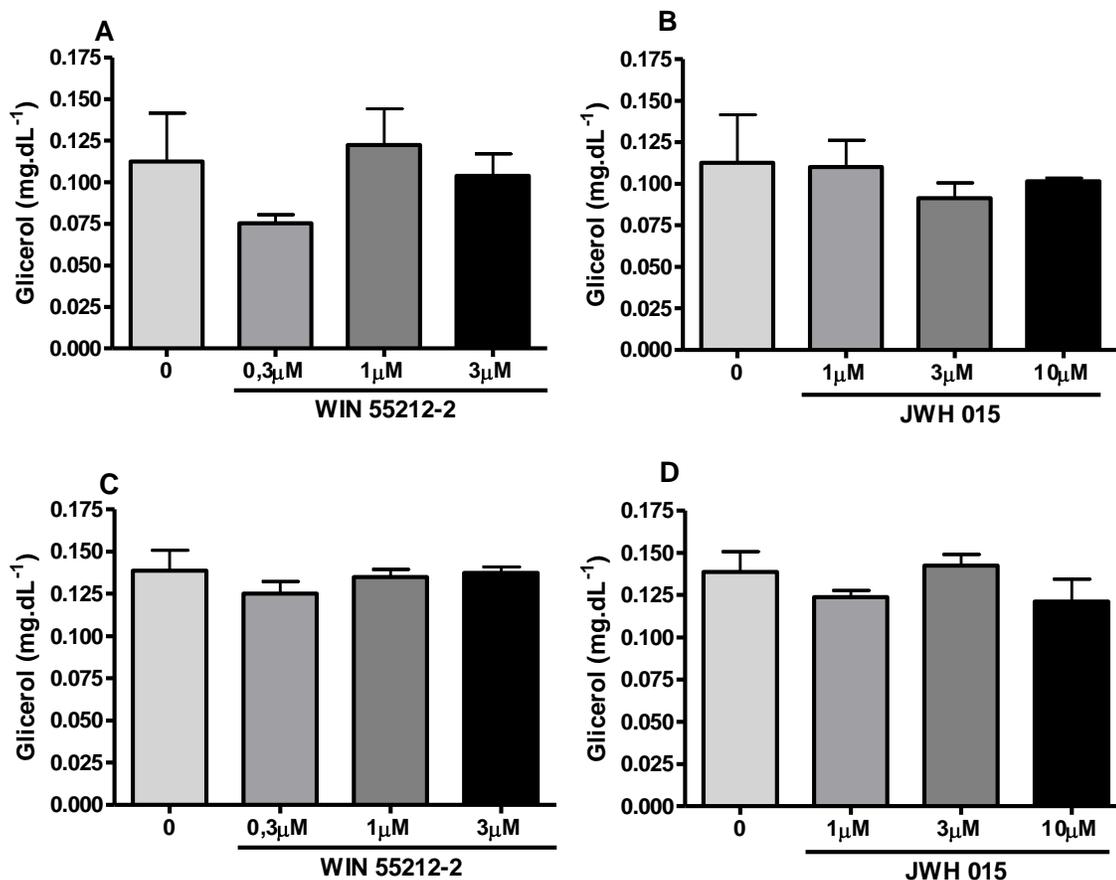
Quando analisamos os resultados da atividade lipolítica basal *in vitro* das culturas celulares de adipócitos maduros na presença do JWH 015 e do WIN 55212-2 não observamos diferenças nos valores obtidos (Figura 14). O mesmo ocorreu quando a atividade lipolítica foi avaliada utilizando adipócitos isolados de camundongos controles ou obesos (Figura 15).



**Figura 13.** Determinação da adipogênese *in vitro* pelo ensaio de OilRed-O em cultura de adipócitos maduros na presença ou ausência dos agonistas WIN 55212-2 (Painel A) e JWH 015 (Painel B). Os valores estão expressos em absorbância (540 nm) sendo apresentados em média e erro padrão da média (EPM) de triplicatas. \* $p < 0,05$  quando comparado com controle.



**Figura 14.** Lipólise basal em cultura celular de 3T3-L1 maduros na presença ou ausência dos agonistas WIN 55212-2 (Painel A) e JWH 015 (Painel B). Os valores estão expressos em média seguido do erro padrão da média (EPM) de triplicatas.



**Figura 15.** Lipólise basal em cultura celular de adipócitos isolados de camundongos. A. Adipócitos de camundongos controle incubados na ausência ou presença do agonista sintético WIN 55 212-2; B. Adipócitos de camundongos controle incubados na ausência ou presença do agonista de CB2 JWH 015; C. Adipócitos de camundongos obesos incubados na ausência ou presença do agonista sintético WIN 55 212-2; D. Adipócitos de camundongos obesos incubados na ausência ou presença do agonista de CB2 JWH 015. Os valores estão expressos em média seguido do erro padrão da média (EPM) de triplicatas.

## 5 DISCUSSÃO

A obesidade e o sobrepeso vêm se tornando um fenômeno global que está aumentando em proporções epidêmicas. Isso se deve em especial a mudança de estilos de vida e hábitos alimentares que resultam numa desordem metabólica, desequilíbrio da homeostase energética, crescimento e desequilíbrio dos hormônios e citocinas produzidos pelo tecido adiposo (Pan *et al*, 2010).

Camundongos mantidos em dieta hiperlipídica constituem um eficiente modelo de obesidade, onde se pode observar um aumento significativo do tecido adiposo e alterações metabólicas associadas à presença da resistência periférica à insulina bem como alterações no perfil de produção de citocinas pró- e antiinflamatórias (De Souza *et al*, 2005). De fato, nos experimentos realizados com a introdução da dieta hiperlipídica aos camundongos durante 12 ou 24 semanas foi possível observar um ganho de peso corpóreo associado a um aumento da adiposidade visceral. Este aumento da adiposidade também foi acompanhado de alterações metabólicas caracterizadas pelo aumento da glicemia basal e resistência periférica à insulina.

Uma combinação de mecanismos centrais e periféricos está envolvida na modulação da ingestão alimentar e no consumo de energético de mamíferos (Cota *et al.*, 2003). Há crescentes evidências de que o sistema endocanabinóide desempenha um importante papel no controle do apetite e do balanço energético, tanto em nível periférico quanto central (Nodari *et al.*, 2007, Stopo *et al.*, 2006). A descoberta dos receptores canabinóides 1 e 2, a caracterização dos ligantes endógenos (endocanabinóides) e das vias de biossíntese e de degradação dos mesmos, forneceu uma base molecular para investigar os efeitos do sistema endocanabinóide sobre diversas funções fisiológicas (Lutz, 2002). Devido a sua natureza lipofílica, os endocanabinóides não podem ser armazenados em vesículas e, assim, são sintetizados e liberados “sob demanda” em resposta a diversos estímulos fisiológicos e patológicos (Piomelli, 2003).

Estudos com animais sugerem que o sistema endocanabinóide é importante na indução da ingestão alimentar, sendo ativado transitoriamente após um curto prazo de jejum e/ou na exposição a alimentos palatáveis, induzindo apetite, saciedade e,

finalmente, reduz a lipogênese e estimula a diminuição do gasto energético (Di Marzo e Matias, 2005).

Há evidências crescentes de que ocorra uma atividade aumentada do sistema endocanabinóide (em termos de regulação positiva do receptor CB1 e dos níveis dos endocanabinóides) durante condições de desbalanço da homeostase energética como na obesidade (Matias e Di Marzo, 2006; Di Marzo e Matias, 2005). Esta super atividade ocorreria no hipotálamo, mas também em tecidos periféricos, como o tecido adiposo, como já relatado experimentalmente em camundongos mantidos em dieta hiperlipídica e pacientes obesos (Blüher *et al.*, 2006; Matias *et al.*, 2006). A redução da expressão/atividade da enzima FAAH parece estar presente na obesidade o que explicaria o aumento dos níveis de endocanabinóides, embora haja resultados discrepantes (Jensen *et al.*, 2007; Sipe *et al.*, 2005). A expressão aumentada de receptores CB1 no tecido adiposo durante a obesidade também apresenta resultados conflitantes na literatura, sendo que alguns trabalhos reportaram que não há alteração, enquanto outros relataram inibição desta expressão (Yan *et al.*, 2007; Matias *et al.*, 2006; Engeli *et al.*, 2005).

Deveaux e colaboradores (2009) demonstraram que durante a progressão da obesidade a expressão dos receptores CB2 sofre um forte aumento em paralelo ao desenvolvimento do tecido adiposo e da inflamação, e sugerem que o aumento da expressão de CB2 esteja relacionado com o aumento do número de macrófagos no tecido adiposo. Nos nossos experimentos com animais obesos pudemos observar o significativo aumento da expressão do receptor CB1 e CB2 no tecido adiposo quando comparamos ao grupo controle, reforçando a hipótese de uma desregulação do sistema endocanabinóide durante a progressão da obesidade. Por outro lado, quando analisamos a expressão do sistema endocanabinóide nos macrófagos isolados do tecido adiposo não detectamos diferenças na expressão dos receptores CB nos animais obesos quando comparados ao controle, reforçando a hipótese proposta por Deveaux e colaboradores, que o aumento de CB2 no tecido adiposo pode estar relacionado somente ao aumento do infiltrado de macrófagos durante a obesidade e não com um aumento da expressão destes receptores nestas células ou nos adipócitos.

Starowicz e colaboradores em 2008 também analisaram a expressão das enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinóides como a NAPE, DAG lipase e a FAAH, MAGL em camundongos mantidos em dieta hiperlipídica e não encontraram diferenças significativas na expressão destas no tecido adiposo visceral após 14 semanas de dieta hiperlipídica. Nossos experimentos detectaram uma redução na expressão gênica da NAPE-lipase no grupo avaliado após 24 semanas, sugerindo que esta alteração possa ser tardia e reflexo de uma resposta de feedback negativo em relação à produção de endocanabinóides, embora mais experimentos sejam necessários para a confirmação desta hipótese.

A bem descrita ação orexígena dos canabinóides associada à proeminente expressão do receptor CB1 no sistema nervoso central, bem como as ações terapêuticas anorexígenas do antagonista SR141716 (rimonabante) determinaram que o foco de grande parte dos estudos do sistema endocanabinóide fosse sobre suas ações centrais (Quarta *et al.*, 2011). Dados mais recentes, no entanto, apontam funções periféricas importantes do sistema endocanabinóide, sendo o tecido adiposo um dos alvos mais estudados (Quarta *et al.*, 2011). Deste modo, decidimos contribuir com este conhecimento utilizando agonistas CB1 (WIN 55212-2) e CB2 (JWH 015) em modelos *in vitro* que simulam situações relacionadas à expansão (adipogênese), à função fisiológica (atividade lipolítica) e ao estabelecimento da inflamação no tecido adiposo, úteis na compreensão das funções desempenhadas pelo tecido adiposo durante a obesidade.

A atividade dos macrófagos no início do processo inflamatório é exercida pela capacidade de migração de monócitos em resposta a estímulos específicos que induzem quimiocinese ou quimiotaxia. A quimiocinese é um processo pelo qual as células apresentam um movimento aleatório induzido por uma substância quimioestimulante. Já a quimiotaxia resulta em movimentos celulares direcionados a um gradiente de concentração de estímulos quimiotáxicos (Raborn *et al.*, 2008). O sistema endocanabinóide tem um importante efeito sobre as funções imunológicas, modulando a produção de citocinas inflamatórias, a ativação células do sistema imune por estímulos inflamatórios, bem como a migração de células por quimiotaxia (Pandey *et al.*, 2009). Song e Zhong (2000) realizaram um estudo com células embrionárias renais

293 transfectadas com o gene humano CB1 e mostraram que os agonistas canabinóides HU-210, WIN55212-2 e anandamida utilizados como quimiotáticos foram capazes de induzir de forma significativa a migração celular. Entretanto, outros experimentos com células T e linhagens de células de câncer de mama (NT2,5) demonstraram que ao tratar as células previamente com o agonistas sintéticos JWH 015, WIN55212-2, CP55 e AEA, observa-se uma inibição significativa da migração celular *in vitro* frente ao estímulo induzido por CXCL12 (Nasser *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2006). Linhagens de macrófagos, como a U937 e THP-, bem como monócitos de sangue humano migram em resposta à estimulação com o agonista 2-araquidonoilglicerol atuando em receptores CB2 (Kishimoto *et al.*, 2003).

Ao tratar macrófagos da linhagem RAW 264.7 previamente com os agonistas sintéticos, pudemos observar um efeito inibitório somente do WIN 55212-2, na maior dose, sobre a migração celular frente ao estímulo da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). Durante a obesidade o tecido adiposo produz MCP-1 em grandes quantidades e esta tem sido apontada como uma quimiocina importante no recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (Bremer *et al.*, 2011). No entanto, o mesmo pré-tratamento com os agonistas CB1 e CB2 em baixas doses foi capaz de aumentar a migração espontânea dos macrófagos, sugerindo uma possível ação estimulatória. Deste modo, analisamos a resposta quimiotática colocando os agonista sintéticos no inferior da câmara de quimiotaxia, o que resultou na indução da migração celular frente às diferentes concentrações dos agonistas. Nossos resultados sugerem que ambos receptores CB1 e CB2 possam mediar efeitos quimiotáticos dos endocannabinóides e contribuir desta forma para um maior recrutamento de monócitos do sangue periférico para o tecido adiposo.

Segundo Hotamisligil (2006), a obesidade contribui para o estabelecimento de um quadro moderado e sistêmico de inflamação, que é caracterizado principalmente pelo aumento dos níveis circulantes e teciduais de substâncias pró-inflamatórias, redução das antiinflamatórias e pelo infiltrado de células inflamatórias, macrófagos, no tecido adiposo. Alguns autores relatam que o sistema endocanabinóide modula funções imunes e, portanto têm um grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias (Montecucco *et al.*, 2008). Experimentos com monócitos

humanos revelam que tanto os canabinóides sintéticos CP55, 940 e WIN55 212-2, bem como os agonistas CB2 seletivo JWH-015, causam uma significativa inibição na produção da quimiocinas como o fator derivado do estroma (SDF-1), importante quimiotático de linfócitos T (Ghosh *et al.*, 2006). O agonista WIN 55212-2 também inibiu a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados por LDL oxidada (Hao *et al.*, 2010). Outros relatos sugerem que receptores CB2, principalmente, possam mediar atividades anti-inflamatórias pois ligantes como (+)-HU-211 e DMH-11C inibem a produção e ação do TNF- $\alpha$  e outras citocinas da fase aguda (Klein *et al.*, 2000) e, na fisiopatologia da doença hepática alcoólica, em especial nas células de Kupffer, o agonista JWH-133 foi capaz de diminuir a expressão gênica de marcadores clássicos pró-inflamatórios (tipo M1) e de reduzir a esteatose (Louvet *et al.*, 2011); .

No entanto, quando se trata de estudos relacionados à inflamação associada ao tecido adiposo, os dados não são coerentes com estes relatos anteriores. O tratamento com o agonista CB2 JWH-133 foi capaz de potenciar a inflamação no tecido adiposo *in vivo*, em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Tecido adiposo de camundongos cultivado *ex-vitro* também aumentou a expressão gênica de TNF-alfa e da quimiocina Ccl2 após tratamento com JWH-133 (Deveaux *et al.*, 2009). Na interação entre macrófagos e adipócitos onde se observa uma redução da sinalização da insulina, a utilização do *rimonabant* foi capaz de reverter este efeito, sugerindo um papel negativo dos receptores CB1 nesta interação (Miranville *et al.*, 2010). Nos nossos experimentos pudemos observar que o agonista sintético (WIN 55 313-2) e o agonista de CB2 (JWH 015) foram capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$  em co-culturas de adipócitos maduros/macrófagos na presença de estímulos como LPS, modelo experimental *in vitro* que mimetiza vários aspectos da inflamação no tecido adiposo durante a obesidade (Toyoda *et al.*, 2008). No entanto, a produção basal foi aumentada em co-culturas de macrófagos e adipócitos quando tratadas com os mesmos agonistas. Os macrófagos são os principais alvos de LPS e essa interação ativa múltiplas vias de sinalização inflamatória. O LPS induz a expressão e liberação de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 e também induz a produção de diferentes mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e AEA (Liu *et al.*, 2003).

A adiponectina, um hormônio produzido pelo tecido adiposo, desempenha um papel importante na modulação do metabolismo de gordura e glicose, pois inibe a gliconeogênese hepática e controla a produção de ácidos graxos livres, através da supressão da lipogênese e ativação da oxidação dos ácidos graxos. A hiperativação do sistema endocanabinóide induz em cultura de adipócitos a redução nos níveis de adiponectina e um aumento nos níveis de visfatina, uma adipocina com efeito oposto a adiponectina (Nodari *et al.*, 2007). Segundo os dados obtidos no presente estudo, pudemos observar que houve uma redução na produção de adiponectina na concentração de 3 $\mu$ M do agonista WIN 55212-2, e conforme a literatura é o bloqueio do receptor CB1 que parece estar relacionado a uma produção maior de adiponectina (Bensaid *et al.*, 2003).

Devido às dificuldades em estudar adipogênese *in vivo*, vários modelos *in vitro* vem sendo estabelecidos para estudos celulares e moleculares, dentre esses modelos a linhagem celular 3T3-L1 é a mais utilizada. Essa linhagem de fibroblastos quando cultivada em meio adequado pode se diferenciar em pré-adipócitos e depois adquirir um fenótipo de adipócito maduro, depositando triglicerídeos em vesículas lipídicas no seu citoplasma e expressando genes que também são expressos por adipócitos maduros *in vivo* (Atiar *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que AEA e THC é capaz de aumentar a expressão de PPAR- $\gamma$ , um marcador de adipogênese em 3T3-F442A e em 3T3-L1, respectivamente (Pagano *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2010). Segundo relatos da literatura a ativação de CB1 é responsável pelo aumento da expressão de genes relacionados à adipogênese e, níveis elevados de AEA em obesos induzem ainda mais a diferenciação de fibroblastos em adipócitos através da ativação de PPAR- $\gamma$ . Ao estimular a linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 com agonista de CB1 WIN 55212-2 observou-se um aumento na expressão de PPAR- $\gamma$  e do acúmulo de lipídeos, avaliado pelo ensaio de Oil-red (Bellocchio *et al.*, 2008). O tratamento de 3T3-L1 com THC também estimulou a adipogênese avaliada pelo ensaio de OilRed-O (Teixeira *et al.*, 2010). Em nossos resultados somente a maior dose do agonista de CB2 JWH 015 foi capaz de inibir a diferenciação adipócitos *in vitro*. Não há relatos prévios da utilização de agonista CB2

em ensaios de diferenciação de adipócitos e estudos futuros serão necessários para confirmar uma possível ação anti-adipogênica mediada por receptores CB2.

E, finalmente, há um único relato na literatura mostrando que o WIN 55212-2 exerce atividade lipolítica em adipócitos isolados de rato, mas por mecanismos independentes de sua ação em CB1 e CB2, enquanto que o JWH 015 não possui atividade (Nieri *et al.*, 2003). Nos ensaios de lipólise com adipócitos isolados de camundongos obesos e de 3T3-L1 não observamos nenhuma atividade lipolítica destes compostos.

## 6 CONCLUSÃO

Podemos concluir, com base nos resultados obtidos, que embora o tecido adiposo dos animais mantidos em dieta hiperlipídica apresente uma maior expressão dos receptores canabinóides, esse aumento pode ser decorrente do intenso infiltrado de macrófagos neste tecido, mas a expressão dos receptores nestas células e nos adipócitos é normal. Os agonistas de receptores canabinóides WIN 55212-2 e JWH 015 modificam a produção de citocinas decorrente da interação entre macrófagos e adipócitos, resultando em efeitos pró-inflamatórios, como o aumento basal da produção de TNF- $\alpha$  e redução da produção basal de adiponectina. Adicionalmente, estes agonistas mostraram atuar como agentes quimiotáticos para macrófagos *in vitro* o que poderia contribuir para o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, caso este esteja produzindo/liberando endocanabinóides durante a obesidade, contribuindo para o estabelecimento da inflamação associada à obesidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aprahamian T. R.; Sam F. Adiponectin in cardiovascular inflammation and obesity. **Int J Inflamm**, 2011:376909, 2011.

Atiar Rahman M.; Kumar S. G.; Lee S. H.; Hwang H. S.; Kim H. A.; Yun J. W. Proteome analysis for 3T3-L1 adipocyte differentiation. **J Microbiol Biotechnol**,18(12):1895-902, 2008.

Atwood B. K.; Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. **Br J Pharmacol**, 160(3):467-79, 2010.

Bastarrachea R. A.; López-Alvarenga J. C.; Bolado-García V. E.; Téllez-Mendoza J.; Laviada-Molina H.; Comuzzie A. G. Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance. **Gac Med Mex**, 143(6):505-12, 2007.

Bellocchio L.; Cervino C.; Vicennati V.; Pasquali R.; Pagotto U. Cannabinoid type 1 receptor: another arrow in the adipocytes' bow. **J Neuroendocrinol**, 1:130-8, 2008.

Bensaid M.; Gary-Bobo M.; Esclangon A.; Maffrand J. P.; Le Fur G.; Oury-Donat F.; Soubrié P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/farats and in cultures adipocyte cells. **Mol Pharmacol**, 63(4):908-14, 2003.

Berg A. H.; Scherer P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**, 13;96(9):939-49, 2005.

Bisogno T.; De Petrocellis L.; Di Marzo V. Fatty acid amide hydrolase, an enzyme with many bioactive substrates. Possible therapeutic implications. **Curr Pharm**, 8(7):533-47, 2002.

Blüher M.; Engeli S.; Klötting N.; Berndt J.; Fasshauer M.; Bátkai S.; Pacher P.; Schön M. R.; Jordan J.; Stumvoll M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. **Diabetes**, 55(11):3053-60, 2006.

Booz GW. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. **Free Radic Biol Med**. 51(5):1054-61, 2011.

Bremer A. A.; Devaraj S.; Afify A.; Jialal I. Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 96(11):E1782-8, 2011.

Cabral G. A.; Raborn E. S.; Griffin L.; Dennis J.; Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. **Br J Pharmacol**, 153(2):240-51, 2008.

Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **J Clin Invest**, 117(9):2362-8, 2007.

Caspar-Bauguil S.; Cousin B.; Bour S.; Casteilla L.; Penicaud L.; Carpéné C. Adipose tissue lymphocytes: types and roles. **J Physiol Biochem**, 65(4):423-36, 2009.

Cota D.; Marsicano G.; Tschöp M.; Grübler Y.; Flachskamm C.; Schubert M.; Auer D.; Yassouridis A.; Thöne-Reineke C.; Ortmann S.; Tomassoni F.; Cervino C.; Nisoli E.; Linthorst A. C.; Pasquali R.; Lutz B.; Stalla G. K.; Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **J Clin Invest**, 112(3):423-31, 2003.

Cunha P.; Romão A. M.; Mascarenhas-Melo F.; Teixeira H. M.; Reis F. Endocannabinoid system in cardiovascular disorders new pharmacotherapeutic opportunities. **J Pharm Bioallied Sci**, 3(3):350-60, 2011.

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):4189-91, 2005.

Deveaux V.; Cadoudal T.; Ichigotani Y.; Teixeira-Clerc F.; Louvet A.; Manin S.; Nhieu J. T.; Belot M. P.; Zimmer A.; Even P.; Cani P. D.; Knauf C.; Burcelin R.; Bertola A.; Le Marchand-Brustel Y.; Gual P.; Mallat A.; Lotersztajn S. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. **PLoS One**, 4(6):e5844, 2009.

Di Marzo V.; Goparaju S. K.; Wang L.; Liu J.; Bátkai S.; Járαι Z.; Fezza F.; Miura G. I.; Palmiter R. D.; Sugiura T.; Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. **Nature**, 410(6830):822-5, 2001.

Di Marzo V.; Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nat Neurosci**, 8(5):585-9, 2005.

Di Marzo V.; Melck D.; Bisogno T.; De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci**, 21(12):521-8, 1998.

Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nat Rev Drug Discov**, 7(5):438-55, 2008.

Di Marzo V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. **Trends Pharmacol Sci**, 27(3):134-40, 2006.

Dupasquier C. M.; Weber A. M.; Ander B. P.; Rampersad P. P.; Steigerwald S.; Wigle J. T.; Mitchell R. W.; Kroeger E. A.; Gilchrist J. S.; Moghadasian M. M.; Lukas A.; Pierce G. N. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 291(6):H2987-96, 2006.

Engeli S.; Böhnke J.; Feldpausch M.; Gorzelniak K.; Janke J.; Bátkai S.; Pacher P.; Harvey-White J.; Luft F. C.; Sharma A. M.; Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. **Diabetes**, 54(10):2838-43, 2005.

Fasshauer M.; Klein J.; Neumann S.; Eszlinger M.; Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, 290(3):1084-9, 2002.

Fernández-Sánchez A.; Madrigal-Santillán E.; Bautista M.; Esquivel-Soto J.; Morales-González A.; Esquivel-Chirino C.; Durante-Montiel I.; Sánchez-Rivera G.; Valadez-Vega C.; Morales-González J. A. Inflammation, oxidative stress, and obesity, **Int J Mol Sci**, 12(5):3117-32, 2011.

Francischetti E. A.; De Abreu V. C. The Endocannabinoid System: A new perspective for cardiometabolic Risk control. **Arq Bras Cardiol**, 87(4):548-5, 2006.

Gary-Bobo M.; Elachouri G.; Gallas J. F.; Janiak P.; Marini P.; Ravinet-Trillou C.; Chabbert M.; Cruccioli N.; Pfersdorff C.; Roque C.; Arnone M.; Croci T.; Soubrié P.; Oury-Donat F.; Maffrand J. P.; Scatton B.; Lacheretz F.; Le Fur G.; Herbert J. M.; Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. **Hepatology**, 46(1):122-9, 2007.

Gary-Bobo M.; Elachouri G.; Scatton B.; Le Fur G.; Oury-Donat F.; Bensaid M. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. **Mol Pharmacol**, 69(2):471-8, 2006.

Ghosh S.; Preet A.; Groopman J. E.; Ganju R. K. Cannabinoid receptor CB2 modulates the CXCL12/CXCR4-mediated chemotaxis of T lymphocytes. **Mol Immunol**, 43(14):2169-79, 2006.

Gregor M. F.; Hotamisligil G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, 29:415-45, 2011.

Greineisen W.E.; Turner H. Immunoactive effects of cannabinoids: considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. **Int Immunopharmacol**. 10(5):547-55; 2010.

Guindon J.; Hohmann A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 8(6):403-21, 2009.

Hao M. X.; Jiang L. S.; Fang N. Y.; Pu J.; Hu L. H.; Shen L. H.; Song W.; He B. The cannabinoid WIN55,212-2 protects against oxidized LDL-induced inflammatory response in murine macrophages. **J Lipid Res**, 51(8):2181-90, 2010.

Hotamisligil G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, 444(7121):860-7, 2006

Janeway C. A.; Medzhitov R. Innate Immune Recognition. **Annual Review of Immunology**, 20(1):197-216, 2002.

Jbilo O.; Ravinet-Trillou C.; Arnone M.; Buisson I.; Bribes E.; Péleraux A.; Pénarier G.; Soubrié P.; Le Fur G.; Galiègue S.; Casellas P. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. **FASEB J**, 19(11):1567-9, 2005.

Jensen D. P.; Andreasen C. H.; Andersen M. K.; Hansen L.; Eiberg H.; Borch-Johnsen K.; Jørgensen T.; Hansen T.; Pedersen O. The functional Pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5,801 whites. **J Mol Med**, 85:445–449, 2007

Kishimoto S.; Gokoh M.; Oka S.; Muramatsu M.; Kajiwara T.; Waku K.; Sugiura T. 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage

like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. **J Biol Chem**, 278(27):24469-75, 2003.

Kishimoto S.; Kobayashi Y.; Oka S.; Gokoh M.; Waku K.; Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. **J Biochem**, 135(4):517-24, 2004.

Klein T. W.; Lane B.; Newton C. A.; Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network. **Proc Soc Exp Biol Med**, 225(1):1-8, 2000.

Klein T. W.; Newton C.; Larsen K.; Lu L.; Perkins I.; Nong L.; Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. **J Leukoc Biol**, 74(4):486-96, 2003.

Kunos G.; Osei-Hyiaman D.; Liu J, Godlewski G.; Batkai S. Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. **J Biol Chem**, 283(48):33021-5, 2008.

Leite C. E.; Mocelin C. A.; Petersen G. O.; Leal M. B.; Thiesen F. V. Rimobanant: an antagonist drug of the endocannabinoid system for the treatment of obesity. **Pharmacol Rep**, 61(2):217-24, 2009.

Liu J.; Batkai S.; Pacher P.; Harvey-White J.; Wagner J. A.; Cravatt B. F.; Gao B.; Kunos G. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/p-hosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. **J Biol Chem**, 278(45):45034-9, 2003.

Liu J.; Wang L.; Harvey-White J.; Osei-Hyiaman D.; Razdan R.; Gong Q.; Chan A. C.; Zhou Z.; Huang B. X.; Kim H. Y.; Kunos G. A biosynthetic pathway for anandamine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103(36):13345-50, 2006.

Louvet A.; Teixeira-Clerc F.; Chobert M. N.; Deveaux V.; Pavoine C.; Zimmer A.; Pecker F.; Mallat A.; Lotersztajn S. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver

disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. **Hepatology**, 54(4):1217-26, 2011.

Lumeng C. N.; Bodzin J. L.; Saltiel A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, 117(1):175-84, 2007.

Lutz B. Molecular biology of cannabinoid receptors. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 66(2-3):123-42, 2002.

Matias I.; Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. **Trends Endocrinol Metab**, 18(1):27-37, 2007.

Matias I.; Gonthier M.; Orlando P.; Martiadis V.; De Petrocellis L.; Cervino C.; Petrosino S.; Hoareau L.; Festy F.; Pasquali R.; Roche R.; Maj M.; Pagotto U.; Monteleone P.; Di Marzo V. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose an adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 91(8):3171-80, 2006.

Miranville A.; Herling A. W.; Biemer-Daub G.; Voss M. D. Reversal of inflammation-induced impairment of glucose uptake in adipocytes by direct effect of CB1 antagonism on adipose tissue macrophages. **Obesity**, 18(12):2247-54, 2010.

Montecucco F.; Burger F.; Mach F.; Steffens S. CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 294(3):H1145-55, 2008.

Motaghedi R.; McGraw T. E. The CB1 endocannabinoid system modulates adipocyte insulin sensitivity. **Obesity (Silver Spring)**, 16(8):1727-34, 2008.

Nagarkatti P.; Pandey R.; Rieder S. A.; Hegde V. L.; Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. **Future Med Chem**, 1(7):1333-49, 2009.

Nasser M. W.; Qamri Z.; Deol Y. S.; Smith D.; Shilo K.; Zou X.; Ganju R. K. Crosstalk between chemokine receptor CXCR4 and cannabinoid receptor CB2 in modulating breast cancer growth and invasion. **PLoS One**, 6(9):e23901, 2011.

Nieri P.; Greco R.; Adinolfi B.; Breschi M. C.; Martinotti E.; Nannetti C.; Podestà A. CB1- and CB2-cannabinoid receptor-independent lipolysis induced by WIN 55,212-2 in male rat adipocytes. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 368(5):352-9, 2003.

Nilsson O.; Fowler C. J.; Jacobsson S. O. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 inhibits TNF-alpha-induced neutrophil transmigration across ECV304 cells. **Eur J Pharmacol**, 547(1-3):165-73, 2006.

Nodari S.; Manerba A.; Metra M.; Dei Cas L. Endocannabinoids and cardiovascular prevention: real progress? **Heart Int**, 3(1):27, 2007.

Okamoto Y.; Morishita J.; Tsuboi K.; Tonai T.; Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. **J Biol Chem**, 279(7):5298-305, 2004.

Osei-Hyiaman D.; Harvey-White J.; Bátkai S.; Kunos G. The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis. **Int J Obes (Lond)**, 1:S33-8, 2006.

Pacher P. Cannabinoid CB1 receptor antagonists for atherosclerosis and cardiometabolic disorders: new hopes, old concerns?. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 29(1):7-9, 2009.

Pagano C.; Pilon C.; Calcagno A.; Urbanet R.; Rossato M.; Milan G.; Bianchi K.; Rizzuto R.; Bernante P.; Federspil G.; Vettor R. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. **J Clin Endocrinol Metab**, 92(12):4810-9, 2007.

Pagotto U.; Cervino C.; Vicennati V.; Marsicano G.; Lutz B.; Pasquali R. How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? **Int J Obes (Lond)**, 1:S39-43, 2006.

Pan Changyu.; Hyung Joon Yoo.; Low-Tone Ho. Perspectives of CB1 Antagonist in Treatment of Obesity:Experience of RIO-Asia. **Journal of Obesity**, 10.1155/2011/957268, 2010.

Pandey R.; Mousawy K.; Nagarkatti M.; Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. **Pharmacol Res**, 60(2):85-92, 2009.

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 Snitrosation 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.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, 4(11):873-84, 2003.

Quarta C.; Mazza R.; Obici S.; Pasquali R.; Pagotto U. Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. **Trends Mol Med**, 17(9):518-26, 2011.

Raborn E. S.; Cabral G. A. Cannabinoid inhibition of macrophage migration to the trans-activating (Tat) protein of HIV-1 is linked to the CB(2) cannabinoid receptor. **J Pharmacol Exp Ther**, 333(1):319-27, 2010.

Raborn E. S.; Marciano-Cabral F.; Buckley N. E.; Martin B. R.; Cabral G. A. The cannabinoid delta-9- tetrahydrocannabinol mediates inhibition of macrophage chemotaxis to RANTES/CCL5: linkage to the CB2 receptor. **J Neuroimmune Pharmacol**, 3(2):117-29, 2008.

Robbins, S. L; Cotran, R. S; Kumar, V. **Pathologic basic os disease**. 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. 1425p.

Rocha V. Z.; Folco E. J. Inflammatory concepts of obesity. **Int J Inflamm**, 2011:529061, 2011.

Rull A.; Camps J.; Alonso-Villaverde C.; Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. **Mediators Inflamm**, 2010: 326580, 2010.

Sacerdote P.; Martucci C.; Vaccani A.; Bariselli F.; Panerai A. E.; Colombo A.; Parolaro D.; Massi P. The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. **J Neuroimmunol**, 159(1-2):97-105, 2005.

Samaan M. C. The macrophage at the intersection of immunity and metabolism in obesity. **Diabetol Metab Syndr**, 3(1):29, 2011.

Siegmund S. V.; Qian T.; De Harvey-White J.; Kunos G.; Vinod K. Y.; Hungund B.; Schwabe R. F. The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. **FASEB J**, (11): 2798-806, 2007.

Singla P.; Bardoloi A.; Parkash A. A. Metabolic effects of obesity: A review. **World J Diabetes**, 1(3): 76-88, 2010.

Sipe J. C.; Waalen J.; Gerber A.; Beutler E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). **Int J Obes (Lond)**, 29(7):755-9, 2005.

Song Z. H.; Zhong M. CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. **J Pharmacol Exp Ther**, 294(1):204-9, 2000.

Spoto B.; Fezza F.; Parlongo G.; Battista N.; Sgro' E.; Gasperi V.; Zoccali C.; Maccarrone M. Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. **Biochimie**, 88(12):1889-97, 2006.

Starowicz K. M.; Cristino L.; Matias I.; Capasso R.; Racioppi A.; Izzo A. A.; Di Marzo V. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat. **Obesity** (Silver Spring), 16(3):553-65, 2008.

Sugamura K.; Sugiyama S.; Nozaki T.; Matsuzawa Y.; Izumiya Y.; Miyata K.; Nakayama M.; Kaikita K.; Obata T.; Takeya M.; Ogawa H. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects ofcannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. **Circulation**, 119(1):28-36, 2009.

Teixeira D.; Pestana D.; Faria A.; Calhau C.; Azevedo I.; Monteiro R. Modulation of adipocyte biology by  $\delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. **Obesity**. 2010 Nov;18(11):2077-85.

Tibiriça E. The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. **Diabetol Metab Syndr**, 21;2:5, 2010.

Toyoda T.; Kamei Y.; Kato H.; Sugita S.; Takeya M.; Suganami T.; Ogawa Y. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue. **Obesity**, 16(6):1199-207, 2008.

Walter L.; Franklin A.; Witting A.; Wade C.; Xie Y.; Kunos G.; Mackie K.; Stella N. Non psychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. **J Neurosci**, 23:1398–1405, 2003.

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(12):1796-808, 2003.

Yan Z. C.; Liu D. Y.; Zhang L. L.; Shen C. Y.; Ma Q. L.; Cao T. B.; Wang L. J.; Nie H.; Zidek W.; Tepel M.; Zhu Z. M. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. **Biochem Biophys Res Commun**, 354:427–433, 2007.

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

Zhang L.; Sugiyama T.; Murabayashi N.; Umekawa T.; Ma N.; Kamimoto Y.; Ogawa Y.; Sagawa N. The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice. **J Mol Endocrinol**, 47(2):157-65, 2011.

Zuardi A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Rev Bras Psiquiatr**, 28(2):153-7, 2006.

## 8 ANEXO



UNIVERSIDADE  
SÃO FRANCISCO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 25 de Fevereiro de 2010.

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** Estudo da expressão de hepcidina no modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Farmacologia

**Autor(es):** Prof(a). Dr (a). Alessandra Gambero; Aline Noronha dos Santos.

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 001.02.10

Prezado(a)s Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária do dia 25/02/2010 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,

**Maria Betânia de Oliveira Garcia**  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa  
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 Hännemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036